



ul. Niezapominajek 21

30-239 Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej**mgr Beatrycze Nowickiej****pt. „Badania funkcji antyoksydacyjnych oraz szlaków biosyntezy chinonów prenylowych u roślin”**

Chinony prenylowe lub inaczej izoprenoidowe zaliczane są do substancji o charakterze lipidowym. Zatem, obok białek, cukrowców i kwasów nukleinowych stanowią jedną z podstawowych grup związków organicznych, które wchodzi w skład wszystkich organizmów żywych na Ziemi. Kluczową funkcją biologiczną, jaką pełnią te związki jest prawidłowy przebieg wielu reakcji oksydacyjno-redukcyjnych w komórce, zwłaszcza tych, związanych z przekazywaniem elektronów w mitochondrialnym i fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Ponadto, jako kofaktory, wchodzi w skład wielu enzymów, mogą też regulować ekspresję genów oraz pełnić funkcje antyoksydacyjne. Bez przesady można powiedzieć, że bez lipidów prenylowych życie na Ziemi byłoby niemożliwe. W związku z tym, nie dziwi fakt, że ta grupa biocząsteczek jest tak intensywnie badana. Szczególne znaczenie chinony prenylowe mają w prawidłowym przebiegu procesu fotosyntezy. Obok roli przenośnika elektronów, w zależnej od światła fazie fotosyntezy, pełnią również istotną funkcję antyoksydacyjną i odpowiedzialne są głównie za usuwanie reaktywnych form tlenu takich jak tlen singletowy i anionorodnik ponadtlenkowy. Zgodnie z panującym przekonaniem, lipidem izoprenoidowym o charakterze antyoksydacyjnym jest witamina E, czyli α - tokoferol, a ubichinon wraz z plastochinonem są kluczowymi przenośnikami elektronów w odpowiednio oddechowym i fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Autorka recenzowanej pracy doktorskiej podejmuje temat chinonów prenylowych w sposób „niekanoniczny”, wykazując np., że wspomniana witamina E, w pewnych warunkach nie jest substancją antyoksydacyjną, a plastochinon, obok swojej klasycznej funkcji przenośnika elektronów, może również pełnić rolę antyoksydanta.

Wobec powyższych faktów, w pełni uzasadniony wydaje się być wybór tematu badawczego pracy doktorskiej. W recenzowanej pracy, pani mgr Beatrycze Nowicka podjęła próbę możliwie szerokiej analizy funkcji antyoksydacyjnej wielu lipidów prenylowych, ze szczególnym uwzględnieniem tych syntetyzowanych przez organizmy przeprowadzające fotosyntezę oksygeniczną. Pod względem metodologicznym zastosowano dwa komplementarne podejścia. Jedno, to analiza właściwości antyoksydacyjnych w warunkach *in vitro*, w oparciu o zdefiniowane układy liposomowe. Natomiast drugie podejście koncentrowało się na roli lipidów prenylowych w układach *in vivo*, gdzie zawartość poszczególnych chinonów prenylowych była analizowana na poziomie całych organizmów, w tym przypadku rośliny wyższej *Arabidopsis thaliana* i zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. W tym układzie eksperymentalnym badano rolę prenylolipidów w odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe, głównie nadmiar światła i niską temperaturę oraz w procesie starzenia się. Co więcej, autorka przeprowadziła również badania dotyczące nieznanych aspektów związanych z zawartością i biosyntezą chinonów prenylowych u starych ewolucyjnie grup organizmów, przede wszystkim u sinic, ale także u drożdży i bakterii.

Recenzowana praca jest bardzo obszerna i liczy 164 strony. Posiada klasyczny układ ze streszczeniem (2 str.) i wstępem (36 str.), celami pracy (1 str.), rozdziałem dotyczącym materiałów i metod (22 str.), wynikami (45 str.), dyskusją z wnioskami (34 str.) oraz

bibliografią obejmującą aż 458 pozycji literaturowych. Praca, choć jej lektura wymaga znacznej uwagi ze względu na bardzo dużą ilość wyników, jest napisana w miarę jasno i interesująco. Niemniej jednak, w paru miejscach pojawiły się pewne nieścisłości, błędy czy braki w opisach wyników i ilustracji. W kontekście ilości przeprowadzonych analiz, proporcje długości poszczególnych części rozprawy, z najdłuższym rozdziałem dotyczącym wyników, są jak najbardziej uzasadnione.

Wstęp jest poprzedzony „Wykazem stosowanych skrótów”, „Streszczeniem” oraz „Spisem treści”. Zamieszczenie wykazu skrótów było jak najbardziej uzasadnione, bo w trakcie lektury można, w razie jakichś niejasności, skorzystać z wyjaśnień zawartych w tym rozdziale. Pewną niekonsekwencją autorki jest to, że nie wszystkie skróty użyte w tekście głównym pracy zostały zamieszczone w wykazie skrótów oraz, że nie podawano konsekwentnie anglojęzycznego źródłosłowa dla stosowanych skrótów, np. skrót PCD, oznaczający programowaną śmierć komórki, jest wyjaśniony przez angielskie „programmed cell death”, a większość innych skrótów, np. DW, JA, SOD, SA już nie. Streszczenie w jasny sposób wprowadza czytelnika w tematykę pracy, przedstawia najważniejsze wyniki oraz wnioski. Drobne uwagi do streszczenia: na str. 4. (wers 17) na końcu zdania powinno być dodane słowo „lipidów”, czyli pełne zdanie powinno brzmieć: „Wszystkie analizowane związki wykazywały znaczną zdolność hamowania peroksydacji lipidów”. Z kolei, w wersji 27 nie sprecyzowano w obecności jakiego kwasu obserwowano nieenzymatyczną reakcję utleniania α - tokoferolu. Jedyna drobna uwaga dotycząca „Spisu treści”: pełnych nazw gatunkowych używa się w tekście tylko za pierwszym razem, dlatego późniejsze użycie takiej nazwy może być skrócone, np. zamiast powtarzania za każdym razem pełnej nazwy *Arabidopsis thaliana*, wystarczy stosować wersję skróconą *A. thaliana*.

Wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące chemizmu lipidów prenylowych, ich występowania, biosyntezy i funkcji w organizmach żywych. Warto podkreślić, że doktorantka opisuje te związki nie tylko u organizmów eukariotycznych, ale również przedstawia szerokie spojrzenie ewolucyjne, zwracając uwagę na ich rolę u prokariotów. Po omówieniu lipidów prenylowych, w drugiej obszernej części wstępu, opisywane są reaktywne formy tlenu (ROS): ich klasyfikacja, miejsca powstawania w komórce roślinnej, efekty toksyczne wywierane na składniki komórki, czy udział ROS w odpowiedzi roślin na działanie wybranych czynników stresowych. W tej części autorka prezentuje też antyoksydacyjne mechanizmy obronne komórki roślinnej i podkreśla ochronną rolę lipidów prenylowych w tych procesach. Niemniej jednak, do „Wstępu” mam też pewne uwagi krytyczne, zarówno natury językowej jak i merytorycznej. Ważniejsze z nich wymieniam poniżej:

- str. 13, wers 24: zamiast: „popularny u *Rhodospirillaceae*” lepszym określeniem byłoby: „rozpowszechniony u *Rhodospirillaceae*”,
- str. 18, wers 33: zdanie powinno być zakończone informacją o adaptacji metabolizmu *Thermoplasma acidophilum* do zawartości tlenu w otoczeniu,
- str. 19, nie wyjaśniono w opisie rys. 4, co oznacza kolor brązowy (?),
- str. 20, wers 15: na końcu zdania powinna być zacytowana literatura,
- str. 22, wers 4: zdanie, które kończy się słowami „pomiędzy enzymami łańcucha [103]”, wygląda na niedokończone, jego zakończenie powinno brzmieć: „pomiędzy enzymami mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów [103]”.
- str. 22, wers 32- 35: używane są skróty: ArcB, RegB, BvgS bez wyjaśnienia, zarówno we „Wstępie”, jak i w rozdziale „Wykaz stosowanych skrótów”,
- str. 25, wers 7: właściwszą formą jest „geny peroksydazy askorbinianowej”, a nie „geny peroksydazy askorbinianu”,
- str. 27, wers 3: w zdaniu brakuje słów „jej rola”. Powinno ono brzmieć: „W komórkach zwierzęcych najlepiej poznaną funkcją witaminy E jest **jej rola** antyutleniająca”.

- str. 29, wers 12: w zdaniu brakuje informacji o tym gdzie nadekspresja genu HPPD doprowadziła do wzrostu zawartości tokoferolu,
 - str. 30, wers 26: brak wyjaśnienia skrótu RNS, który oznacza reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species), zarówno we „Wstępie”, jak i w rozdziale „Wykaz stosowanych skrótów”,
 - str. 31, wers 3-4 i dalej: nazwy mutantów *Arabidopsis*: *vte2* i *vte1* powinny być rozwinięte. Na tej samej stronie skrót nazwy innego mutantu: *sdx1* został wyjaśniony. Warto zachować pewną konsekwencję i podawać źródłosłów takich skrótów. Co prawda, schemat biosyntezy tokoferoli ze str. 29 pokazuje, o jakie geny i enzymy chodzi, ale dla jasności opisywanych procesów warto taką informację powtórzyć dwie strony dalej. Tym bardziej, że np. skrót *vte1*, dotyczący mutantu ze zredukowaną ekspresją genu cyklicznej tokoferoli, ma źródłosłów niezwiązany z cykliczną tokoferolą tylko oznacza, z j. angielskiego, mutantu *vitamin E1* (*vte1*).
 - str. 34, wers 29: powinno być „kationu wodorowego”, a nie „kationu wodoru”,
 - str. 35, wers 22: zdanie dotyczące reaktywnych form tlenu (ROS) powinno być zmienione na: „Podstawowe ROS wraz z reakcjami [...] przedstawiono na Rys. 8”, albowiem cytowany rysunek nie przedstawia wszystkich możliwych ROS, które powstają w komórce,
 - str. 38, wers 5: w zdaniu o oksydacji NADPH brak ścisłej informacji, że chodzi o jej lokalizację w błonie komórkowej,
 - str. 42, Tabela 3: 1) brak informacji o występowaniu dysmutazy ponadtlenkowej także w apoplazmie, 2) byłbym ostrożny w umieszczaniu wzmianki, dotyczącej występowania katalazy w chloroplastach. Co prawda, informacja ta jest cytowana za pracą przeglądową Asady z 2006 r. (Plant Physiol. 141: 391), ale autor wspomnianej przeglądownki opiera się tylko na jednej pracy, według której katalaza występuje w chloroplastach jako enzym powiązany z fotosystemem II (PSII). W późniejszych latach nie ukazały się żadne inne publikacje potwierdzające taką lokalizację tego enzymu, 3) w opisie tabeli powinno być podane źródło, z którego zaczerpnięto informacje nt. ilości genów kodujących poszczególne enzymy antyoksydacyjne w *A. thaliana*,
 - str. 42, wers 3: rubredoksyna nie jest reduktazą ponadtlenkową (SOR) tylko białkiem żelazo-siarkowym, które uczestniczy w reakcji przeprowadzanej przez SOR. Ponadto, neelaredoksyna to inne, synonimiczne określenie reduktazy ponadtlenkowej, zidentyfikowanej u pewnych bakterii, a nie inny enzym.
- Przy opisie występowania poszczególnych form SOD brakuje informacji, że Cu/ZnSOD może również występować w apoplazmie (przykładowe prace: Streller i Wingsle 1994, Planta 192: 195; Karpińska i wsp. 2001, Plant Physiol. 126: 1668).
- str. 43, rysunek 10 (Rys. 10) jest nieściśły i nie przedstawia *de facto* cyklu woda-woda tylko zmodyfikowany cykl askorbinianowo-glutationowy, który zachodzi w chloroplastach. Schemat cyklu woda-woda powinien przede wszystkim uwzględniać PSII z zaznaczonym rozkładem wody na tlen i jony wodorowe oraz PSI, który uczestniczy w generowaniu z tlenu anionorodnika ponadtlenkowego. Anionorodnik ten po dysmutacji przez SOD, jako produkt daje m. in. nadtlenek wodoru, który z kolei rozkładany jest, przez peroksydazę askorbinianową, do monodehydroaskorbinianu i wody. Ponadto, cyklowi woda-woda nie przypisuje się nazewnictwa od nazwiska czy nazwisk odkrywców, choć cykl ten opisany został po raz pierwszy przez Kozi Asadę (Asada 1999, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601). Z kolei, w przypadku cyklu askorbinianowo-glutationowego, jego inna prawidłowa nazwa, pochodząca od nazwisk odkrywców, to cykl Foyer-Halliwella-Asady,
 - str. 44, wers 12: słowo „Zlokalizowana” jest niepotrzebne,
 - wers 28: w literaturze polskojęzycznej na angielskie określenie „hypersensitive response (HR)”, używa się zazwyczaj określenia „reakcja nadwrażliwości”, a nie „odpowiedź nadwrażliwa”,

- str. 44-45: używane są skróty np.: ABA, Lea, ANP1, MEKK1, AtMPK3, MAPKKK, LSD1, WRKY bez wyjaśnienia, zarówno we „Wstępie”, jak i w rozdziale „Wykaz stosowanych skrótów”.

Najkrótszy rozdział rozprawy (1 strona), czyli „Cele pracy”, zawiera dziewięć szczegółowych zagadnień, którymi doktorantka zajęła się w trakcie swoich badań nad chinonami prenylowymi u roślin. Podstawowym mankamentem tego rozdziału jest to, że cele badawcze zostały sformułowane w sposób nazbyt ogólny. Przedstawienie większości z nich w formie zdań oznajmujących typu: „badanie czegoś” nie spełnia kryterium jasno sformułowanej hipotezy badawczej. Większość celów można było sformułować w postaci, hipotez roboczych, przedstawionych w formie zdań oznajmujących lub pytających. Przykładowo, cel pierwszy: „Badanie udziału lipidów prenylowych w hamowaniu peroksydacji lipidów wywoływanej przez tlen singletowy, generowany w układzie liposomowym”, można było sformułować, jako hipotezę:

- 1) w postaci zdania oznajmującego, czyli: „Lipidy prenyłowe hamują peroksydację lipidów wywołaną przez tlen singletowy, generowany w układzie liposomowym” lub
- 2) w postaci zdania pytającego, czyli: „Czy lipidy prenyłowe hamują peroksydację lipidów wywołaną przez tlen singletowy, generowany w układzie liposomowym?”

De facto, w przedstawionej dysertacji, doktorantka szukała odpowiedzi na pytania o charakterze hipotez badawczych i z powodzeniem uzyskała na nie konkretne odpowiedzi.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej, czyli „Materiały i Metody” zawiera bardzo szczegółowy opis użytych: odczynników chemicznych, szczepów mikroorganizmów, czy urządzeń badawczych. Ponadto, doktorantka bardzo skrupulatnie opisała przebieg poszczególnych analiz i doświadczeń, co sprawia, że zainteresowany czytelnik nie powinien mieć większych problemów np. z powtórzeniem opisanych eksperymentów i ich wykorzystaniem we własnej pracy badawczej. Warto też podkreślić, że część odczynników niezbędnych do doświadczeń: znakowany węglem ^{14}C homogentyzynian (^{14}C -HGA) i *p*-hydroksybenzoesan (^{14}C -HBA), autorka pracy syntetyzowała samodzielnie. Niemniej jednak, do tego rozdziału też można mieć parę uwag krytycznych. Najistotniejsze z nich wymieniono poniżej:

- w całym rozdziale oraz w dalszych częściach pracy natężenie światła wyrażane jest w postaci „mikrosteinów”: $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, choć powszechnie używaną notacją tej jednostki są mikromole kwantów światła, które padają na jednostkę powierzchni w ciągu 1 sekundy, czyli $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

- str. 47: brak rozwinięcia skrótów odczynników buforujących: Tricine i HEPES,

- str. 48: bardzo szczegółowo wymienione są wszystkie odczynniki i materiały specjalne w związku z czym konsekwentnie autorka powinna umieścić informację nt. płynu żwaczowego, w którym prowadzono kulturę *Butyrivibrio fibrisolvens*,

- str. 49: urządzenie do pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* z PSII, czyli PAM-101, to fluorometr, a nie spektrofluorometr,

- str. 51, wers 7: powinno być „porfiryne”, a nie „porfine”,

- str. 53-54, i odpowiednio wers 26 i 15: może zamiast słowa „wytrząsano”, powinno być „wytrząsano” (?),

- str. 57, wers 15: po przecinkach oddzielających liczby oznaczające tygodnie, w których pobierano materiał, powinny być spacje,

- str. 57, 59, 60: oprócz wzorów do obliczeń zawartości barwników fotosyntetycznych w badanym materiale, powinny być podane jednostki, w jakich te zawartości były wyrażane,

- str. 60: w tytule podrozdziału powinno być zaznaczone, że chodzi o wygaszanie fluorescencji chlorofilu *a*, a nie fluorescencji pochodzącej po prostu z chlorofilu, bo może to sugerować, że chodzi o chlorofil całkowity. Fluorometry, w tym fluorometr typu PAM 101, mierzą fluorescencję, która w ponad 90% pochodzi z chlorofilu *a* z PSII,

- str. 62, wers 21: zdanie niedokończone, tzn. nie jest jasne, co ekstrahowano z komórek. Można się domyślać, że chodzi o konkretne lipidy prenylowe, ale powinny one być wymienione,
- str. 65, wers 16: podobnie jak na str. 62, nie jest jasne, co ekstrahowano z liofilizatu,
- str. 66, wers 17: powinno być: „w homogenizatorze”, a nie „w homogenizerze”.

Kolejnym, najobszerniejszym rozdziałem rozprawy doktorskiej pani mgr Beatrycze Nowickiej są „Wyniki”. Poszczególne rezultaty przedstawiono w kolejności zgodnej z prezentacją zagadnień badawczych w rozdz. „Cele pracy”. Rozdział obejmuje 45 stron, 40 rysunków i 8 tabel. Jest napisany dość przejrzystie, zawiera odpowiednie zwięzłe komentarze do uzyskanych wyników, bez zbędnych spekulacji. Ilustracje są przygotowane starannie i czytelnie, posiadają adekwatne opisy, które, w większości przypadków, pozwalają zrozumieć przedstawione rezultaty doświadczeń bez odnoszenia się do tekstu głównego. Zdecydowana większość eksperymentów została wykonana na wystarczającej próbie statystycznej, choć na rys.: 13, 21, 39, 40 i 41 nie ma zaznaczonego słupka błędu, tzn. odchylenia standardowego (SD) lub błędu standardowego (SE). Ponadto, w opisie tych rysunków brakuje informacji o liczbie powtórzeń (n). Można stąd wnosić, że ilość powtórzeń była mniejsza od 3-ech. Niemniej jednak, ilość powtórzeń, nawet, jeśli był to pojedynczy pomiar lub dwa niezależne pomiary, powinna być wskazana w opisie ww. rysunków, tak jak to zrobiono w przypadku rys.: 15, 16, 17, 18 i 19. Poza tym, w przypadku wymienionych w poprzednim zdaniu rysunków, dyskusyjna jest sensowność wyliczania błędu standardowego (SE) przy $n = 2$. W kwestii statystyki mogę mieć tylko sugestię, że jeśli zaprezentowane wyniki będą przygotowywane w formie manuskryptu do publikacji, to liczba powtórzeń powinna być większa, to znaczy, co najmniej 3 lub więcej. Dodatkowo, wskazane byłoby przeprowadzenie odpowiednich testów statystycznych, które w sposób jeszcze bardziej jednoznaczny wskazywałyby na istotność statystyczną różnic pomiędzy wyliczonymi, na podstawie pomiarów, średnimi arytmetycznymi. Do najważniejszych drobnych błędów i nieścisłości, które znalazłem w rozdziale „Wyniki”, zaliczyłbym:

- str. 70, rys. 11: stężenie wodoronadtlenków lipidów było mierzone po czasie naświetlania: 0, 0.5, 1 i 2 godz., natomiast ostatni punkt pomiarowy ubytku chromanoli, chinoli i chinonów prenylowych stanowiło 1.5, a nie 2 godz., jak w przypadku pomiaru zawartości wodoronadtlenków lipidów. Skąd ta różnica?
- str. 74, wers 18: warto ściśle zaznaczyć, że czynnikiem zakwaszającym był, obok askorbinianu, także kwas nieorganiczny, czyli HCl,
- rys. 21, 22 i 23: w opisie rysunków powinien być podany czas naświetlania. Co prawda, jest on opisany w rozdz. „Materiały i metody” na str. 55-56, ale można było tę informację zamieścić także pod ww. rysunkami,
- str. 83, wers 6: dla jasności opisu powinno być podane natężenie światła w jakim hodowane były rośliny poddane stresowi chłodowemu oraz temperatura hodowli dla roślin kontrolnych. Co ciekawe, podane są wartości natężenia światła dla roślin kontrolnych, bez informacji o temperaturze oraz temperatura dla serii roślin poddanych stresowi chłodowemu, ale już bez informacji o natężeniu światła. Wyszukiwanie za każdym razem tych informacji w rozdz. „Materiały i metody” utrudnia swobodne śledzenie toku rozprawy doktorskiej. Ewentualnie, można było w nawiasie odnieść się do rozdz. „Materiały i metody” z podaniem stron, na których te informacje się znajdują.
- str. 85: w tabeli 4 powinno być umieszczone natężenie światła tam, gdzie są wymienione rośliny kontrolne (kontrola) oraz rośliny poddawane przez 14 dni stresowi chłodowemu; w tabeli 5 powinna także być umieszczona – dla porównania – zawartość prekursora tokoferoli w dzikim typie *A. thaliana*,
- str. 86, rys. 26B: brak w opisie rysunku informacji o natężeniu światła dla kontroli oraz dla roślin poddanych działaniu stresu chłodowego,

- str. 87: właściwą formą są „antocyjany”, a nie „antocjany”,
- str. 92, tabela 6: brak w opisie tabeli informacji nt. wieku roślin, w których badano zawartość lipidów prenylowych oraz warunków hodowli,
- str. 99, w tabeli 7 powinno być w sposób jednoznaczny podane, które próbki były naświetlane i jak długo,
- str. 104, w tabeli 9 brakuje informacji, że kultury bakterii, do których dodawano kwasu linolenowego również były hodowane przez 20 h.

Wszystkie rysunki przedstawiające chromatogramy nie mają wyskalowanych osi Y (absorbancja lub fluorescencja) oraz w ich opisie brakuje jednostek. Do części wyników, która dotyczy analizy bioinformatycznej, mam uwagę szczegółową: wartość statystyczną dopasowania, po przyrównaniu sekwencji zapytania, czyli kwerendy do każdej sekwencji znalezionej w bazie danych przez program BLAST, opisuje tzw. wartość E, czyli wartość oczekiwana (ang. expectation value, E-value), której symbol powinien być pisany z dużej litery. Parametr ten doktorantka słusznie wykorzystuje we wnioskowaniu pozwalającym stwierdzić, które ze znalezionych sekwencji aminokwasowych można uznać za homologiczne, a które nie. Kryteria graniczne, wg których przyjmuje się, że dane sekwencje są homologiczne, tzn. zarówno maksymalną wartość parametru E oraz procent identyczności badanych sekwencji aminokwasowych, można było zamieścić w rozdz. „Materiały i metody”.

Dyskusja wyników wraz z podsumowaniem zajmuje 34 strony i jest starannie, wnikliwie i krytycznie przedstawioną konfrontacją wyników własnych z bogatą literaturą przedmiotu, a zaprezentowane wnioski odpowiadają wcześniej założonym celom badawczym. Podstawowe uwagi jakie mam do tej części pracy, to używanie sformułowania „w obecnej pracy” (np. na str. 116), choć lepszym określeniem byłoby „w niniejszej pracy”. Ponadto, nie jest jasne, dlaczego na str. 123 tak wnikliwie przedstawiono dane kinetyczne, takie jak stałe szybkości reakcji zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego przez wybrane prenylolipidy, choć przecież przedmiotem dociekań nie było wyznaczanie tych stałych dla badanych prenylolipidów.

Rozdział z **wnioskami** jest napisany jasno, a wyciągnięte wnioski nie zawierają zbędnych spekulacji. We wniosku trzecim podkreśliłbym, że odtwarzanie α -Toc z 8 α -hydroksyperoksy- α -tokoferonu (α -TOOH), obserwowano szczególnie wyraźnie w liposomach zbudowanych z lipidów chloroplastowych, w porównaniu do liposomów lecytynowych. Ponadto, we wniosku czwartym lepszym sformułowaniem byłoby: **większość** badanych lipidów prenylowych obniżała konsumpcję tlenu w układzie liposomowym z PSI, a nie **wszystkie** – tak jak to zostało napisane, ponieważ w liposomach z wbudowanym PSI z tytoniu i plastochinonem-9 (PQ-9), konsumpcja tlenu nie była obniżona w stosunku do liposomów kontrolnych (rys. 22). We wniosku dziesiątym zdanie powinno być uzupełnione o słowa „lipidów prenylowych”, wówczas ten fragment byłby bardziej precyzyjny i brzmiałby: „zbadanie składu **lipidów prenylowych** u wybranych gatunków”.

Wszystkie uzyskane wyniki są nowatorskie lub stanowią wartościowe powtórzenie i rozszerzenie wcześniejszej wiedzy, co może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. W moim przekonaniu najwartościowsze wyniki uzyskane w pracy doktorskiej pani mgr Beatrycze Nowickiej, to:

1. Wykazanie, że w układzie liposomowym badane prenylolipidy hamują peroksydację lipidów zależną od tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$).
2. Wykazanie, że w układzie liposomowym, w pewnych warunkach, α -Toc jest prooksydantem, a działanie antyoksydacyjne wykazuje plastochinol-9 (PQH₂-9).
3. Zastosowanie oryginalnej, opartej o układ liposomowy, metody badania fragmentów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, z wykorzystaniem izolowanego kompleksu PSI i sztucznych donorów elektronów. Układ taki pozwolił wykazać, że większość

badanych prenylolipidów pełni rolę antyoksydacyjną, bo detoksykuje anionorodnik ponadtlenkowy, który powstawał w wyniku aktywności PSI.

4. Przeprowadzenie doświadczeń *in vivo* na całych organizmach: *A. thaliana* i *C. reinhardtii* oraz stwierdzenie, które prenylolipidy pełnią funkcję antyoksydacyjną w odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe oraz w procesie starzenia.

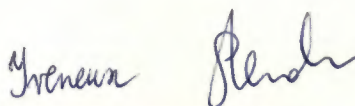
5. Potwierdzenie, że biosynteza plastochinonu-9 (PQ-9) u sinic jest częściowo podobna do szlaku biosyntezy ubichinonu-8 (UQ-8) u *Escherichia coli* i różni się od szlaku biosyntezy tego prenylolipidu u roślin wyższych.

Należy podkreślić, że doktorantka wykonała wręcz tytaniczną pracę, zarówno eksperymentalną jak i interpretacyjną, przy analizie i dyskusji uzyskanych wyników, o czym świadczy ogrom i wieloaspektowy charakter otrzymanych wyników. Niech najbardziej spektakularnym wskaźnikiem nakładu pracy będzie ilość 458 pozycji zacytowanej literatury. Pewnie nie każda z tych 458 prac została przeczytana od pierwszego do ostatniego słowa, ale przecież nie o to chodzi w pracy naukowej. Doktorantka musiała w sposób krytyczny przeglądać wszystkie wymienione publikacje i wyłowić z nich najistotniejsze informacje, które posłużyły jej do interpretacji własnych wyników. Należy podkreślić szeroki wachlarz technik badawczych zastosowanych w pracy doktorskiej, takich jak: otrzymywanie liposomów o zdefiniowanym składzie lipidowym, oznaczanie prenylolipidów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i chromatografii cienkowarstwowej (TLC), oznaczanie zawartości tlenu przy użyciu elektrody Clarka, fluorymetryczne pomiary fluorescencji chlorofilu *a* z PSII, czy analizy bioinformatyczne, co czyni przedstawioną pracę bardzo wszechstronną. Na marginesie chciałbym dodać, że doktorantce udało się już opublikować część wyników zaprezentowanych w recenzowanej pracy doktorskiej w czasopiśmie indeksowanym w bazie Web of Science: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2012, 1817: 389, a następna jest przyjęta do druku w *BBA- Biomembranes*.

Szereg zawartych w recenzji uwag krytycznych ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie pani mgr Beatrycze Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na nowatorski charakter osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej, wnioskuję o jej **wyróżnienie**.

Kraków, dn. 22.11. 2012 r.



Dr hab. Ireneusz Ślesak
prof. nadzwyczajny IFR PAN w Krakowie