

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr **Przemysław Jagodzika**
p.t. „**Aktywność opiekuńcza chloroplastowej proteazy ATDEG2**”

Prawidłowe działanie każdej komórki jest uwarunkowane procesem fałdowania białek, podczas którego na podstawie liniowej, genetycznie zdefiniowanej struktury pierwszorzędowej powstaje odpowiednia struktura przestrzenna białka, decydująca o jego funkcjonowaniu. Proces ten w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych odbywa się z udziałem potranslacyjnego systemu kontroli jakości białek, który tworzą białka opiekuńcze i proteazy. W wyniku ich działania zostaje ograniczona akumulacja nieprawidłowo zwiniętych białek w komórce. Niewłaściwe sfałdowanie białek, którego konsekwencją jest utrata ich funkcji biologicznej stanowi przyczynę wielu chorób człowieka, wśród nich chorób neurodegeneracyjnych. Nic więc dziwnego, że funkcjonowanie zwierzęcych białek opiekuńczych znajduje się w centrum uwagi wielu światowych laboratoriów. Ostatnio coraz więcej zainteresowania wzbudzają także roślinne białka opiekuńcze. Jednym z powodów jest uświadomienie ich roli w walce roślin ze stresami abiotycznymi i biotycznymi, które zaburzają homeostazę białkową. Utrzymanie białek w ich funkcjonalnej, natywnej konformacji oraz zapobieganie agregacji białek jest niezwykle ważne dla przeżycia rośliny w warunkach stresu. Dlatego temat wybrany przez Doktoranta uważam za bardzo aktualny i ważny, tym bardziej że dotyczy on aktywności opiekuńczej białka chloroplastowego. Wpisuje się on w tematykę Zakładu Fizjologii Roślin UAM kierowanego przez Prof. Grzegorza Jackowskiego.

Formalny opis rozprawy

Praca licząca 180 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Otwierają ją krótkie streszczenia w języku polskim i angielskim. Obszerna, czterdziestokilkustronicowa część wstępna poświęcona jest przede wszystkim opisowi budowy, mechanizmów działania i funkcji białek opiekuńczych, ze szczególnym uwzględnieniem białek opiekuńczych funkcjonujących w chloroplastach *Arabidopsis thaliana*. Ponadto, w niewielkim, dwustronicowym podrozdziale omówiono przebieg ontogenezy *A. thaliana* z podziałem na fazy według skali BBCH.

Cel pracy został najpierw sformułowany w sposób ogólny, a następnie skonkretyzowany w postaci trzech celów szczegółowych, nazwanych przez pana Jagodzika zadaniami badawczymi.

41 stron zajmuje część metodyczna zawierająca informacje na temat uzyskiwania i traktowania materiału roślinnego oraz szczegółowy opis zastosowanych technik badawczych.

Podobną objętość ma rozdział zawierający opis i analizę uzyskanych wyników, który liczy 37 stron. Został on podzielony na trzy podrozdziały w których przedstawiono wyniki otrzymane w ramach kolejnych zadań badawczych. Wyniki te przedyskutował Autor zwięźle w krótszym, dwunastostrońnicowym rozdziale, uzupełnionym o podsumowanie wyników i wnioski. Spis cytowanej literatury liczy ponad 220 pozycji.

W dysertacji brak wykazu stosowanych skrótów, który byłby bardzo użyteczny dla czytelnika nie w pełni obeznanego z dyskutowanymi zagadnieniami.

Ocena merytoryczna

Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do eksperymentalnej części rozprawy. Została w nim przedstawiona ogólna charakterystyka białek opiekuńczych, z uwzględnieniem ich klasyfikacji, budowy, mechanizmów działania i funkcji. Osobny podrozdział poświęcił Autor chloroplastowym białkom opiekuńczym. Ta część wstępu zilustrowana jest 22 doskonałymi rycinami przedstawiającymi schematy budowy omawianych białek i mechanizmów ich działania. Uważam, że ta część pracy pana Jagodzika powinna zostać opublikowana w postaci artykułu przeglądowego np. w *Postęпах Biochemii*, co pozwoliłoby wypełnić lukę w polskojęzycznej literaturze ważnego tematu. Wstęp kończy podrozdział przedstawiający przebieg ontogenezy *A. thaliana*, zgodnie ze skalą BBCH dostosowaną do tego gatunku.

Przedstawione do oceny badania miały trojaki cel: po pierwsze, wskazanie w strukturze pierwszorzędowej AtDeg2 domeny odpowiedzialnej za aktywność opiekuńczą tego białka *in vitro*, po wtóre, identyfikację fizjologicznych substratów dla aktywności opiekuńczej AtDeg2 *in vivo* u roślin hodowanych w silnym świetle, po trzecie, utworzenie katalogu cech fenotypowych *A. thaliana*, których kształtowanie współreguluje AtDeg2 działając tylko jako białko opiekuńcze lub realizując jednocześnie obydwie swoje funkcje: opiekuńczą i proteazową. Równocześnie z celami Autor przedstawił koncepcję realizacji eksperymentalnej każdego z nich, co należy odnotować z uznaniem. Jest to bowiem zabieg bardzo pożyteczny, ustawiający każdy etap pracy we właściwej perspektywie i ułatwiający zrozumienie intencji badacza. Natomiast niezbyt oryginalne wydaje mi się sformułowanie celu strategicznego badań jako „znaczące rozszerzenie wiedzy na temat aktywności opiekuńczej AtDeg2”, trudno bowiem oczekiwać aby badania zwężały (czy zawężały?) wiedzę na dowolny temat.

Dla realizacji pierwszego celu wytworzono sześć rekombinowanych wersji białka AtDeg2 i porównano ich aktywność opiekuńczą w warunkach *in vitro*. Były to: wersja dzika AtDeg2, białko z seryną w miejscu katalitycznym zamienioną na resztę glicyny (AtDeg2 S268G), z delecją domeny proteazowej (AtDeg2 Δ P) oraz z delecjami domen PDZ1, PDZ2 lub obu domen PDZ (AtDeg2 Δ PDZ1, AtDeg2 Δ PDZ2 i AtDeg2 Δ (PDZ1+PDZ2) odpowiednio).

Drugi cel został zrealizowany poprzez analizę porównawczą rozdziałów uzyskanych w dwukierunkowej elektroforezie białek wyizolowanych z chloroplastów roślin hodowanych w silnym świetle. Porównywano rozdziały białek z dzikiego typu i z roślin transgeniczných, w których białko AtDeg2 ma tylko aktywność opiekuńczą.

Celem trzecim było utworzenie katalogu cech fenotypowych *A. thaliana*, na których powstawanie ma wpływ AtDeg2 przez swoją aktywność opiekuńczą lub opiekuńczą i proteolityczną jednocześnie. Cel ten został zrealizowany przez wykonanie porównawczej analizy fenotypowej roślin czterech genotypów różniących się zakresem aktywności AtDeg2. Po wstępnej analizie

fenotypowej obejmującej rośliny dzikiego typu i mutanty *deg2-3* utworzono katalog cech powstających z udziałem obu typów aktywności AtDeg2. Wytypowano cechy, którymi różnią się w sposób istotny statystycznie rośliny dzikiego typu i mutanty *deg2-3*. W następnym kroku porównano wszystkie cztery genotypy uwzględniając tylko cechy zidentyfikowane podczas analizy wstępnej i utworzono podkatalogi cech fenotypowych odzwierciedlających aktywność opiekuńczą AtDeg2 oraz obie aktywności jednocześnie.

Program badań przedstawionych w rozprawie cechuje oryginalne podejście i logiczne rozwijanie założonych wątków eksperymentalnych. Na podkreślenie zasługuje konsekwentne stosowanie skali BBCH na wszystkich etapach planowania doświadczeń.

Do realizacji programu eksperymentalnego Autor wykorzystał szeroką gamę różnorodnych technik eksperymentalnych. Posługiwał się nie tylko metodami właściwymi dla biochemii i biologii molekularnej, m. in. technikami izolacji kwasów nukleinowych, izolacji i oczyszczania białek, elektroforezy oraz ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych i białek, produkcji białek rekombinowanych, oznaczania aktywności białek, transformacji materiału biologicznego, ale także technikami izolacji protoplastów i chloroplastów, lizy i frakcjonowania chloroplastów, mikroskopii konfokalnej i skaningowej mikroskopii elektronowej, ponadto technikami fenotypowania roślin.

Autor uzyskał szereg oryginalnych i ważnych wyników. Badając związki między budową a funkcjami AtDeg2 wykazał, że (i) białko to wykazuje dwa typy aktywności opiekuńczej: holdazy i dezagregazy, (ii) reszta seryny w miejscu katalitycznym nie jest istotna dla żadnej z tych dwóch aktywności natomiast (iii) pewną rolę w kształtowaniu się obu typów aktywności opiekuńczej AtDeg2 odgrywa domena proteazowa, (iiii) obie domeny PDZ są niezbędne dla obu typów aktywności AtDeg2. Na nowatorstwo otrzymanych wyników wskazuje fakt, że aktywność holdazową AtDeg2 proponowano poprzednio tylko w jednym doniesieniu zaś aktywność dezagregazy została wykryta po raz pierwszy.

Na podstawie porównawczej elektroforezy diagonalnej, jako substrat AtDeg2 zidentyfikował Autor podjednostkę γ 1 chloroplastowej syntazy ATP. Według jego interpretacji, w silnym świetle, w chloroplastach roślin transgenicznych *35S::AtDEG2APDZ1-GFP*, w których AtDeg2 nie ma aktywności holdazowej podjednostki te, zagregowane z powodu utworzenia mostków dwusiarczkowych gromadziły się w kilkakrotnie większej ilości niż w chloroplastach roślin dzikiego typu. W tych ostatnich, AtDeg2 dzięki swojej aktywności holdazy zapobiegała powstawaniu agregatów.

Interesujące wyniki przyniosła także analiza fenotypowa roślin *A.thaliana* hodowanych w warunkach bezstresowych. Okazało się, że AtDeg2 dzięki swojej aktywności opiekuńczej uczestniczy w regulacji szerokości nasion, natomiast dzięki aktywności opiekuńczej i proteolitycznej jednocześnie uczestniczy w regulacji momentu rozprostowania się liścieni, liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach oraz w regulacji długości nasion. Są to pierwsze w historii badań nad AtDeg2 wyniki wskazujące, że dzięki aktywności holdazy/dezagregazy, w połączeniu z aktywnością proteazową lub niezależnie od niej, białko to jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu ontogenezy *A. thaliana*.

Otrzymane wyniki są rzetelnie udokumentowane w postaci czytelnych i dobrze opisanych wykresów i diagramów, eleganckich zdjęć żeli, zdjęć z mikroskopu konfokalnego i tabel.

W krótkiej ale rzeczowej dyskusji Autor zanalizował je na tle danych literaturowych. Niemal dokładnie połowa z cytowanych w pracy 220 pozycji literatury została opublikowana w ciągu ostatniej dekady, co z jednej strony dobitnie świadczy o aktualności badanych zagadnień, z drugiej zaś - o dobrej znajomości dziedziny wiedzy objętej pracą. Wnioski wyciągane są ostrożnie i mają solidne oparcie w faktach doświadczalnych. Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki są oryginalne i jednocześnie wytyczają nowe ścieżki w badaniach nad funkcjonowaniem białek opiekuńczych.

Do niewątpliwych zalet rozprawy należy klarowność przekazu i umiejętne wsparcie tekstu schematami ideowymi przeprowadzonych eksperymentów.

Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne

Lektura pracy nasunęła mi kilka pytań:

- 1) Dlaczego do badań wybrano światło o natężeniu $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a przede wszystkim jaki był jego skład spektralny? Źródło światła nie zostało w pracy zdefiniowane, a ponieważ nie jest to światło bardzo silne jego działanie stresowe może zależeć od składu spektralnego.
- 2) Czy wyniki uzyskane z użyciem modelu doświadczalnego wybranego do analizy holdazowej aktywności opiekuńczej rekombinowanych linii AtDeg2 (lizozym ulegający denaturacji i agregacji w obecności DTT) można stosować do większych białek? Lizozym jest dość specyficznym białkiem, ulegającym odwracalnej denaturacji.
- 3) Stosując elektroforezę dwukierunkową zidentyfikowano jeden substrat holdazowej aktywności opiekuńczej badanego białka – podjednostkę $\gamma 1$ kompleksu F1 tylakoidowej syntazy ATP. Czy zastosowanie silniejszego światła stresującego mogłoby doprowadzić do identyfikacji większej liczby substratów?
- 4) Fenotypowanie przeprowadzono dla roślin hodowanych w świetle o średnim natężeniu, które Autor nazywa komfortowym. Czy rzeczywiście należy się spodziewać wystąpienia w takich warunkach istotnych różnic fenotypowych pomiędzy roślinami dzikiego typu a mutantami DEG2? Czy nie należało raczej przeprowadzić fenotypowania roślin hodowanych w silnym świetle?

Pozostałe uwagi

Pomimo sporej objętości i podania wielu szczegółów zdecydowanie najwięcej poprawek wymagałby rozdział *Materiały i metody*. Co do zasady, opis metodyki powinien być tak sporządzony aby dało się bez trudu powtórzyć opisywane doświadczenia. Tymczasem pod tym względem tekst pozostawia sporo do życzenia.

W kilku miejscach brakuje precyzyjnych informacji ilościowych, np. stosunku molowego wektora do wstawki (str. 76), stężeń lub stosunków molowych w mieszaninie reakcyjnej (str. 77, 78), stężeń antybiotyków – na str. 80 powinien się znaleźć odsyłacz do punktu 5.3.4, liczby przesianych kolonii (str. 80), maksymalnej objętości roztworu zawierającego wektor ekspresyjny (str.82), stężenia „odpowiedniej wersji białka AtDeg2” (str. 93), liczby roślin

użytych do analizy morfologicznej liści, czasu aklimatyzacji liścia w komorze (str. 95) itp. W jakich warunkach (temperaturach) zamrażano i rozmrażano zawiesinę bakteryjną (str. 83) ? Do czego odnosi się stężenie CO_2 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (str. 96)?

Według mojej najlepszej wiedzy antybiotyk używany w badaniach to karbenicylina a nie karbenicyna.

Niektóre tłumaczenia sensu przeprowadzonych procedur lub ich fragmentów wymagają przemyślenia i doprecyzowania. Na przykład:

5.4.3.1. Czy zagotowanie istotnie skutkuje „izolacją DNA wektorów”? Identyfikację kolonii bakteryjnych, które pomyślnie przeszły procedurę transformacji przeprowadza się hodując bakterie na antybiotyku selekcyjnym. PCR z kolonii robi się natomiast aby potwierdzić, że zawierają wektor z pożądaną wstawką.

5.6.5.: Czy DpnI istotnie „tnie miejsca metylacji”? Czy wykonanie transformacji *E.coli* jest „ostatnim etapem mutagenazy ukierunkowanej”?

5.7.2.: „Podczas nadekspresji do białka dołączany jest znacznik histydynowy (sześć reszt histydynowych)....” Jedynie podczas nadekspresji? W jaki sposób dołączany jest ten znacznik?

5.7.7.: Czy wszystkie uzyskane konstrukty miały prawidłowe sekwencje?

5.8.1.: „Aby zwiększyć wydajność transformacji bakterie hodowano z wytrząsaniem (200 rpm, 1 h, 37°C) w 1 ml pożywki płynnej LB.” Czy hodowla bakterii prowadzona jest istotnie w celu zwiększenia wydajności transformacji?

„Obecność wprowadzonego wektora w poszczególnych koloniach bakteryjnych sprawdzano metodą PCR.” Na to wystarcza hodowla na podłożu z antybiotykiem... (patrz komentarz do 5.4.3.1)

5.10.1.: „Następnie próby schłodzono w lodzie, zwirowano (...) i nakładano na kieszonki...” Co nakładano do kieszonek, osad czy nadsącz?

Pogrupowaniu informacji w podrozdziałach powinno towarzyszyć obligatoryjne używanie odnośników, w przeciwnym przypadku dociekliwy czytelnik stale traci czas na szukanie szczegółów. Na przykład w tabeli 4. na str. 69 podano „1 pg-10 ng produktu syntezy chemicznej DNA” natomiast wyjaśnienie o jaki produkt chodzi można znaleźć dopiero w punkcie 5.6.4.; szczepu *A. tumefaciens* (str.80) trzeba szukać w punkcie 5.3.2, itp.

Ze względu na konsekwencje merytoryczne zalecam panu Jagodzikowi zwrócenie uwagi na tryb dokonany i niedokonany czasowników. Dobrym przykładem przypadkowego użycia trybów jest tekst w podrozdziale 5.2.1. Izolację protoplastów wykonano (jeden raz) ale do tego celu wykorzystywano (wiele razy) po 4-6 liści. Inne czasowniki to: zdjęto, przeplukano, zawieszono ale wirowano, zliczano, poddawano. Wobec tego mam dylemat: czy doświadczenie wykonano tylko raz czy procedurę powtarzano?

Uważam ponadto, że Autor powinien rozważyć zastąpienie poniższych wyrażenia innymi, bardziej powszechnie używanymi lub - po prostu - bardziej prawidłowymi:

bufor barwiony

warunki temperaturowo-czasowe
klon wejściowy, klony wejściowe – moim zdaniem Autor nadużywa pojęcia klon
wykonano reakcje PCR odwrotną transkryptazą
prążek reprezentujący białko

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca pana Jagodzika, poza skomentowanym już układem rozdziału *Materiały i metody*, ma przejrzystą strukturę i jest ogólnie przyjazna dla czytelnika. Na podkreślenie zasługuje staranna strona graficzna, prawidłowy dobór, precyzyjny opis i dobra jakość materiału ilustracyjnego. Niektóre niedociągnięcia stylistyczne skomentowałam już powyżej, pozostałe nie utrudniają nadmiernie lektury tekstu. Autor nie ustrzegł się od tzw. literówek ale nie jest ich zbyt wiele. Także użycie żargonu można uznać za dopuszczalne.

Podsumowanie

Powyższe uwagi krytyczne dotyczą przede wszystkim technicznej strony przedstawionej mi do oceny pracy i nie mają zasadniczego znaczenia dla jej wartości merytorycznej. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Przemysława Jagodzika jest cennym osiągnięciem Doktoranta, który wykonał trudną, pionierską pracę i przedstawił szereg oryginalnych wyników, które można uznać za kamienie milowe na drodze do poznania mechanizmów działania chloroplastowych białek opiekuńczych.

Sposób zaplanowania doświadczeń i przeprowadzenia dowodów świadczy o tym, że Autor potrafi rozwiązywać skomplikowane problemy badawcze. Szeroki wachlarz zastosowanych metod świadczy, że jest on także dobrze wyszkolonym eksperymentatorem. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na dogłębną znajomość tematu i umiejętność krytycznej oceny otrzymanych wyników.

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 Przemysława Jagodzika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabrys