

Łódź, 1.09.2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. Tomasza Skrzypczaka
pt. „Genomika funkcjonalna składników kompleksu gamma-sekretazy
***Arabidopsis thaliana*”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Tomasza Skrzypczaka została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Wojtaszka.

Praca liczy 131 stron, 65 rysunków, i 13 tabel bardzo dobrze dokumentujących zagadnienia omawiane w rozprawie oraz 172 pozycje w spisie piśmiennictwa (właściwie dobrane prace doświadczalne i inne artykuły literatury światowej, w zdecydowanej większości opublikowane w latach lat 2000-2015; w spisie cytowanej literatury znalazłem nieliczne „usterki” jak np. niepełne dane bibliograficzne prac autorstwa Walker, 2009 czy Xu i Li, 2001. Mam też wątpliwości dotyczące pracy doktorskiej dr Michaliny Smolarkiewicz (żeby nie było wątpliwości, *de domo* Maruniewicz) – czyżby pracę doktorską broniła dwukrotnie lub broniła dwóch doktoratów, w 2011 i 2012. Z tego co wiem Pani dr zrobiła to jeden raz w 2012 r., a tytuł jej pracy doktorskiej brzmiał: *Analiza strukturalna i funkcjonalna podjednostek kompleksu γ -sekretazy u Arabidopsis thaliana*). Moją szczerą zazdrość wzbudziła możliwość zacytowania przez doktoranta aż 172 (licząc pojedynczo doktorat M. Smolarkiewicz – 171) prac tematycznie powiązanych z rozprawą doktorską. Fakt, że w większości pochodzą one z ostatnich 10 lat, świadczy o wadze i aktualności poruszanej w rozprawie tematyki badawczej.

Rozprawa została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie i oprócz spisu treści, rysunków (wolałbym używania terminu rycina) i tabel oraz wykazu stosowanych skrótów zawiera *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, interesujący *Przegląd literatury* i *Cel pracy*, *Materiał*, obszerną część metodyczną *Metody* podzieloną na podrozdziały: *Metody pracy z materiałem roślinnym*, *Metody pracy z bakteriami*, *Metody pracy z DNA*, *Metody pracy z białkami* i *Metody mikroskopowe*, a wreszcie *Wyniki*, obszerną i interesującą *Dyskusję*, *Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze* (ten podrozdział zawsze budzi moje największe zainteresowanie), *Literaturę* i *Suplement*. Jak nietrudno się domyślić obszerność

pracy jest spowodowana przede wszystkim koniecznością opisu wielorakich, stosowanych przez Doktoranta *et consortes* (patrz podziękowania na str. 0) metod oraz obfitą dokumentacją uzyskanych wyników. Tym niemniej, układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analizy wyników przedstawione zostały przez Doktoranta w sposób właściwy dla tego rodzaju dokumentów.

Stąd, uprzedzając uzasadnienie, chciałbym już teraz wyrazić pogląd, że praca ta w mojej ocenie spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Tomasza Skrzypczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uzasadnienie

Tematyka i cele pracy doktorskiej mgr. Tomasza Skrzypczaka mieszczą się w jednym z niezwykle ważnych, bardzo aktualnych kierunków współczesnej (nowoczesnej) biologii komórki (nie tylko roślinnej), a mianowicie funkcjonalnej genomiki kluczowych dla funkcjonowania komórki enzymów. U podstaw zainteresowania tą tematyką leży z jednej strony ogromny, niespotykany wcześniej rozwój warsztatu badawczego, technik, narzędzi pozostających do dyspozycji naukowców, z drugiej zaś, będące tego konsekwencją, osiągnięcia poznawcze w dziedzinie cytobiochemii, genetyki i biologii molekularnej – niech wyrazem tego będzie metodyka pracy z DNA i białkami oraz zastosowane przez Doktoranta metody mikroskopowe.

Doktorant podjął się bardzo ambitnego zadania. Nie jest żadną tajemnicą, że Profesor Wojtaszek wraz ze swoim Zespołem szereg lat temu podjęli tematykę dotyczącą molekularnych aspektów funkcjonowania komórek roślinnych. Tym razem badania skoncentrowały się na analizie składu podjednostkowego i aktywności kompleksu γ -sekreazy u *Arabidopsis thaliana* oraz nad identyfikacją białek oddziałujących z podjednostkami tego kompleksu.

Można, zatem stwierdzić, że temat pracy doktorskiej mgr. Skrzypczaka i jednoznacznie sformułowany, kierunkowy cel, spełniają wymagania stawiane obecnie przed autorami ambitnych projektów badawczych. Potwierdzeniem tego jest fakt, że praca realizowania była w ramach projektów Preludium 2013/09/N NZ3/00532 i Opus 2012/05/B/NZ3/01260 finansowanych przez NCN.

Problematyka badawcza, a w szczególności omawiane w tej rozprawie zagadnienia są doskonałą ilustracją złożoności, wieloaspektowości prac analitycznych prowadzących do

rozszyfrowania tajników funkcjonowania komórek nie tylko roślinnych. Aczkolwiek nie są to badania dostarczające definitywnych, „globalnych” rozstrzygnięć, jednak stanowią kolejny ważny krok do poznania wyżej wspomnianych tajników, poszerzenia naszej wiedzy o złożoności funkcjonowania, metabolizmu komórek. O ich znaczeniu najlepiej świadczy fakt opublikowania wyników pracy mgr. Skrzypczaka w renomowanym czasopiśmie specjalistycznym *Journal of Experimental Botany*.

Nie ulega wątpliwości, że wyniki opisane w rozprawie doktorskiej stanowią oryginalny wkład Autora(ów) w poszerzenie dostępnej wiedzy na temat interakcji międzybiałkowych, w które zaangażowane są roślinne preseniliny i inne podjednostki γ -sekreazy. Molekularni partnerzy presenilin, a także PEN-2, APH-1 oraz nikastryny mogą pełnić w komórce roślinnej funkcje związane z transportem pęcherzykowym oraz odpowiedzią na stresy biotyczne, być może, jak sugeruje mgr Skrzypczak poprzez zaangażowanie w kontrolę jakości białek w obrębie kanałów siateczki śródplazmatycznej. Co więcej, przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować również białka, które mogą być potencjalnymi substratami roślinnej γ -sekreazy. Ponadto, przeprowadzone przez mgr. Skrzypczaka eksperymenty koimmunoprecypitacji, BN PAGE oraz TAP tagging sugerują jego zdaniem, niekonstytutywną obecność kompleksu γ -sekreazy w komórkach *A. thaliana*. Wnioski płynące z przeprowadzonych badań bardziej szczegółowo Doktorant opisał w Podsumowaniu pracy:

- Białko Prekursorowe β -Amyloidu ulega proteolizie w komórkach roślinnych, ale w sposób niezależny od presenilin.
- Roślinne podjednostki γ -sekreazy nie oddziałują z ludzką preseniliną 1 w protoplastach *A. thaliana*.
- Ps1, APH-1, PEN-2 mogą tworzyć wielkocząsteczkowe kompleksy w komórkach roślinnych, w tym kompleksy o wielkości 700 kDa.
- Preseniliny oddziałują z TIRP - białkiem z domeną TIR oraz z białkiem podobnym do R-SNARE. TIRP oddziałuje również z RTNLB1, białkiem z rodziny retikulonów.
- Zidentyfikowano w eksperymentach TAP-tagging oraz koimmunoprecypitacji białka potencjalnie oddziałujące z PEN-2 oraz z Ps2.

Bezdyskusyjnie, merytorycznie niezastąpioną „ozdobą” pracy jest, świetna także od strony technicznej, wizualizacja ekspresji, koekspresji analizowanych białek. Nie przypominam sobie w piśmiennictwie naukowym polskiego autoramentu (pomijając prace z Zespołu

Profesora Wojtaszka), tak metodycznie zaawansowanej dokumentacji analizy ekspresji badanych białek, ich lokalizacji i interakcji pomiędzy nimi w komórkach roślinnych.

W świetle przedstawionych tutaj tylko ważniejszych wyników pracy, za w pełni uzasadnione uważam zdania napisane przez mgr. Tomasza Skrzypczaka w rozdziale Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze: *Dalsze badania powinny skupić się na funkcjonalnym aspekcie zidentyfikowanych oddziaływań molekularnych, a które wskazują na możliwe zaangażowanie presenilin w reakcję na atak patogenów. Natomiast przeprowadzenie porównania transkryptomów roślin typu dzikiego oraz ps1/ps2 mogłoby przybliżyć identyfikację substratów γ -sekreazy.*

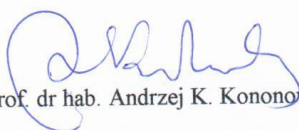
Podsumowując, chciałbym podkreślić, że mgr Skrzypczak w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanował bardzo bogaty, nowoczesny warsztat badawczy, który, jestem przekonany, pozwoli Mu na kontynuację pracy naukowej.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki zasługują na uwagę badaczy zajmujących się tą tematyką, ich interpretacja jest w pełni uprawniona, a cała rozprawa doktorska zasługuje na duże uznanie.

Na zakończenie chciałbym jeszcze raz powtórzyć: rozprawę doktorską mgr. Tomasza Skrzypczaka oceniam jako właściwą pod względem formalnym i bardzo wartościową pod względem merytorycznym, a stwierdzone przeze mnie mankamenty nie mają, z natury swojej, wpływu na moją ogólnie bardzo wysoką jej ocenę.

Wyrażając pogląd, że praca ta spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Tomasza Skrzypczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chciałbym w tym miejscu wyrazić opinie, że biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy i więcej niż poprawność formalną, o ile spełnione są inne wymogi, praca ta zasługuje na stosowne, w ramach istniejących przepisów, wyróżnienie.


Prof. dr hab. Andrzej K. Kononowicz