



Warszawa, 07.12.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Kreli pt.: „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka nukleaz zaangażowanych w programowaną śmierć komórki u roślin”

Uwagi wstępne i formalny opis rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska wykonana została w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem pana dr hab. Krzysztofa Leśniewicza. Praca została przygotowana w języku polskim oraz ma typowy układ rozprawy doktorskiej. Na 113 numerowanych stronach autor rozprawy zamieścił Streszczenie w wersji polskiej i angielskiej, Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Bibliografię. Zgodnie z zasadami praca została zaopatrzona również w Spis treści. Udostępniono mi zarówno wydrukowaną oprawioną kopię jak i wersję elektroniczną.

Rozprawa dotyczy grupy enzymów biorących udział w konserwowanym ewolucyjnie, genetycznie regulowanym mechanizmie programowalnej śmierci komórki (PCD). Odgrywa on ważną rolę zarówno w trakcie rozwoju roślin (w różnych wegetatywnych i generatywnych tkankach) jak i w odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne bodźce środowiskowe. Mechanizm PCD w roślinach jest słabiej scharakteryzowany niż u zwierząt. Różnice w budowie komórki roślinnej i zwierzęcej wymuszają różnice w przebiegu PCD. Z drugiej strony, wiele elementów, ogólna zasada procesu i efekt końcowy (śmierć komórki po wykorzystaniu elementów budulcowych) są podobne. W roślinach wyróżnia się kilka form PCD ale mechanizmy regulujące ich przebieg nie są dokładnie znane. Do degradacji zawartości komórki wykorzystywane są m.in. proteazy, lipazy i nukleazy.

Mgr Kreli koncentruje się na tej ostatniej grupie enzymów, zakładając, że na różnych etapach PCD w degradację DNA zaangażowane będą nukleazy o różnych właściwościach i wymaganiach.

Opis części rozprawy i ocena merytoryczna

Wstęp: Jest to bardzo zwięźle wprowadzenie do tematyki. Autor ograniczył się tylko do elementów niezbędnych. W dodatku opisał je bardzo oszczędnie. Układ Wstępu jest jednak logiczny. Na początku opisano ogólnie czym jest PCD, jakie procesy wewnątrzkomórkowe charakteryzują PCD i jakie elementy sygnałne oraz białka enzymatyczne zaangażowane są w PCD. Autor zwrócił uwagę, że odpowiednikami kaspaz zwierzęcych (kaspazy to proteiny kluczowe w PCD) są metakaspazy

roślinne. W kolejnej części Wstępu pan mgr Krela opisał występowanie mechanizmu PCD w trakcie rozwoju roślin, w tym w rozwoju organów generatywnych, w zarodku, liściach, trichomach, tkance przewodzącej i korzeniach oraz w odpowiedzi obronnej. Następnie, opisał molekularny mechanizm PCD z podziałem na rozwojową i środowiskową. Nie jestem pewna czy taki podział jest wystarczający i dlatego poniżej stawiam dodatkowe pytania. Później skoncentrował się na głównym przedmiocie swoich badań – nukleazach. W tej części pokazał najpierw hipotetyczny schemat działania nukleaz podczas PCD, następnie omówił nukleazy z dwóch rodzin S1/P1 i SNc, uznając je za najbardziej prawdopodobne elementy PCD u roślin. Generalnie, układ Wstępu jest akceptowalny i dość logiczny ale zbyt skrótowy.

Uwagi do Wstępu: Przyznaję, że poczułam niedosyt informacji po przeczytaniu Wstępu. Nasuwa się mnóstwo pytań, na które lektura wstępu nie dała odpowiedzi a które należałoby uporządkować. Na przykład chciałabym się dowiedzieć czegoś więcej na temat różnych form PCD występujących w roślinach. Podział na PCD rozwojową i środowiskową jest tylko jednym z możliwych podziałów. Czy apoptoza to też forma PCD i czym różni się od innych form? Jaki mechanizm odpowiedzialny jest za śmierć starych części roślin (szczególnie liści)? Ponadto, autor kilkakrotnie wspomniał autofagię, bez wyjaśnienia powiązań pomiędzy autofagią i PCD. W trakcie obrony chciałabym poprosić autora o uporządkowanie relacji pomiędzy wyżej wspomnianymi procesami. Nukleazy to dość szeroka grupa enzymów ale tym bardziej przydałaby się jakaś klasyfikacja i być może więcej informacji dotyczących nukleaz roślinnych, co stanowiłoby tło dla omawianych później nukleaz typu S1/P1 i SNc. Poza tym, za niezbyt dobry pomysł uznaję wstawienie ‘archaicznego’ (z 1991 r.) schematu przedstawiającego strukturę nukleazy P1 na Ryc. 2 i Ryc. 3. Nie jestem, co prawda, specjalistą od modelowania struktur białkowych ale zakładam, że bazie PDB istnieją modele 3D nukleaz S1/P1, za pomocą których z większym powodzeniem dałoby się zilustrować tę strukturę a użycie odpowiednich programów (np. Yasara, Chimera) mogłoby ułatwić pokazanie modelu struktury białek i ich centrów aktywnych.

Cel Pracy: Ogólny cel badań jest zwięźle określony. Celem jest poznanie funkcji wybranych nukleaz z rodziny S1/P1 i SNc w procesie PCD u roślin. Wybrane nukleazy są aktywowane w tkankach roślinnych, w których zachodzi PCD. Określenie pięciu szczegółowych zadań mających doprowadzić do zrealizowania celu jest zbieżne z zagadnieniami przedstawionymi w Wynikach. Nie mam uwag krytycznych do tej części.

Materiały i Metody: Ten rozdział zajmuje 18 stron szczegółowych opisów metod, w tym także składu buforów i sekwencji starterów. Opis obejmuje zarówno metody specyficzne dla roślin

(uprawa, transformacja, analiza) jak i metody biologii molekularnej (klonowanie, reakcja PCR, wprowadzanie mutacji), test aktywności nukleolitycznej, mikroskopię fluorescencyjną i barwienie GUS. Nie mam wątpliwości, że pan mgr Krela poznał i stosował opisane metody oraz, że potrafił opisać je w sposób pozwalający na powtórzenie wykonanych przez niego eksperymentów. Ta część jest opisana bardzo szczegółowo. Uznaję to za duży atut rozprawy. Nie zauważyłam tutaj istotnych błędów ani niedociągnięć.

Wyniki zostały przedstawione na 50 stronach rozprawy i zilustrowane 46 rycinami. Podzielone zostały na pięć części. **Część pierwsza** dotyczy sprawdzenia wymagań katalitycznych nukleaz S1/P1 u organizmów z innych grup systematycznych niż rośliny wyższe. Wybrano dwa gatunki: *Physcomitrella patens* i *Acanthamoeba castellanii*. W każdym z nich zidentyfikowano po dwa różne geny kodujące nukleazy typu S1/P1. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do *P. patens*, w którym oba białka są aktywne w neutralnym pH i negatywnie regulowane przez Zn^{2+} , nukleazy z *A. castellanii* mają różne właściwości – jedna jest aktywna zarówno w pH 8 jak i w pH 5,5 a druga wyłącznie w niskim pH; obie są aktywowane w niskim pH jonami cynku. Badania tej części potwierdziły jedynie wcześniejsze obserwacje, że nukleazy S1/P1 mogą wykazywać duże zróżnicowanie wymagań katalitycznych. W **części drugiej** autor, porównując sekwencje aminokwasowe 5 nukleaz typu S1/P1 z *Arabidopsis thaliana* (ENDO1-ENDO5) z wcześniej scharakteryzowanymi nukleazami o znanych właściwościach katalitycznych, wytypował a następnie potwierdził mutagenezą celowaną aminokwasów odpowiedzialne za odmienne wymagania katalityczne. Konkretnie, zamiana R46 na A w ENDO2 (która wykazuje aktywność zależną od Ca^{2+} i nieco słabszą aktywność zależną od Zn^{2+}) spowodowała znaczący spadek aktywności zależnej od Ca^{2+} . Z kolei, zamiana H49 na K w ENDO4 powodowała uzyskanie dodatkowej właściwości trawienia DNA w obecności Zn^{2+} (obok posiadanej wcześniej właściwości trawienia w obecności Ca^{2+}). Ta część wyników wskazuje na możliwość przesunięcia katalitycznych właściwości za pomocą pojedynczych mutacji. W **części trzeciej** mgr Krela badał lokalizację komórkową nukleaz ENDO2-ENDO5. ENDO1 była już wcześniej pod tym względem scharakteryzowana jako aktywna w neutralnym pH w obecności jonów Ca^{2+} oraz hamowana w kwaśnym pH i jonami Zn^{2+} . Do tego celu wykorzystał układ heterologiczny - stabilnie transformowane tytoniowe linie komórek BY-2 konstruktami kodującymi białka (z niewielkimi delecjami C-końców) w fuzji z białkiem zielonej fluorescencji EGFP. Na wczesnym etapie hodowli komórek wszystkie badane białka lokalizowały się w ER, w starzejących się komórkach ENDO2, 3 and 4 wykazywały także kumulację w wakuoli, natomiast ENDO4 nie zmieniała lokalizacji. W trakcie procesu PCD, ENDO2 lokalizowała się w jądrze, ENDO3 była także w wakuoli, ENDO4 raczej pozostawała w ER ale także w niewielkich wypustkach z ER na terenie jądra. ENDO5 pozostawała raczej w wakuoli. Autor badał także wpływ kwasu salicylowego na zmianę lokalizacji ENDO2-5. Celem badań przeprowadzonych w

części czwartej było ustalenie wzoru ekspresji genów kodujących ENDO2-ENDO5 oraz genów kodujących dwie nukleazy z rodziny S_{NC}, CAN1 i CAN2. Wykorzystano konstrukty genetyczne zawierające gen reporterowi GUS pod kontrolą regionów promotorowych poszczególnych genów. Konstrukty wykorzystano do uzyskania stabilnie transformowanych linii *Arabidopsis thaliana*. Analizy wykazały, że w przypadku ENDO4 użyta sekwencja promotorowa była nieaktywna. W przypadku ENDO2, ENDO3 i ENDO5 oraz CAN1 i CAN2 prześledzono za pomocą histochemicznego barwienia GUS ekspresję poszczególnych genów w różnych częściach roślin. **Część piąta** zawiera analizę różnic fenotypowych mutantów insercyjnych w genach kodujących nukleazy. Badano mutanty we wszystkich genach z wyjątkiem CAN2. Mutanty endo1, endo3 i can1 miały mniejsze rozety niż linia typu dzikiego. Jednak istotne różnice morfologii kwiatów i łuszczynek wykazywały jedynie mutanty endo1. Mutanty te wykazywały także inną cechę, ich korzenie wykazywały fototropizm dodatni.

Uwagi do części Wyniki: Układ tej części jest na ogół logiczny. Chciałabym jednak dowiedzieć się dlaczego do sprawdzenia wymagań katalitycznych nukleaz wybrano obok mszaka (*Physcomitrella patens*), co jest zrozumiałe, także pierwotniaka (*Acanthamoeba castellanii*). Rozumiem, że jednym z powodów włączenia tych wyników było wykazanie obecności dwóch typów aktywności nukleaz w tym organizmie ale bardzo chętnie dowiedziałabym się dlaczego autor zainteresował się w ogóle tym organizmem. Za wartościowy wyniki tej rozprawy uważam wykazanie za pomocą mutagenyzy, że pojedyncze zmiany aminokwasów w centrum katalitycznym nukleaz S1/P1 wpływają na zmiany preferencji jonowych. Analiza lokalizacji subkomórkowej białek ENDO2-ENDO5 została przeprowadzona dość starannie ale wątpliwości budzi heterologiczny układ (białka z rzodkiewnika badano w tytoniu) oraz potencjalny wpływ odcięcia C-końcowych aminokwasów nukleaz na ich lokalizację. Proszę o skomentowanie tych uwag w czasie obrony. Analiza ekspresji promotorów z wykorzystaniem GUS jako genu reporterowego to kolejna seria wartościowych wyników, ilustrowanych ładnymi zdjęciami. Nasuwa się jednak pytanie, czy lokalizacja transgeny z kasetą ekspresyjną promotor-GUS mogłaby wpłynąć na profil ekspresji badanego promotora. W związku z tym chciałabym dowiedzieć się czy autor porównał kilka niezależnych transformantów dla każdego konstruktu. Brak aktywności promotora ENDO4 nasuwa kolejne pytania: Czy promotory innych badanych genów były wystarczająco długie aby zachowany został poziom ekspresji właściwy dla 'naturalnej' lokalizacji? Czy poziom ekspresji tych genów badany był za pomocą innych metod a jeśli tak to czy korelował z wynikami barwienia GUS w transformantach?

Pewnym niedociągnięciem w tej części pracy jest brak markerów wielkości w większości zdjęć makroskopowych i przekrojach. W końcowej części wyników autor stwierdził brak wyraźnych fenotypów pojedynczych mutantów. Wielka szkoda, że autor nie pokusił się o uzyskanie i scharakteryzowanie mutantów wielokrotnych.

Dyskusja: Ta część mieści się w obrębie pięciu i pół strony. Pomimo zwięzłości, kandydat omawia w Dyskusji kolejne grupy Wyników wykazując się znajomością literatury i umiejętnością krytycznego spojrzenia na uzyskane przez siebie wyniki. Dyskusja została przeprowadzona wystarczająco zręcznie i kompetentnie. W tej części zabrakło mi jednak graficznego modelu prezentującego uzyskane wyniki. Schemat taki w istotny sposób ułatwiłby odbiór pracy.

Uwagi dotyczące strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa jest przygotowana dość przejrzysto ale zawiera szereg drobnych błędów edytorskich, gramatycznych, nieprecyzyjnych i niezręcznych określeń oraz literówek, które mogłyby zostać usunięte przy wykazaniu się przez autora nieco większą starannością. Dodatkowo, w mojej wersji wydrukowanej dwie ostatnie strony Dyskusji zostały zdublowane – to kolejny błąd edytorski. Błędy te nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy. Na szczególne podkreślenie zasługują dobrej jakości starannie przygotowane fotografie z mikroskopu konfokalnego oraz zdjęcia tkanek roślin z histochemicznym barwieniem GUS.

Podsumowanie

Wyniki przedstawione w rozprawie uznaję za wartościowy wkład do zrozumienia mechanizmu programowanej śmierci komórki w roślinach. Pomimo sformułowanych powyżej pytań, wątpliwości i uwag krytycznych doktorat uważam za bardzo dobry. Najwyżej oceniam klarowną część metodyczną oraz bardzo ładne fotografie mikro- i makroskopowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016r, poz.882). W związku z tym **zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie pana mgr Rafała Kreli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. Agnieszka Sirko