

Recenzja pracy doktorskiej mgr Beatrycze Nowickiej zatytułowanej "Badania funkcji antyoksydacyjnych oraz szlaków biosyntezy chinonów prenylowych u roślin"

Chinony prenylowe to obszerna grupa związków amfipatycznych zawierających polarne głowy, najczęściej w postaci benzoquinonów i naftochinonów, oraz hydrofobowy łańcuch izoprenoidowy. Związki te są obecne niemal we wszystkich organizmach żywych, gdzie pełnią różne ważne funkcje biologiczne. Ze względu na amfipatyczny charakter, związki te preferencyjnie lokalizują się w strukturach błonowych. Najważniejszą rolą chinonów izoprenoidowych jest przenoszenie elektronów i protonów w łańcuchach transportu elektronów. Chinony prenylowe zaangażowane są również w regulacji ekspresji niektórych genów i transdukcji sygnałów komórkowych.

Chinony prenylowe wykazują ponadto znaczące właściwości przeciwutleniające. Stosunkowo najwcześniej właściwości te, przejawiające się zdolnością do hamowania peroksydacji nienasyconych lipidów, stwierdzono u witaminy E – tokocholesterolu, należącego do podgrupy lipidów prenylowych. Niemal ćwierć wieku temu Frei i współpracownicy wykazali przeciwutleniające działanie ubiquinolu 10. Przeciwutleniające właściwości, porównywalne do właściwości tokoferoli i ubiquinolu, posiadają także plastoquinole. Należy podkreślić w tym miejscu, że od blisko dwudziestu lat badaniem takich właściwości lipidów prenylowych pochodzenia roślinnego z powodzeniem zajmuje się grupa profesora Jerzego Kruka z Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin WBBiB UJ.

Praca doktorska mgr Beatrycze Nowickiej, zatytułowana "Badania funkcji antyoksydacyjnych oraz szlaków biosyntezy chinonów prenylowych u roślin", w znacznej części poświęcona jest tej właśnie ciekawej i ważnej tematyce badawczej. Naczelnym celem podjętych przez doktorantkę badań było poszerzenie wiedzy o przeciwutleniającym działaniu lipidów prenylowych zarówno w układach *in vitro* jak i *in vivo* oraz wyjaśnienie niektórych aspektów biosyntezy tych związków. Realizacja tak ambitnego zadania badawczego wymagała od doktorantki bardzo dobrego przygotowania teoretycznego i praktycznej umiejętności posługiwania się różnymi metodami i technikami pomiarowymi.

Rozprawa doktorska mgr Nowickiej posiada typowy dla tego typu opracowań format. Obszerny spis treści poprzedza wykaz stosowanych skrótów i dwustronicowe streszczenie. Sama rozprawa składa się z sześciu rozdziałów. Rozdział pierwszy to 35-stronicowy Wstęp, który jest bardzo treściwym przeglądem najważniejszej literatury z tego zakresu. Świadczy on o głębokiej wiedzy doktorantki w zakresie omawianych

zagadnień, które zorganizowane zostały w trzech podrozdziałach zatytułowanych – Chinony prenylowe, Chromanole i Reaktywne Formy Tlenu. Charakteryzując podstawowe właściwości fizykochemiczne chinonów prenylowych i chromanoli, ich występowanie w biosferze i biosyntezę oraz przypisywane im funkcje biologiczne, doktorantka niejednokrotnie konfrontuje odmienne poglądy w tym względzie reprezentowane przez różnych badaczy. Tę część rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko; uważam, że jest to znakomite opracowanie dowodzące, iż mgr Nowicka świetnie orientuje się w przedmiocie prowadzonych badań. W części dotyczącej reaktywnych form tlenu doktorantka omawia podstawowe właściwości, przede wszystkim reaktywność chemiczną tlenu singletowego i produktów częściowej redukcji tlenu cząsteczkowego a także organicznych wodoronadtlenków oraz rodników alkoksylowych i peroksydowych. Chociaż reaktywne formy tlenu mogą powstawać w wielu różnych procesach fizykochemicznych, ze względu na przedmiot i zakres swoich badań, mgr Nowicka szczególnie koncentruje się na generowaniu ROS w komórkach roślinnych. Następnie omawia zależne od reaktywnych form tlenu uszkodzenia komórkowych składników, zwłaszcza peroksydację lipidów oraz rolę lipidowych przeciwutleniaczy w hamowaniu tego procesu. Przegląd literatury doktorantka kończy bardzo ciekawym, choć może nieco kontrowersyjnym, opisem udziału reaktywnych form tlenu w transdukcji sygnału i odpowiedzi na atak patogenu. Reaktywne formy tlenu i ich rola w stresie oksydacyjnym jest bardzo popularnym tematem badawczym, który dość często staje się przedmiotem nieporozumień zarówno terminologicznych jak i, niestety, merytorycznych. Z tym większą przyjemnością mogę stwierdzić, że doktorantka całkiem dobrze poradziła sobie z tym potencjalnie niebezpiecznym obszarem badań naukowych. Mam jedynie drobne uwagi dotyczące paru niezbyt ścisłych sformułowań użytych we wstępie rozprawy. I tak, uważam za nietrafne stwierdzenie (str 34) iż "... $^1\text{O}_2$ odgrywa znaczną rolę w inicjacji peroksydacji lipidów". Jak doktorantka doskonale wie, o czym świadczy rysunek 9 (str 40), przez inicjację peroksydacji lipidów rozumie się wolnorodnikowy proces, prowadzący do oderwania atomu wodoru od cząsteczki nienansyconego lipidu, który rozpoczyna swoistą reakcję łańcuchową. Tlen singletowy w procesie peroksydacji lipidów działa zupełnie inaczej, bo przyłączając się do wiązania podwójnego łańcucha węglowodorowego bezpośrednio wytwarza wodoronadtlenek alkilowy lub dioksetan. Oczywiście te produkty są nietrwałe i mogą prowadzić do wtórnych produktów wolnorodnikowych, jednak tlen singletowy nie „inicjuje” peroksydacji lipidów, po prostu je utlenia. Ponadto nie uważam za zasadne ogólne stwierdzenie, iż "...anionorodnik ponadtlenkowy jest formą o krótkim czasie życia (2-4 μs)..." Czas życia tego rodnika zależy od stężenia cząsteczek, z którymi może reagować (najczęściej jako słaby reduktor), ale głównie od stężenia samego rodnika, bo jedną z jego preferowanych reakcji jest dysmutacja. Należałoby więc sprecyzować w jakich konkretnie warunkach czas życia anionorodnika ponadtlenkowego będzie 2-4 μs . Polemizowałbym również z poglądem, który wydaje się dzielić mgr Nowicka, że

tlen singletowy bierze udział w transdukcji sygnału (str. 44). Biorąc pod uwagę stosunkowo dużą reaktywność chemiczną tlenu singletowego i jego krótki czas życia w układach biologicznych, który ogranicza dyfuzję do kilkudziesięciu nanometrów, trudno wyobrazić sobie jakiś konkretny mechanizm takiego sygnalizacyjnego działania. Chciałbym jeszcze dodać, że przegląd literatury, zrobiony przez mgr Nowicką oparty jest na bardzo wielu pracach cytowanych przez doktorantkę. Bibliografia recenzowanej pracy doktorskiej obejmuje aż 458 pozycji. Są to w większości aktualne prace opublikowane w ostatnich latach, ściśle wiążące się z tematyką badań doktorantki.

Ostatnia część Wstępu to Cele Pracy, które zostały sformułowane w postaci 9 punktów. Badania doktorantki miały więc dostarczyć nowej informacji o udziale lipidów prenylowych w hamowaniu peroksydacji lipidów indukowanej tlenem singletowym lub wolnymi rodnikami oraz w zmiataniu anionordnika nadadtlenkowego w układzie modelowym liposomów z wbudowanym PS1. Innym celem badań było ustalenie, czy w wybranych układach modelowych możliwa jest regeneracja α -tokoferolu. Znaczna część badań doktorantki dotyczyła układów *in vivo* i miała na celu wyjaśnienie: czy i w jakim stopniu zmienia się zawartość lipidów prenylowych w liściach *Arabidopsis thaliana* w warunkach stresu świetlnego i w niskiej temperaturze, czy podczas starzenia tych organizmów obserwuje się zmiany zawartości chromanoli w liściach i plastoglobulach, jak jest udział lipidowych przeciwutleniaczy w odpowiedzi *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny i jaka jest zawartość α -tokoferylchinonu w wybranych mikroorganizmach. W swojej pracy doktorantka chciała ponadto zbadać szlaki biosyntezy plastochinonu u sinic, u których proces ten jest stosunkowo słabo poznany.

Rozdział drugi rozprawy, zajmujący 22 strony rozprawy doktorskiej, to dokładny opis materiałów, badanych organizmów i ich hodowli, zastosowanych metod i technik badawczych oraz użytej aparatury. Uważam, że zastosowane przez mgr Nowicką metody były adekwatne dla osiągnięcia zamierzonego celu badań. Zawarta w tym rozdziale informacja jest w pełni wystarczająca dla odtworzenia warunków przeprowadzonych badań przez niezależnych badaczy.

Wyniki, jakie uzyskała mgr Nowicka, opisane są na 55 stronach rozprawy, ilustrowane 40 rysunkami i 8 tabelami. W pierwszej części tego rozdziału doktorantka omawia wpływ lipidów prenylowych na fotosensybilizowaną peroksydację nienasyconych lipidów w liposomach, których skład był zbliżony do składu lipidowego błon tylakoidów. Z uwagi na to, że użyty w tych doświadczeniach fotosensybilizator – cynkowa tetrafenyloporfiryra – jest związkiem lipofilowym, doktorantka słusznie przyjęła, iż fotogenerowanie tlenu singletowego (i ewentualnie wolnych rodników) zachodziło głównie wewnątrz dwuwarstwy lipidowej, gdzie powinny się lokalizować cząsteczki fotosensybilizatora. Mierząc akumulację wodoronadtlenków lipidów, towarzyszącej fotosensybilizowanemu procesowi, doktorantka stwierdziła, że chociaż wydajność hamowania fotosensybilizowanej peroksydacji lipidów była podobna dla wszystkich

przebadanych związków, najsilniejsze przeciwutleniające działanie wykazywał γ -tokotrienol, a najsłabsze α - tokoferol, który jednak najszybciej utleniał się. Mgr Nowicka stwierdziła, że efektywność hamowania peroksydacji lipidów przez chinole prenylowe jest największa dla związków z długimi łańcuchami bocznymi. Okazało się ponadto, iż formy chinonowe lipidów prenylowych również wykazują znaczącą zdolność hamowania fotosensybilizowanej peroksydacji lipidów, przy czym w przeciwieństwie do badanych chinoli, czy chromanoli, spadek zawartości chinonów podczas fotoaktywacji badanego układu był stosunkowo niewielki.

Dla potwierdzenia, iż fotosensybilizowana peroksydacja lipidów zachodzi głównie przy udziale tlenu singletowego, doktorantka podjęła próbę detekcji tej reaktywnej formy tlenu poprzez pomiar fluorescencji specjalnej sondy molekularnej – SOSG. Chociaż w obecności α -tokoferolu, plastochinolu 9 lub plastochinonu 9, doktorantka zaobserwowała znaczący spadek fluorescencji SOSG, sugerujący gaszenie tlenu singletowego przez badane przeciwutleniacze, wyniki te nie można uznać za jednoznaczny dowód na kluczową rolę tlenu singletowego w badanej peroksydacji lipidów. Niestety, jak doktorantka doskonale zdaje sobie z tego sprawę, SOSG monitoruje obecność tlenu singletowego w fazie wodnej, a więc jedynie mały strumień tej reaktywnej formy tlenu generowanej w błonach liposomów. Znacznie pewniejszą metodą byłaby analiza produktu, który generowany jest w fazie hydrofobowej, np. specyficznych dla tlenu singletowego wodoronadtlenków cholesterolu, który jednak musiałby być wprowadzony do badanych liposomów.

Badając wpływ lipidów prenylowych na peroksydację lipidów, inicjowaną wolnymi rodnikami, doktorantka zastosowała hydrofobowy, termolabilny azozwiązek AMVN. Okazało się, że o ile w takich warunkach plastochinol 9 hamuje peroksydację lipidów, to α -tokoferol znacznie ją przyspiesza, przy czym obydwa związki są szybko degradowane.

W dalszych badaniach, doktorantka analizowała reaktywność α -tokoferylchinonu, α -tokoferylchinolu i 8α -hydroperoksy- α -tokoferonu w roztworach przy użyciu rozpuszczalników organicznych oraz w liposomach, w obecności askorbinianu i przy różnym pH. Uzyskane przez doktorantkę wyniki potwierdziły, iż w metanolu w obecności kwasu i askorbinianu α -tokoferylchinon przekształca się do α -tokoferolu. Jednak w liposomach, zawieszonych w buforach o różnym pH, w obecności askorbinianu, przebieg reakcji jest inny. Obserwowano więc redukcję α -TQ do α -TQH₂, przy czym wzrost zawartości α -tokoferolu był minimalny. Nieco większą produkcję α -tokoferolu zaobserwowano jedynie w układzie liposomów z lipidów chloroplastowych, kiedy substratem był 8α -hydroperoksy- α -tokoferon.

Doktorantka badała także wpływ lipidów prenylowych na szybkość fotokonsumpcji tlenu w układzie liposomów z wbudowanym PSI, który izolowany był z roślin wyższych lub z sinic. Pomiary te miały wykazać zdolność PQ-9, PQH₂-9, PQ-2, PQH₂-2 oraz α -TQH₂ do zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego, fotogenerowanego przez PSI w obecności egzogennych donorów elektronu – hydrochinonu i plastocyaniny. Uzyskane przez doktorantkę wyniki pokazują, że jedynie PQ-2 znacząco hamował fotokonsumpcję tlenu w liposomach zawierających PSI z roślin wyższych. Natomiast wszystkie badane lipidy prenylowe hamowały fotokonsumpcję tlenu w próbkach zawierających liposomy z wbudowanym PSI z sinic, przy czym najwydajniejszymi inhibitorami tego procesu okazały się PQ-2 i PQH₂-2.

W dalszej części rozdziału trzeciego doktorantka omawia obszernie wyniki badań biochemicznych i fizjologicznych. W szczególności dotyczy to:

1. zawartości lipidów prenylowych w liściach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego i mutantu *vte1* w warunkach stresu świetlnego i termicznego,
2. zmian fenotypowych i zawartości chromanoli w liściach *Arabidopsis thaliana* podczas odpowiedzi na warunki świetlne w trakcie starzenia się roślin,
3. analizy ilościowej frakcji plastochinonu i chromanoli w tylakoidach i plastoglobulach *Arabidopsis thaliana*
4. roli lipidowych przeciwutleniaczy w odpowiedzi *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny
5. zawartości α -tokoferylchinonu w wybranych gatunkach mikroorganizmów
6. biosyntezy plastochinonu u sinic.

Ponieważ nie jestem ani biochemikiem ani fizjologiem roślin, dlatego jedynie skrótowo odniosę się do przedstawionych przez doktorantkę najważniejszych wyników z tego zakresu. I tak:

Warunki stresowe powodują kilkudziesięciokrotny wzrost zawartości α -tokoferylchinonu i trzech tokoferoli w przeliczeniu na chlorofil w liściach typu dzikiego. U *Arabidopsis thaliana* zawartość α -tokoferolu wzrasta tym silniej im bardziej intensywne było światło podczas hodowli tej rośliny. W podobny sposób zmienia się zawartość hydroksy-plastochromanolu i PC-8, przy czym zdecydowana większość lipidów prenylowych w liściach rośliny zlokalizowana jest w plastoglobulach.

Zastosowanie hodowli w D₂O, rozpręgaacza gradientu pH w poprzek błony tylakoidów, inhibitora utlenienia PQH₂, inhibitora redukcji PQ oraz inhibitora enzymu odpowiedzialnego za syntezę prekursora biosyntezy tokoferoli i PQ, umożliwiło

doktorantce przeprowadzenie szczegółowej analizy roli lipidowych przeciwutleniaczy w odpowiedzi *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny.

Stosując czułą i specyficzną metodę detekcji α -TQ, która została niedawno opracowana przez zespół profesora Kruka, doktorantka zweryfikowała wyniki wczesnych doświadczeń Hughesa i Tove'a, którzy donosili o powszechnym występowaniu α -TQ i α -TQH₂ w mikroorganizmach. Okazało się, że w przebadanych przez doktorantkę mikroorganizmach nie wykryto α -TQ i α -TQH₂ u *E. coli*, *S. cerevisiae* i *C. utilis.*, zaś poziom tych związków u *B. fibrisolvens* był o rząd niższy niż podawany przez Hughesa i Tove'a.

Bardzo ciekawe i wartościowe wyniki, które mają znamiona odkrycia naukowego, dotyczą szlaków biosyntezy plastochinonu u sinic. Stosując komputerową analizę sekwencji w poszukiwaniu genów kodujących enzymy należące do rodziny prenylotransferaz UbiA, doktorantce udało się zidentyfikować jako homologi syntazy chlorofilu, farnezylotransferazy protohemu IX – DHNA OPT i PHB PRT. Przeprowadzone analizy i doświadczenia potwierdziły hipotezę o odrębnych szlakach biosyntezy PQ-9 i α -Toc u sinic. Warto podkreślić, że tym roku ukazała się publikacja w oparciu o niezależne badania, w której udowodniono rolę produktu genu slr0926, homologa UbiA z *E. Coli* w biosyntezie PQ-9 u *Synechocystis sp* PCC 6803, potwierdzając wynik badań doktorantki.

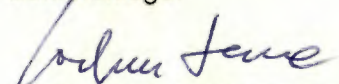
Rozdział czwarty to obszerna dyskusja wyników, mieszcząca się na 32 stronach rozprawy doktorskiej. Chociaż niektóre z przedstawionych koncepcji i poglądów doktorantki mogą wydawać się nieco spekulacyjne, nie mam żadnych poważnych zastrzeżeń odnośnie proponowanych mechanizmów obserwowanych zjawisk ani użytych argumentów. Przeprowadzona przez mgr Nowicką dyskusja wyników świadczy nie tylko o dużej wiedzy badanych przez nią zagadnień ale również o znacznej dojrzałości naukowej.

Część merytoryczną rozprawy doktorskiej kończą dwustronicowe Wnioski, które dowodzą, że doktorantka pomyślnie zrealizowała zamierzone cele swoich badań.

Praca doktorska mgr Beatrycze Nowickiej napisana jest poprawną polszczyzną. Jest czytelnie zredagowana i zawiera liczne ryciny i schematy, które dobrze ilustrują omawiane wyniki i proponowane zależności. Nie natknąłem się na poważniejsze błędy językowe czy „literówki”. Z obowiązku recenzenta zwracam się do doktorantki z kwestią, która nie jest zarzutem, ma raczej charakter dyskusyjny: mianowicie rad by poznać jej opinii odnośnie roli D₂O w tak heterogenicznym układzie jaki badała. Efekt izotopowy, o którym wspomina w kilku miejscach rozprawy doktorskiej, będzie się manifestował tylko wtedy, gdy czas życia tlenu singletowego determinowany jest jego oddziaływaniem z cząsteczkami rozpuszczalnika, czyli wtedy, gdy lokalne stężenie potencjalnych

wygaszaczy lub akceptorów jest bardzo małe. Sytuacja taka wydaje się dość nieprawdopodobna dla komórki, w której według doktorantki generowany jest tlen singletowy przy udziale PSI. Czy mgr Nowicka może zaproponować jakieś rozsądne wyjaśnienie tego dylematu?

Mgr Beatrycze Nowicka zgromadziła imponujący materiał doświadczalny, który powinien być jak najszybciej wykorzystany w oryginalnych publikacjach naukowych. Samą rozprawę doktorską mgr Nowickiej oceniam jako bardzo dobrą. Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Beatrycze Nowickiej spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich z biochemii oraz wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr B. Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Zakład Biofizyki WBBiB UJ

Kraków, 24. 11. 2012