

Prof. dr hab. Halina Gabrys
Zakład Biotechnologii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków, 11 września 2015

Recenzja

Rozprawy doktorskiej pana mgr **Tomasza Skrzypczaka**
p.t. „**Genomika funkcjonalna składników kompleksu
gamma-sekretazy *Arabidopsis thaliana***”
wykonanej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej
na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Badania przedstawione w dysertacji doktorskiej mgr Tomasza Skrzypczaka stanowią konsekwentne pogłębienie tematu podjętego kilka lat temu w zespole badawczym prof. Przemysława Wojtaszka. Poprzedniczka pana Skrzypczaka, dr Michalina Smolarkiewicz ustaliła, że w genomie *Arabidopsis thaliana* są obecne homologi podjednostek kompleksu γ -sekretazy, transbłonowego enzymu, prowadzącego proteolizę białek. Autorka tych badań zlokalizowała podjednostki kompleksu w błonach wewnętrznych komórek roślinnych i w błonie komórkowej. Zaproponowała także model składania i organizacji kompleksu proteolitycznego γ -sekretazy w komórkach roślinnych. W ten sposób zapoczątkowano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej nowy kierunek ciekawych, ale też niełatwych badań, który podjął pan mgr Skrzypczak. Kompleks γ -sekretazy zwrócił uwagę naukowców ponieważ wskutek jego aktywności powstaje w mózgu β -amyloid, peptyd którego złogi są w dużej mierze odpowiedzialne za procesy neurodegeneracyjne. Powstanie β -amyloidu katalizuje proteaza aspartylowa - presenilina; poza nią w skład kompleksu wchodzi trzy inne białka: nikastryna, białka APH-1 i PEN-2. Z oczywistych względów badania zmierzające do poznania mechanizmu działania kompleksu γ -sekretazy i jego podjednostek prowadzone są na modelach zwierzęcych zaś informacje na temat ich funkcji i sposobu działania w roślinach, pomimo dotychczasowych wysiłków, są bardzo skąpe. Ponieważ każda nowa informacja może nas przybliżyć do zrozumienia mechanizmów prowadzących do powstania ciężkich schorzeń, co jest warunkiem opracowania skutecznej terapii, temat pracy przedstawionej mi do recenzji uważam za nader ważki i aktualny.

Formalny opis rozprawy

Praca liczy 131 stron maszynopisu, a jej układ jest typowy dla rozpraw doktorskich pod względem składających się na nią części. Wśród nich niemal połowę objętości pracy, 59 stron, zajmuje bogato ilustrowany rozdział zawierający opis wyników. Wstęp, nazwany przeglądem literatury, przedstawił autor na czternastu stronach. Zanalizował w nim obecny stan wiedzy na temat presenilin, proteaz wchodzących w skład kompleksu γ -sekretazy oraz całego kompleksu. Cel pracy został wyodrębniony w postaci jednostronicowego rozdziału, w którym zawarto również krótki komentarz niejako podsumowujący informacje zawarte w przeglądzie literatury. Sam cel przeprowadzonych badań został najpierw sformułowany w sposób ogólny, a następnie uszczegółowiony w postaci czterech celów cząstkowych. W części metodycznej osobno omówiono materiały użyte w doświadczeniach zaś trzynastostronicowy rozdział 4 zawiera szczegółowy opis technik badawczych. Osobne podrozdziały poświęcił autor omówieniu metod pracy z materiałem roślinnym, z bakteriami, DNA, białkami i metodom mikroskopowym, mikroskopii konfokalnej i metodzie FRET-FLIM użytej do badań

oddziaływań międzybiałkowych. Najwięcej miejsca zajmuje opis i analiza uzyskanych wyników. Rozdział ten zawiera rozpoczynający raport z doświadczeń nad proteolizą białka prekursorowego β -amyloidu w protoplastach, po którym następuje analiza występowania badanego kompleksu w komórkach roślinnych i identyfikacja białek oddziałujących z jego podjednostkami, a następnie wyniki analizy oddziaływań pomiędzy presenilinami *A.thaliana* a wytypowanymi integralnymi białkami błonowymi przeprowadzonej metodą FRET-FLIM. Otrzymane wyniki skomentowano zwięźle w krótszym, dwunastostronicowym rozdziale *Dyskusja*, po którym następuje pięciopunktowe podsumowanie głównych osiągnięć pracy i trzydziestopięcioletni przegląd przewidywanych kierunków dalszych badań. Spis cytowanej literatury liczy ponad 170 pozycji. Dodatkowo w suplemencie zamieszczono krótkie omówienie niepomysłnych wyników eksperymentów, które w przypadku powodzenia mogły znacznie ułatwić przeprowadzenie zaplanowanych badań.

Ocena merytoryczna

Celem nadrzędnym przedstawionych badań było określenie funkcji presenilin i γ -sekreazy w komórkach roślinnych. Jako modele posłużyły głównie protoplasty *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantów typu knock-out bądź z nadekspresją wybranych białek; część doświadczeń przeprowadzono z użyciem *Nicotiana benthamiana*. Cele szczegółowe obejmowały zbadanie aktywności proteolitycznej presenilin – detekcję proteolizy prekursora β -amyloidu, białka APP, wykonanie analizy występowania i składu podjednostkowego kompleksu γ -sekreazy, identyfikację białek oddziałujących z presenilinami i z białkiem PEN-2 wchodzącym w skład kompleksu, a także przeprowadzenie analizy funkcjonalnej presenilin *A.thaliana*.

Badania aktywności roślinnej γ -sekreazy polegały na porównaniu produktów proteolizy APP otrzymanych w protoplastach typu dzikiego z tymi, które powstają w protoplastach mutantów *ps1/ps2* pozbawionych funkcjonalnych presenilin. Wymagały one wykonania transformacji protoplastów konstrukcją genetyczną kodującą APP; autor dokonał także oceny lokalizacji wewnątrzkomórkowej APP i stwierdził, że białko to kolokalizuje z przedziałem późnych endosomów. Proteoliza APP okazała się przebiegać podobnie w protoplastach obydwu genotypów. Stwierdzono także, że z niewielką wydajnością powstaje β -amyloid, a proces ten jest również niezależny od genotypu protoplastów. Wyniki te wskazują, że w protoplastach *A. thaliana* dochodzi wprawdzie do proteolizy APP, ale że jest ona niezależna od obecności presenilin. Należy podkreślić, że badania były utrudnione ze względu na brak przeciwciał skierowanych przeciwko presenilinom roślinnym, zaś dostępne przeciwciała przeciwko ludzkiej presenilinie okazało się niespecyficzne w materiale roślinnym. Dlatego autor musiał stosować do identyfikacji presenilin metodę pośrednią, wyznaczkowanie tych białek GFP i przeciwciała przeciwko GFP.

Do analizy składu kompleksu i identyfikacji białek oddziałujących z preseniliną 2 i PEN-2 zastosował autor metodę Tandem Affinity Purification i koimmunoprecypitację. Jako kandydatów do oddziaływań wytypował m.in. retikulony oraz białka zaangażowane w kontrolę jakości białek w retikulum endoplazmatycznym, w tym potencjalne substraty γ -sekreazy. Do badania oddziaływań pomiędzy podjednostkami γ -sekreazy a innymi białkami wykorzystał również metodę FRET-FLIM, która pozwala zmierzyć przekazywanie energii pomiędzy białkami fluoryzującymi. To podejście pozwoliło na identyfikację białek oddziałujących z presenilinami. Są to białka z domeną TIR (TIRP) oraz białka z rodziny R-SNARE.

Ponadto pan Skrzypczak wykazał, że oddziaływania pomiędzy presenilinami a retikulonem RTNLB1 mają charakter pośredni, a także dowiódł że TIRP są zdolne do oddziaływania z RTNLB1 i z presenilinami. Bezpośrednia interakcja presenilina/TIRP zależała od fragmentu TIRP z domeną TIR. Dalsze eksperymenty wykazały, że preseniliny nie oddziałują ze wszystkimi białkami z domeną TIR i pokrewnymi do TIRP. Analizując techniką BN PAGE podjednostki γ -sekreazy poddane nadekspresji w protoplastach autor wykazał, że w komórkach roślinnych badany kompleks może osiągać masę ok. 700 kDa.

Badania powyższe zostały wykonane i udokumentowane w sposób bardzo metodyczny. Praca doświadczalna wymagała od autora znacznych umiejętności technicznych, zarówno w dziedzinie biochemii, inżynierii genetycznej jak i mikroskopii konfokalnej. Praca ta wymagała także od eksperymentatora determinacji i wiary w powodzenie podejmowanego wysiłku. Podjęte badania należą bowiem do badań trudnych z jednej strony bowiem prowadzone są na materiale roślinnym, z drugiej zaś dotyczą białek błonowych. Stwierdzona już na początku odmienność od znacznie lepiej poznanego kompleksu sekreazy zwierzęcej na pewno nie ułatwiała pracy.

Do realizacji bogatego programu eksperymentalnego pan Skrzypczak wykorzystał szeroką gamę technik współczesnej biochemii, biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i bioinformatyki. Doktorant w sposób profesjonalny posługuje się technikami standardowymi: izolacji protoplastów, przygotowywania konstruktów DNA, transformacji bakterii, protoplastów i tkanki roślinnej, izolacji białek i kwasów nukleinowych, ich ilościowego oznaczania, oznaczania aktywności enzymów w żelu, różnorodnymi technikami elektroforetycznego rozdzielania oraz identyfikacji białek i kwasów nukleinowych i mikroskopii konfokalnej. Opanował także w stopniu profesjonalnym zaawansowane techniki badań oddziaływań międzybiałkowych, w tym technikę FRET-FLIM, pozwalającą stwierdzić czy wytypowane białka ze sobą oddziałują, a także ocenić siłę tych oddziaływań.

Program badań przedstawionych w rozprawie cechuje logiczne rozwijanie założonych wątków eksperymentalnych i wielostronność podejść metodycznych.

Do głównych osiągnięć doktoranta można zaliczyć:

- stwierdzenie, że APP, białko prekursorowe β -amyloidu ulega proteolizie w komórkach roślinnych na drodze niezależnej od presenilin,
- wykazanie że preseniliny oddziałują z TIRP - białkiem zawierającym domenę TIR oraz z białkiem podobnym do R-SNARE,
- stwierdzenie oddziaływania pomiędzy TIRP a RTNLB1, białkiem z rodziny retikulonów,
- zidentyfikowanie przy użyciu technik TAP-tagging oraz koimmunoprecypitacji białek, które mogą oddziaływać z PEN-2 i z Ps2.

Oprócz identyfikacji konkretnych oddziaływań międzybiałkowych, w których biorą udział roślinne preseniliny i inne podjednostki kompleksu γ -sekreazy istotnym osiągnięciem mgr Skrzypczaka jest wskazanie funkcji jakie mogą pełnić w komórce roślinnej białka współpracujące z presenilinami, a także PEN-2, APH-1 oraz nikastryna. Autor przedstawił dowody na związek funkcji tych białek z transportem pęcherzykowym oraz z odpowiedzią rośliny na stresy biotyczne. Wskazał także na ich związek z kontrolą jakości białek prowadzoną w błonach retikulum endoplazmatycznego. Ten aspekt pracy doktorskiej mgr Skrzypczaka jest bardzo istotny bowiem zarysowuje nowe kierunki dalszych badań białek kompleksu γ -sekreazy w roślinach zmierzające do ustalenia funkcji jakie pełnią one w tych organizmach.

W dyskusji autor wnikliwie i krytycznie zanalizował otrzymane wyniki, wiele miejsca poświęcił także krytycznej ocenie zastosowanych metod.

Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne

1) Omawiając funkcje presenilin niezależne od γ -sekreazy autor wzmiankuje o hipotezie przypisującej im rolę w glikozylacji podjednostki lizosomalnej pompy protonowej. Proszę o uszczegółowienie tej wzmianki. Również wzmianka na temat roli presenilin w regulacji homeostazy wapniowej komórki wydaje mi się warta rozwinięcia, zwłaszcza w kontekście otrzymanych przez autora wyników.

2) Czy P19 o którym mowa w podrozdziale 4.1.5. jest istotnie plazmidem pomocniczym?

3) Większość doświadczeń została wykonana z zastosowaniem modelu protoplastowego. Proszę autora o opinię czy i w jakim stopniu pozbawienie komórek roślinnych ściany może wpłynąć na otrzymane wyniki.

4) W doświadczeniach nad wpływem inhibitora zwierzęcej γ -sekreazy na wzrost i rozwój roślin, opisanych w podrozdziale 5.1.3, zastosowano DAPT. Jako jeden z powodów braku aktywności DAPT autor podaje rozkład inhibitora w podłożu. Czy w literaturze dostępne są informacje na temat trwałości DAPT? Może autor ma pomysł jak to sprawdzić?

5) W dyskusji autor rozważa hipotezę, że kompleks γ -sekreazy może powstawać u roślin tylko w określonych warunkach fizjologicznych, np. w odpowiedzi na jakiś czynnik stresowy. Proszę o podanie przykładów innych kompleksów powstających w podobny sposób.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Ogólna struktura pracy jest przejrzysta chociaż liczba przeprowadzonych doświadczeń powoduje że momentami trzeba wracać do poprzednio przeczytanego tekstu. Myślę, że bardzo pomocne byłoby sporządzenie poglądowego schematu, który mógłby stanowić drogowskaz dla czytelnika zagubionego w gąszczu prezentowanych wyników i omawianych wątków.

Na uznanie zasługuje staranna strona graficzna, właściwy dobór, precyzyjny opis i dobra jakość materiału ilustracyjnego, w tym licznych obrazów mikroskopowych.

Niestety tekst dysertacji pozostawia wiele do życzenia zarówno pod względem stylistycznym/gramatycznym jak i pod względem braku ostatecznej korekty i pozostawienia zbyt dużej liczby drobnych błędów, niedokończonych bądź przekreślonych wyrazów oraz tzw. literówek. W tekście można też napotkać żargon laboratoryjny i anglicyzmy (np. wyrażenia typu „(presenilina) została nadekspymowana”. Przy opisie doświadczeń wykonanych metodami inżynierii genetycznej wydaje się to obecnie nieuniknione ale nie zwalnia autora z obowiązku eliminacji wyrażen ewidentnie niezgrabnych. Poprawy wymagają szczególnie wypowiedzi nielogiczne i myśli zaczynane od końca lub środka. Autor powinien brać przykład z publikacji anglosaskich, w których zdania są krótkie, mają prostą konstrukcję i niosą jasny przekaz. Myślę, że dobrą wprawką w tym kierunku byłoby np. samodzielne przygotowanie pracy przeglądowej. Nie jest bowiem rozsądną taktyką zniechęcanie czytelnika do studiowania własnego dzieła i to dzieła oryginalnego i zasługującego na zainteresowanie.

Poniżej zamieszczam listę dostrzeżonych błędów formalnych lub/i językowych, z których wiele prawdziwie uprzykrza lekturę pracy.

Wykaz skrótów powinien być alfabetyczny. Przyjęte kryterium kolejności ukazywania się w tekście nie ma sensu bo należałoby pamiętać który skrót występował poprzednio.

Wstęp

Str.11. „roślinne homologi stanowią centralne zagadnienie” – czy homologi mogą stanowić zagadnienie?

podobnie poniżej: „Preseniliny okazały się kluczowym składnikiem procesów”

„wyniki badań do tej pory wciąż nie pozwoliły...”

Str.12. „Akceptowany model składania kompleksu” – akceptowany przez kogo?

Str.14. typowy opis „od tyłu” utrudniający zrozumienie sensu:

„Żeby APP mogło stać się substratem γ -sekreazy potrzebne jest najpierw odcięcie domeny zewnątrzkomórkowej APP przez α - lub β -sekreazę. Jedynie w konsekwencji proteolizy katalizowanej przez β -sekreazę (BACE1) a kontynuowanej przez γ -sekreazę może powstać β -amyloid.”

Poniżej autor zdaje się dyskutować sam ze sobą:

„Ostatni etap, γ -proteoliza, polega na odcinaniu kolejnych trójek aminokwasów, nie zawsze zresztą tej samej liczby trójek aminokwasów.”

„...ten mechanizm działania jest prawdziwy dla wszystkich substratów...” – a czy może być nieprawdziwy?

Str. 15. ECD: rozwinięcia skrótu tej domeny nie ma ani w wykazie skrótów ani w tekście.

Str. 16. Zdanie: „I tak na przykład, kadheryny i RPTP (ang. receptor-like protein tyrosine phosphatase), należące do licznych substratów γ -sekreazy pierwotnie bezpośrednio zaangażowanych w adhezję międzykomórkową, w konsekwencji zdarzeń proteolitycznych zakończonych uwolnieniem ICD przez γ -sekreazę, stają się jądrowymi regulatorami transkrypcji...” należy uporządkować/podzielić na dwa tak aby czytając nie trzeba było przeprowadzać rozkładu logicznego.

Tym bardziej: „Aktywność γ -sekreazy jest powiązana z transportem w obrębie przedziałów błonowych komórki, i tak np. receptor Notch oraz protokadheryny wymagają internalizacji z błony komórkowej do endosomów, która poprzedza proteolizę, a zależność lokalizacji, transportu i proteolizy jest też dyskutowana w przypadku APP.” i następne: „Aktywność enzymatyczna γ -sekreazy jest mniejsza dla kompleksów z preseniliną 2 niż dla kompleksów z preseniliną 1, co wykorzystuje się do uzasadnienia obserwacji, że brak preseniliny 1 lub też mutacje w obrębie sekwencji ją kodującej powodują poważniejsze konsekwencje dla komórek niż brak preseniliny 2”.

„Preseniliny pełnią także funkcje w komórce niezależnie od konstituowania aktywności γ -sekreazy.” – Co to znaczy?

Str.17. „Informacje, jakie udało się uzyskać na temat presenilin pochodzących z organizmów innych niż ssaki, sugerują, że role pełnione przez preseniliny niezależnie od aktywności γ -sekreazy, również mają duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki.” Czyjej komórki? Ssaków czy innych organizmów? A jeśli innych to czy dla ssaczej komórki także? Nawet jeśli po krótkim zastanowieniu odpowiedzi na powyższe pytania są oczywiste, najlepiej jest tak napisać pracę naukową aby czytelnik w ogóle nie musiał sobie zadawać takich pytań. Często z tekstu opartego w większości na informacjach pochodzących z badań prowadzonych na materiale zwierzęcym nie wynika czy mowa o komórkach zwierzęcych czy roślinnych (przykład – str. 15, tekst poniżej ilustracji) – to powinno być wyraźnie zaznaczone.

Str. 18. „Wszystkie opisane wyżej zmiany fenotypowe nie były obserwowane w mutancie...”

- chyba lepiej napisać po polsku, że nie obserwowano żadnej zmiany.

Str. 19. Dwa pierwsze zdania od góry strony wymagają poprawek stylistycznych; podobnie ostatnie zdanie na str. 20.

Str. 21. Kolejne niezgrabne wypowiedzi można znaleźć na końcu pierwszego paragrafu (3 ostatnie zdania). Jak należy rozumieć rozpadanie się oddziaływań („wraz z naruszeniem środowiska lipidowego”)?

Materialy

Opisy materiałów i stosowanych procedur powinny być szczegółowe i zawierać wszystkie informacje potrzebne do powtórzenia doświadczeń. Prace doktorskie często stanowią dużą pomoc dla młodszych kolegów kontynuujących badania przeprowadzone przez doktoranta. Dlatego pozwalam sobie zwrócić uwagę na różne szczegóły, których brakuje w opisach.

Str. 27. Może zgrabniej byłoby napisać, że w ABRC zamówiono wektory zawierające pełne sekwencje kodujące poszczególnych genów (cDNA) ?

Co to za konstrukcje genetyczne: APP pcDNA3.1 oraz HsPs1 pcDNA3.1?

Str. 29. Uwaga o tym, że pożywki stale zestalano 1% agarem dotyczy aktualnie tylko pożywek LB i nie odnosi się do YEB.

Str. 30. Przykłady żargonu: „Przeciwciała poliklonalne wyprodukowane w króliku”, „PCR kolonijny”, „umożliwiają ekspresję genu przeklonowanego”, „wylawianie (białek) z tkanki roślinnej”

Str. 31. „razem z białkiem fluorescencyjnym C- lub N-końcowym w odniesieniu do insertu” ? chyba raczej „z białkiem fluorescencyjnym sfuzjowanym z insertem na jego N- lub C-końcu”

Opisy plazmidów są w kilku miejscach niezrozumiałe lub/i niekompletne np:

„stworzone z wykorzystaniem plazmidu pPZP-RCS2 oraz genów białka fluorescencyjne z plazmidów pSAT”

Tylko o pSITE napisano Gateway Destination vector, a przy pSAT nie: czy pSAT nie są „destination”, czy w pSITE nie ma kasety ccdB?

Brak wyjaśnienia po co stosowano wektory pSAT i pSITE, skoro i jedno i drugie umożliwiały stworzenie białek fuzyjnych z całym GFP; brak wyjaśnienia skrótu eGFP.

Czy pEarley Gate 103 działa w systemie gateway? Czy GFP 6xHis jest na C czy na N końcu?

Metody

Str. 32. 4.1.1. Czy do sterylizacji nasion najpierw stosowano ACE potem etanol, czy oba jednocześnie? Czy nasion do hodowli *in vitro* nie płukano po przetrzymywaniu w oparach podchlorynu?

4.1.2 i 4.1.3. Co oznacza: „stosowano wobec podłoża preparat grzybobójczy”?

Czy rośliny hodowano *in vitro* bez cukru?

Przy jakim natężeniu światła hodowano rośliny? Jakie było źródło światła?

4.1.4. „Liście z zanurzoną odkrytą warstwą mezofilu były inkubowane z rozwarze enzymów trawiących ściany komórkowe w 30°C przez godzinę przy 55rpm wytrząsania” ?

Str. 34. 4.1.6. „lodyga z kwiatami Arabidopsis” nie jest chyba legalnym terminem botanicznym...

4.1.6. Nasiona wysiewano na „szalki z pożywką ½ MuS z antybiotykami i kanamycyną jako czynnikiem selekcyjnym” Jakie to były antybiotyki i w jakim celu je stosowano?

4.2.1. W jakim celu stosowano glicerol w buforze CM1?

Str. 36. 4.3.2 „Po reakcjach katalizowanych przez topoizomerazę i klonazę LR transformowano bakterie *E. coli* DH5α i wysiewano na pożywkę stałą z antybiotykiem w celu wyselekcjonowania klonów pozytywnych.” Czym transformowano bakterie?

Str. 37 4.3.4 Podpis do tabeli 1: „...w celu zgenotypowania...” brzmi naprawdę źle.

Matryca: zamiast „malutki fragment liścia” lepiej byłoby podać orientacyjne wymiary tego fragmentu,

4.3.7 należałoby dopisać, że zestaw do izolacji stosowano zgodnie z instrukcją producenta
4.3.8 zamiast „próby DNA” raczej „plazmidy z wklonowanymi sekwencjami”

4.4.1 „Do rozdzielania białek w warunkach denaturujących białka denaturowano w buforze SB oraz w wysokiej temperaturze 95°C przez 5 minut. Rozdział przeprowadzano...” – 1) skąd te białka do denaturacji się brały? 2) Czy próbki po denaturacji nie odwirowywano?

Str. 38. 4.4.4. W jaki sposób mierzono stężenie białka w protoplastach? W jakich warunkach odwirowywano? Tak jak w przypadku liści? Ponadto, nie wszyscy muszą wiedzieć co to jest alikwot.

Str. 39. 4.4.5. Jeśli rozdzielanie przeprowadzano dzień po wylaniu żelu należałoby napisać w jakich warunkach przechowywano ten żel.

Str. 41. 4.4.10. Co to znaczy, że białka zostały „przyrównane do bazy TAIR” ?

Str. 43. Fragment opisu metody FRET-FLIM zamieszczony w 9 liniach od góry strony jest niekompletny i niezrozumiały.

Wyniki

Str. 48 Rys. 9. W opisie ryciny lepiej byłoby najpierw podać informację co widzimy a potem interpretację. Odwrotna kolejność utrudnia zrozumienie całości.

Nie jestem pewna o co chodzi autorowi w ostatnim zdaniu: „ Mogłoby to być uzasadnione zarówno wysokim poziomem ekspresji APP:GFP, z którym komórka może sobie radzić przez proteolizę nadekspresowanego białka, jak i heterologicznym charakterem APP:GFP. ”

Str. 49. powinno być: przeciwciała skierowane przeciw GFP, a nie „na GFP”

Czy wykonano kontrolę, blot zrobiony z nietransformowanych protoplastów, by pokazać, że przeciwciała skierowane przeciwko GFP są w tym układzie doświadczalnym specyficzne?

Str. 50. 5.1.2. Znów „otrzymano sekwencje kodujące”: otrzymano je pewnie w jakimś wektorze i dobrze byłoby to napisać.

Oprócz peptydu C100 w tytule podrozdziału powinna się znaleźć nikastryna, o której ten podrozdział także traktuje.

5.2.2. Środkowy akapit na stronie 55 jest niezrozumiały.

Str. 61. 5.2.4.2. „Kompleksy białkowe tworzone przez Ps1:GFP osiągają w znacznej mierze w okolicach 1 MDa, a także jeszcze większe.” (?)

5.3.5. Tekst dotyczący ekspresji NAC016:RFP (środkowy akapit na Str. 85.) jest niejasny, prawdopodobnie ze względów stylistycznych.

Str. 86. W opisie Rys. 46. pomyłono dwa odnośniki do skanów składowych.

Str. 99. 5.3.5.4. „Hodowlę prowadzono przy braku dostępnego światła...”, to znaczy w ciemności?

Rys. 60: Czy przeprowadzono doświadczenie kontrolne bez dodatku 6-aminopuryny? Czy można wykluczyć, że pomiędzy siewkami dzikiego typu i mutanta *ps1/ps2* wystąpiły różnice rozwojowe, które zlikwidował dodatek cytokininy?

Dyskusja

6.1. Str. 106. „Zarówno wśród białek wyłowionych podczas TAP-tagging, jak i w rezultacie koimmunoprecypitacji, nie zidentyfikowano białek...” – prostsza byłaby konstrukcja: Ani...ani.

Str. 107. „Stąd też, nadekspresja PEN-2 bez jednoczesnej nadekspresji Ps1/2, APH-1 oraz Nct, może uniemożliwiać składanie kompleksu ze względu na niedobór podjednostek związanych z początkowymi etapami formowania się kompleksu.” – to rozumowanie nie wydaje się logiczne.

6.2. Str. 109. „Nie stało się to natomiast przesłanką do dowiedzenia występowania aktywnej γ -sekretazy.” – niezgrabne.

Str.110. „U zwierząt intensywnie badany jest związek pomiędzy presenilinami a homeostazą Ca^{2+} , możliwe więc, że u roślin preseniliny mogą mieć związek z homeostazą Cu^{2+} – to zdanie jest z całą pewnością nielogiczne.

Podsumowanie

Powyższe uwagi krytyczne dotyczą przede wszystkim strony redakcyjnej przedstawionej mi do oceny pracy i nie zmieniają mojej ogólnej opinii o istotnej wartości poznawczej wyników otrzymanych przez jej autora. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Tomasza Skrzypczaka jest cennym osiągnięciem doktoranta, który wykonał trudną, pionierską pracę i zaprezentował szereg oryginalnych wyników, które można uznać za kamienie milowe na drodze do poznania funkcji białek wchodzących w skład kompleksu γ -sekreazy w komórkach roślinnych. Sposób zaplanowania doświadczeń i przeprowadzenia dowodów świadczy o tym, że autor potrafi rozwiązywać skomplikowane problemy badawcze. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na doskonałą znajomość tematu i umiejętność krytycznej oceny otrzymanych wyników. Szeroki wachlarz zastosowanych metod świadczy, że jest on wytrawnym, dobrze wyszkolonym eksperymentatorem.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Tomasza Skrzypczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabrys