

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR JUSTYNY ŁABUZ ZATYTUŁOWANEJ:

„ŚCIEŻKI PRZEKAZU SYGNAŁU ŚWIETLNEGO STERUJĄCEGO RUCHAMI CHLOROPLASTÓW *ARABIDOPSIS THALIANA* I ICH FUNKCJONOWANIE W RÓŻNYCH WARUNKACH ŚRODOWISKOWYCH”

W ostatnich latach molekularna biologia komórki stała się jedną z najszybciej rozwijających się dyscyplin nauk biologicznych. Często pojawiają się odkrycia, które znacząco zmieniają rozpowszechnione wcześniej poglądy. Jeszcze nie tak dawno najczęstszym sposobem opisywania działania komórki było przedstawianie jej jako „worka z enzymami”. Dziś wiemy, że komórka jest układem w pełni zintegrowanym, zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie. Jednym z przejawów tej integracji jest ruch wewnątrz komórki – w dużej mierze uporządkowany i ukierunkowany; dotyczący nie tylko organelli, ale również pojedynczych makrocząsteczek. U roślin kluczową rolę odgrywa ruch chloroplastów, wiązany zwykle z adaptacją roślin do zmiennych warunków oświetlenia. Choć zjawisko jest znane od dziesięcioleci, to reguły i mechanizmy nim rządzące wciąż jeszcze w dużej mierze pozostają nieznane. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Łabuz wpisuje się w ten nurt badań.

OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Recenzowana praca, zamknięta w 125 stronach maszynopisu, jest napisana w układzie typowym dla prac doktorskich. Wstęp umożliwia Czytelnikowi zapoznanie się z zakresem zagadnień przedstawionych w rozprawie. Pokrótce omówiono ruchy chloroplastów u rzodkiewnika jako organizmu modelowego. W dalszej części przedstawiono układ fotoreceptorowy oraz wtórne przekazywanie sygnału, ze szczególnym zwróceniem uwagi na jony wapnia i szlak sygnałów fosfatydyloinozitolowych. Cele pracy stanowią rozdział 2, po którym następuje opis wykorzystanych materiałów oraz stosowanych metod. Kolejne dwa rozdziały to omówienie uzyskanych wyników oraz ich dyskusja na tle literatury światowej, kończąca się wyodrębnionym podsumowaniem. Właściwą pracę poprzedza streszczenie oraz wykaz skrótów. Rozprawę uzupełnia dodatek, w którym zamieszczono zestawienie stosowanych odczynników, skład roztworów używanych w elektroforezie SDS-PAGE, wykaz starterów wykorzystywanych w reakcjach PCR, opis procedury izolacji RNA, oraz obszerne, liczące 196 pozycji, zestawienie cytowanej literatury.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Jednym z najbardziej interesujących przejawów funkcjonowania komórki eukariotycznej jest aktywne utrzymywanie jej organizacji wewnętrznej, w szczególności umiejscowienie i utrzymanie właściwych relacji przestrzennych między organellami komórki. U różnych grup organizmów jest to osiągnięte w bardzo zróżnicowany sposób w odmiennych typach komórek. Obecność plastydów jest jednym z elementów wyróżniających komórki roślinne. Ze względu na rolę, jaką te organelle spełniają u roślin, kluczowym dla prawidłowego funkcjonowania jest właściwe umiejscowienie plastydów, zwłaszcza chloroplastów, względem padającego światła. Nadrzędnym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było przyjrzenie się wybranym elementom szlaku przekazywania bodźca świetlnego, odebranego przez fototropiny, do układu kontrolującego położenie i ruch chloroplastów w komórkach rzodkiewnika. Szczegółowej analizie poddano: 1) wpływ wybranych czynników środowiskowych na ekspresję dwóch genów kodujących fototropinę1 i

fototropinę², oraz na związane z tym reakcje ruchowe chloroplastów; 2) rolę pełnioną przez dwa wtórne przekąźniki sygnału: jony wapnia oraz fosfatydyloinozytyle. Aby ten cel osiągnąć, Doktorantka wyznaczyła sobie kilka zadań szczegółowych. Do ich realizacji wykorzystwała szeroką gamę dostępnych narzędzi transkryptomiki, molekularnej biologii komórki, czy techniki immunochemiczne. Nie mam wątpliwości, że Pani Justyna Łabuz porusza się sprawnie po terytorium biologii doświadczalnej.

Przystępując do pierwszej części badań Doktorantka opracowała układ doświadczalny, który umożliwił jej dokonanie analiz ilościowych poziomów transkryptów dla obu fototropin kodowanych w genomie rzodkiewnika. Zawartość mRNA dla fototropin analizowano w różnych punktach czasowych rozwoju siewek do 7 tygodnia życia, a także w liściach, w których indukowano starzenie się poprzez ich trwałe zaciemnienie. Stwierdzono, że w rozwijających się siewkach światło nieznacznie obniża poziom ekspresji genu kodującego fototropinę¹, i podwyższa zawartość mRNA dla fototropiny². Podobną analizę, wzbogaconą dodatkowo o analizę zawartości białek, przeprowadzono również dla siewek rosnących w różnych warunkach temperaturowych. Wykazano, że ekspresja fototropin jest zależna od temperatury, przy czym obserwowane zmiany wykazywały odmienne tendencje kierunkowe w zależności od tego, czy rośliny rosły w temperaturach wyższych czy też niższych niż temperatura optymalna (23 °C). W stresie cieplnym (37 °C) zawartość obu fototropin dość znacznie spadała, natomiast w stresie chłodu (4 °C) ich ekspresja ulegała wyraźnemu zróżnicowaniu: fototropiny¹ było znacznie mniej, natomiast zawartość fototropiny² nieco wzrastała. To zróżnicowanie powiązano funkcjonalnie z obserwowanymi zmianami reakcji ruchowych chloroplastów. Wykazano bowiem, że w niskich temperaturach jest stymulowana reakcja ucieczki chloroplastów, którą kontroluje właśnie fototropina².

Rolę wtórnych przekąźników sygnałów Pani Łabuz badała wykorzystując techniki farmakologiczne oraz analizy mikroskopowe. Dwa inhibitory, wortmanina i LY294002, zostały użyte dla zbadania znaczenia szlaku sygnałowego fosfatydyloinozytoli w przekazywaniu odebranego bodźca świetlnego do układu aktynomiozynowego, który napędza i ukierunkowuje przemieszczanie się chloroplastów. Udowodniono, że udział fosfatydyloinozytoli, oraz enzymów, które kontrolują ich stopień ufosforylowania, jest odmienny dla każdego z typów reakcji ruchowej chloroplastów. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sugeruje, że dwie kinazy: 3- i 4-fosfatydyloinozytolu, kontrolują reakcję akumulacji chloroplastów. Natomiast reakcja ucieczki podlega bardziej złożonej regulacji, w której rolę, poza fosfatydyloinozytolami, odgrywają również kontrolowane zmiany w stężeniach jonów wapnia. Te ostatnie Doktorantka zademonstrowała przy użyciu metody swoistego wytrącania jonów wapnia piroantymonianem potasu i obserwacji strąków w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wyposażonym w przystawkę do mikroanalizy rentgenowskiej. Obserwacje pokazały również, że wpływ wapnia do apoplastu jest odmienny w różnych warunkach oświetlenia – światłem niebieskim lub czerwonym, i że jest on zależny od obecności fototropin.

Pracę czyta się bardzo dobrze, i tak też powinna być oceniana. Co więcej, jej lektura pobudza do myślenia i przynosi wiele informacji, które stają się źródłem pomysłów na nowe doświadczenia. Mnie osobiście najbardziej zaciekały doświadczenia ilustrujące, technikami mikroskopii elektronowej, generacje fal wapniowych. W pracy pojawiają się jednak i takie momenty, które chciałoby się przedyskutować na żywo, lub takie, które można uważać za drobne potknięcia. Pozwalam sobie wskazać niektóre z nich z prośbą o rozmowę o nich w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

DYSKUSJA PRZEDSTAWIANYCH ZAGADNIEŃ LITERATUROWYCH

- Impuls do pierwszego pytania pojawił się po przeczytaniu podrozdziału 1.1.4 „Znaczenie ekologiczne ruchów chloroplastów – wpływ natężenia światła”. Na początek pozwalam sobie zacytować 2 zdania otwierające rozdział 1 książki E.J.H. Cornera „The Life of Plants” z 1964 r., a wydanej ponownie w 2002 roku. „A plant is a living thing that absorbs in microscopic amounts over its surface what it needs for growth. It spreads therefore an exterior whereas the animal develops, through its mouth, an interior.” Bardzo bym prosił Doktorantkę o komentarz, jak w tym kontekście umieściłaby kwestie kontroli ruchów chloroplastów przez czynniki środowiskowe.

DYSKUSJA MERYTORYCZNA STOSOWANYCH METOD

- Myślę, że do tej grupy zagadnień należy zaliczyć kwestię wyboru modelu doświadczalnego. Autorka w „Celach pracy” stwierdziła, że wybór model został podyktowany „... koniecznością wykorzystania mutantów fotoreceptorowych...”. Chciałbym więc, dość przewrotnie, zapytać, czy rzeczywiście taka była kolejność wyboru, czy jednak raczej model został dopasowany do postawionego problemu nadawczego?
- W pracy wykorzystano przeciwciała skierowane na fototropiny. Jednak w całej pracy pokazano właściwie tylko raz (rys. 4.12) obraz Western blot wykorzystujący znakowanie tymi przeciwciałami. Mam wobec tego prośbę o pokazanie obrazu elektroforetycznego całego żelu po Western blot, gdyż na podstawie ukazanych danych trudno jest ocenić do końca swoistość wykorzystanych przeciwciał, zwłaszcza możliwość reakcji krzyżowych. Prosiłbym również o doprecyzowanie sposobu określania stężenia przeciwciał. Po izolacji i oczyszczeniu immunoglobulin trudno jest mówić o klasycznym szeregu rozcieńczeń. Czy wobec tego do znakowania używano określonej, np. w µg, ilości białka?

DYSKUSJA MERYTORYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW I ICH INTERPRETACJI

- Doktorantka w dyskusji odnosi się do podjętych, lecz nieopisanych szczegółowo, prób lokalizacji fototropin w komórkach roślin. Ponieważ nie ma żadnych danych szczegółowych, prosiłbym o informację, czy próbowano lub choćby rozważano wykorzystanie metod mrożeniowych do utrwalania preparatów? Chciałbym również prosić o komentarz w kwestii wykorzystania mikroskopii TIRF do założonego celu, a więc wykrycia fototropin w okolicach błony komórkowej.

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ ROZPRAWY

Praca jest przygotowana niezwykle starannie. Przede wszystkim jednak, co szczególnie warto podkreślić, jest napisana jasnym, zrozumiałym i poprawnie używanym językiem. W moim osobistym „rankingu językowym” rozpraw doktorskich praca ta, szczególnie jej „Wstęp”, zajmie jedno z czołowych miejsc, gdyż jest jedną z najładniej napisanych rozpraw doktorskich. Niemniej Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów, z których najważniejsze, **ale niewymagające dyskusji**, pozwałam sobie zawrzeć poniżej. Pojawiających się od czasu do czasu literówek, drobnych błędów interpunkcyjnych i „chochlików” drukarskich nie wymieniam.

TERMINOLOGIA

- Z pewnym niedowierzaniem zauważyłem w „Wykazie skrótów” błąd zupełnie podstawowy, który, jak się wydawało, nie powinien się w ogóle wydarzyć. Otóż skrót „cDNA” oznacza „komplementarny DNA” a nie „kodujący DNA”, jak to określiła Autorka.
- Podobne zaskoczenie towarzyszyło błędnemu tłumaczeniu nazwy jednego z najpopularniejszych odczynników – Tris. Według wszelkich dostępnych reguł, nazwa ta określa związek chemiczny: tris(hydroksymetylo)aminometan, a nie trihydroksyaminometan. Warto rozrysować sobie obie struktury, by z łatwością wychwycić różnice.

JĘZYK POLSKI

- Mimo piękna użytego w rozprawie języka, znalazło się w niej kilka sformułowań, których nieprawidłowe stosowanie często obserwuje się w języku potocznym, a których należy unikać w takich tekstach, jak rozprawa doktorska. Po raz kolejny muszę umieścić w recenzji uwagę o jednym z najczęściej spotykanych błędów, a mianowicie o używaniu czasownika „posiadać” w odniesieniu do makrocząsteczek, organelli, czy komórek, np. „... nie posiadają aktywności ATPazowej.” (o białkach; str. 14), czy też „... nie posiadają wyraźnych cech fenotypowych.” (o roślinach; str. 14). Posiadanie odnosi się zwykle do własności, majątku, i do relacji osobowych, a więc np. właściciel posiada posesję czy ziemię. Białko może „mieć zdolności” lub „zawierać domeny”.
- Innym „potworkiem” językowym jest stosowanie kalki określeń angielskich. Przykładem niech będzie sformułowanie ze str. 35: „... mniej specyficznie inhibowany przez wortmaninę...”. W języku polskim inhibitor raczej „hamuje” a nie „inhibuje”. Podobnie, w języku polskim nieco inaczej zwykle rozkłada się kolejność określeń, a więc prawidłową formą jest proteasom 26S, a nie „26S proteasom” (str. 86).

- W rozprawie, choć niezwykle rzadko, ale jednak pojawiają się wyrażenia zaczerpnięte z żargonu laboratoryjnego. Do takich zaliczam: „... z aktywną znakowaną mysią taliną zfuzjowaną z GFP.” (str. 11); „... zaangażowanie fotosyntezy w bezpośredniej kontroli ruchów chloroplastów.” (str. 17); „... rola fototropin ulega poszerzeniu o szereg procesów...” (str.21); „Ścisłą kontrolę ilości poszczególnych fosfatydyloinozytoli w komórkach pełni zestaw kinaz i fosfataz.” (str. 33). Odrębnym zagadnieniem jest używanie żargonowego (glutaraldehyd) określenia związku chemicznego, jakim jest aldehyd glutarowy.
- Na koniec pewne kuriozum językowe, jakim jest słowo „zapostulowanie”. Nie wiem, czy uznać to za żargon, czy cokolwiek innego, ale jest to forma swoista dla tej rozprawy, a nie dla języka polskiego.

PRZEGLĄD LITERATURY

- Pisząc o znaczeniu kształtu komórek dla ruchów chloroplastów (str. 18), Doktorantka użyła sformułowania „bardziej kulistych komórek liści”. Jeśli dobrze kojarzę, to kształt kuli przyjmują wszystkie protoplasty, ale raczej trudno o takim kształcie mówić w przypadku komórek otoczonych ścianą.
- Jako ciekawostkę językową należy chyba potraktować sformułowanie „... phot2 jako receptor posiada także aktywność biologiczną w ciemności.” (str. 22).

CELE PRACY

- Raczej do dość zabawnych pomyłek zaliczam sytuację, w której do wymienienia „trzech grup zagadnień” użyto **czterech** odrębnych punktów.

OPIS MATERIAŁÓW I METOD

- Na str. 42 Doktorantka stwierdza, że stosowała „9% żele poliakryloamidowe” w elektroforezie typu SDS-PAGE. Ten system wymaga obecności dwóch żeli o różnych stężeniach, ale tego dowiadujemy się dopiero spoglądając na koniec pracy do załączników.

OPIS WYNIKÓW I DYSKUSJA

- Od mniej więcej strony 65 zaburzeniu ulega system numeracji rysunków opisywany w tekście. W nawiasach odnośników bardzo często znika odwołanie do pełnego numeru rysunku; pozostaje jedynie jego część oznaczająca kolejność w rozdziale, natomiast znika część odnosząca się do danego rozdziału.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest znakomitym przykładem rozwiązania ciekawego problemu badawczego. W trakcie pracy osiągnięto założone cele szczegółowe i w znaczący sposób przybliżono odpowiedź na pytanie, postawione w celu głównym rozprawy. Stało się to możliwe dzięki wszechstronnemu wykorzystaniu nowoczesnych technik badawczych molekularnej biologii komórki oraz transkryptomiki. Przeprowadzone doświadczenia sprowokowały pojawienie się nowych pytań, co bardzo dobrze świadczy o potencjale naukowym pracy. Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła prawidłowe i interesujące wnioski. Część wyników badań została już opublikowana w jednym z najlepszych czasopism naukowych z zakresu biologii roślin. Jasną stroną rozprawy doktorskiej jest również jej język oraz jakość opracowania i redakcji tekstu. **Konkludując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Justyny Łabuz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, prowadzących do nadania stopnia doktora nauk biologicznych.**

P. Woźniak