



Poznań, 11 czerwca 2013 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI CHHAVI AGGARWAL ZATYTUŁOWANEJ:

„PHOTOTROPIN SIGNALLING IN HIGHER PLANTS. CROSSTALK WITH THE PHOSPHOINOSITIDE PATHWAY AND THE MECHANISM OF PHOTOTROPIN2 INTERNALIZATION”

Biologię można by nazwać fizyką i chemią życia, gdyby nie to, że na poziomie komórki pojawiają się cechy emergentne, które pozwalają wyróżnić układy żywe z całego świata nieożywionego. Analizując więc zjawiska typowe dla fizyki (ruch) lub chemii (wykorzystanie energii świetlnej) w kontekście komórkowym łatwo można dostrzec cechy swoiste dla układów żywych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani Chhavi Aggarwal jest tego znakomitą przykładową. Praca została wykonana w Zakładzie Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Haliny Gabryś, i mieści się w głównym nurcie badań Zespołu dotyczących mechanizmów przekazywania bodźca świetlnego do wnętrza komórki.

OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Recenzowana praca została napisana w języku angielskim w układzie typowym dla prac doktorskich. Rozprawa mieści się na 113 stronach maszynopisu. We Wstępie przekazano Czytelnikowi zestaw najistotniejszych informacji dotyczących 1) fototropin; 2) fosfatydyloinozytoli oraz ich znaczenia w procesach przekazywania sygnałów; a także 3) endocytozy i jej znaczenia w procesach internalizacji receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej. Ostatnią częścią Wstępu jest krótki podrozdział zarysowujący główne cele rozprawy. W kolejnym rozdziale opisane zostały wykorzystane materiały i stosowane metody. Uzyskane wyniki oraz ich dyskusja zostały zawarte w kolejnych dwóch rozdziałach. Odrębną częścią jest rozdział podsumowujący, w którym zawarte zostały najważniejsze osiągnięcia pracy i najistotniejsze wnioski. Rozprawa jest poprzedzona wykazem używanych skrótów oraz streszczeniem, a całość zamyka wykaz stosowanych odczynników, oraz obszerne zestawienie cytowanej literatury.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Białka zaliczane do fototropin tworzą jedną z klas białek umożliwiających detekcję bodźca świetlnego przez rośliny i uruchomienie właściwej odpowiedzi komórki. Jednak wyjaśnienie mechanizmu ich funkcjonowania dalekie jest jeszcze od zakończenia. Wiele pytań dotyczy z jednej strony związków między detekcją bodźca świetlnego a przemieszczaniem chloroplastów w komórce, a z drugiej strony losów samego receptora po odebraniu bodźca. W rozprawie Doktorantka postawiła sobie ambitny cel dostarczenia odpowiedzi przynajmniej na niektóre z takich pytań. Aby ten cel osiągnąć, Doktorantka wyznaczyła kilka zadań cząstkowych, a do ich realizacji wykorzystwała szeroką gamę narzędzi molekularnej biologii komórki, oraz wybrane techniki biochemiczne i biofizyczne. Badania prowadziła na kilku modelach, w tym na roślinach rzodkiewnika typu dzikiego i mutantach, na protoplastach Arabidopsis i tytoniu, oraz na transgenicznym

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek
ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 5972, fax. +48 61 829 5949
przemow@amu.edu.pl

www.molcell.amu.edu.pl



UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

liniach tytoniu. Muszę od razu przyznać, że umiejętności doświadczalne Pani Chhavi Aggarwal oceniam niezwykle wysoko.

Analizując przekazywanie bodźca świetlnego Pani Aggarwal zwróciła uwagę na fosfatydyloinozytyle – swoistą grupę drobnocząsteczkowych lipidów, które w komórkach spełniają nie tylko rolę strukturalną, jako składniki błon biologicznych, ale również rolę regulatorową. Ta druga wynika z ich szybkiego metabolizmu, co pozwala na przekształcanie fosfatydyloinozytoli w cząsteczki sygnałowe, aktywujące takie odpowiedzi komórkowe, jak: regulacja zawartości wapnia w cytozolu, zmiany w organizacji cytoszkieletu, czy też krążenie błon. Doktorantka skupiła się na jednym z fosfatydyloinozytoli, a mianowicie na 4,5-bisfosforanie fosfatydyloinozytoli [PI(4,5)P₂], który w komórkach zwierzęcych jest substratem fosfolipazy C i ważnym składnikiem swoistego szlaku sygnalizacyjnego. Wykonała kilka doświadczeń farmakologicznych, w których wykazała, że: 1) zastosowanie neomycyny lub U73122 prowadzi do zaburzenia ruchów chloroplastów zależnych od phot2, przy czym zaburzenia te nie zależą od zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego w komórkach; 2) zastosowanie każdego z inhibitorów prowadzi do wzrostu zawartości PI(4,5)P₂ w komórkach roślin; 3) w obecności U73122, ale nie niekategońskiego homologu U73343, dochodzi do zahamowania przejściowego wzrostu stężenia wtórnego przekąźnika, jakim jest wapń; 4) zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie zależą od napływu wapnia do wnętrza komórki najprawdopodobniej z magazynów wewnętrznych, a nie z zewnątrz protoplastu.

Uzyskane wcześniej wyniki stały się motorem napędowym drugiej części badań, dotyczących znaczenia internalizacji fototropin w odpowiedzi na bodźce świetlne i ich wędrówki we wnętrzu komórki. Szlaki sygnalizacyjne, w których aktywowany receptor jest internalizowany na drodze endocytozy zostały już dość dobrze przebadane w komórkach zwierzęcych, natomiast w komórkach roślin znamy jak dotąd jedynie mniej lub bardziej szczegółowe informacje dotyczące dwóch takich szlaków sygnałowych: receptora flagelinowego, uczestniczącego w uruchamianiu reakcji obronnych, oraz receptora brassinosteroidów. Badając proces internalizacji fototropiny 2 Doktorantka wykazała, że w ciemności białko phot2 jest zlokalizowane w błonie komórkowej, natomiast jego aktywacja bodźcem świetlnym prowadzi do relokalizacji i utworzenia licznych drobnych struktur fluoryzujących w cytoplazmie. Dalsze doświadczenia, zwłaszcza kolokalizacja z markerami struktur subkomórkowych, pozwoliły wysnuć wniosek, że phot2 ulega internalizacji i lokalizuje się w endosomach. Co ciekawe, receptor nie jest kierowany do degradacji w wakuoli, a wręcz jest stabilizowany. Wykorzystując ukierunkowaną mutagenezę Doktorantka udowodniła również pośrednio, że kluczowa reszta seryny w domenie kinazowej phot2 jest niezbędna do tego, by proces internalizacji w ogóle zaszedł. W kilku doświadczeniach farmakologicznych stwierdziła, że dla procesu endocytozy phot 2 ważna jest obecność właściwych fosfatydyloinozytoli, oraz że mechanizm internalizacji w wielu aspektach przypomina mechanizmy znane z wcześniejszych badań komórek zwierzęcych i roślinnych, zwłaszcza w kontekście tworzenia samego pęcherzyka endocytotycznego.

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam jako całość bardzo wysoko. Czyta się ją znakomicie i z dużym zainteresowaniem. Wywód poprowadzony jest logicznie, doświadczenia dobrze zaplanowane i jeszcze lepiej wykonane. Jak zwykle jednak, w pracy pojawiają się jednak momenty, które chciałoby się przedyskutować na żywo, lub takie, które można uważać za drobne potknięcia. Chciałbym wskazać niektóre z nich i porozmawiać o nich w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

DYSKUSJA PRZEDSTAWIANYCH ZAGADNIEŃ LITERATUROWYCH

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek
ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 5972, fax. +48 61 829 5949
przemow@amu.edu.pl

www.molcell.amu.edu.pl



- Jakiś czas po artykułach wspomnianych na stronach 19 i 20, a dotyczących udziału miozyny VIII w ruchu chloroplastów, opublikowano kilka prac, które wskazują na znaczenie miozyn z klasy XI w przemieszczaniu organelli. Chciałbym prosić Doktorantkę o komentarz i ocenę obecnego stanu wiedzy o roli różnych klas miozyn w ruchu wewnątrzkomórkowym u roślin.
- Mam wątpliwości, czy można używać określenia „signaling proteins” w odniesieniu do białek związanych z ruchem plastydów (str. 20-21, w tym Tabela 2), z których większość jest białkami oddziałującymi z aktyną.
- Zabrakło mi nieco szerszego omówienia fosfatydyloinozytoli (str. 22 i następne), a zwłaszcza pozycji PI(4,5)P2 na tle innych cząsteczek tej klasy, znaczenia ich lokalizacji subkomórkowej itp. Chciałbym prosić Doktorantkę o nieco szersze omówienie.
- Nie do końca zgadzam się ze sformułowaniem wynikającym z sekwencji dwóch zdań (str. 27) opisujących dane uzyskane przez Tana i Bossa (1992). Z pierwszego zdania wynika, że u roślin wykazano związek fosfatydyloinozytoli z aktyną F, a z drugiego, że z aktyną są związane enzymy obrabiające tę klasę lipidów. O ile zmiany aktywności enzymów zależne od związania z aktyną są znane, to nie kojarzę wyników, które wskazywałyby na występowanie w cząsteczkach aktyny domen wiążących lipidy. Proszę uprzejmie o komentarz.

DYSKUSJA MERYTORYCZNA STOSOWANYCH METOD

- Jednym z ważniejszych punktów prowadzonych badań było określenie zmian zawartości PI(4,5)P2. Analizy te wykonywano przy użyciu komercyjnego testu Elisa. Mam w związku z tym dwa pytania:
 - Proszę dokładniej opisać technikę ekstrakcji lipidów, gdyż procedura zawarta w rozprawie jest bardzo ogólnikowa.
 - Czy wybór techniki Elisa był podyktowany jakimiś szczególnymi wymaganiami? Czy nie można było wykonać tych analiz technikami ilościowymi, np. GC-MS lub LC-MS?
- Ko-immunoprecypitacja została wykorzystana do potwierdzenia wyników uzyskanych technikami mikroskopowymi. Tym samym zarysowana została również szansa, na identyfikację dodatkowych białek oddziałujących z badanymi białkami. Dlaczego z niej nie skorzystano, np. na drodze analiz MS?

DYSKUSJA MERYTORYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW I ICH INTERPRETACJI

- Internalizację phot2 analizowano w komórkach epidermy oraz w protoplastach *Nicotiana benthamiana*. Zaobserwowano słaby sygnał zielonej fluorescencji w cytoplazmie. Tę obserwację weryfikowano metodą Western blot. Mam pewne wątpliwości, czy można uznać taki eksperyment za w pełni przekonujący i czy interpretacja wyniku może być tak zupełnie jednoznaczna. Procedura izolacji i wydzielenia dwóch frakcji: cytozolowej i mikrosomalnej jest raczej „ogólna”, i w zasadzie konieczne byłyby dodatkowe doświadczenia biochemiczne, by taki wniosek wesprzeć. Tu również nasuwa się pytanie dotyczące samego wyniku Western blot (ryc. 19). Jeżeli na żel nakładano identyczne ilości białka, to czym Doktorantka tłumaczy wyraźnie widoczne różnice ilościowe w intensywności prążków?
- W rozdziale 3.2a.3 Doktorantka analizuje interakcje phot2 z łańcuchami klatryny. Główny ciężar dowodowy spada na badania mikroskopowe z wykorzystaniem techniki BiFC, a w mniejszym również na analizy Western blot produktów ko-immunoprecypitacji. Interpretując jednak w tym miejscu wyniki Autorka stwierdza, że sygnał fluorescencyjny był obserwowany w błonie komórkowej oraz w „cytosolic



endosomal particles". Tymczasem żaden dowód przedstawiony w tym podrozdziale (ryciny 22-25) nie identyfikuje endosomów jako miejsca lokalizacji, a obrazuje powstawanie drobnych świecących ziarnistości. Lokalizacja w endosomach jest tematem rozdziału 3.2a.5 i dopiero tam takie dowody zostały zamieszczone. Na jakiej więc podstawie Autorka wcześniej wyciąga takie wnioski?

- Rozważając powód internalizacji phot2 Doktorantka wskazuje, że może nim być defosforylacja aktywnej postaci białka i dla wsparcia tej tezy pokazuje wynik analizy Western blot (rys. 32). Niestety, nie mogę powiedzieć, że wynik tego doświadczenia mnie przekonuje. Wysnuwanie wniosku o fosforylacji/defosforylacji jedynie na podstawie zmian w ruchliwości białka jest dość ryzykowne. Czy nie można było wykorzystać przeciwnie rozpoznających np. fosfoserynę?
- Dyskutując uzyskane wyniki Doktorantka odnosi się do braku zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego pod wpływem neomycyny i wskazuje, że być może wykorzystanie innych technik znakowania aktyny dałoby bardziej dokładne wyniki. Chciałbym prosić Doktorantkę o przeanalizowanie dostępnych informacji o znakowaniu aktyny *in vivo* i przedstawienie swojej „metody z wyboru”.

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ ROZPRAWY

Praca jest przygotowana starannie, zwłaszcza w warstwie ilustracyjnej. Widać bardzo dobre opanowanie umiejętności pisanie prac i ilustrowania ich właściwie dobranym materiałem. Co więcej, praca napisana jest jasnym i w miarę poprawnie używanym językiem, co przy tak trudnych do omówienia zagadnieniach jest dużym osiągnięciem. Niemniej Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów, z których najważniejsze, **ale nie wymagające dyskusji**, pozwałam sobie zawrzeć poniżej.

TERMINOLOGIA

- Całkowicie błędnie opisano EGTA (str. 26: „...a chemical agent which blocks Ca^{2+} influx from PM”), przypisując mu nie mechanizm działania, ale jego skutki. Poza tym, wapń nie wpływa do komórki z błony, lecz z apoplastu w poprzek błony.

JĘZYK ROZPRAWY

- Jako, że rozprawa została przygotowana w języku angielskim, zarówno dla piszącej, jak i dla oceniającego jest to praca pisana w języku obcym. Muszę od razu podkreślić, że dla mnie, jako redaktora kilku czasopism angielskojęzycznych i tłumacza książek, język rozprawy jest językiem bardzo poprawnym, choć nie wolnym od drobnych błędów, które można tu zupełnie pominąć. Pojawiają się za to niekiedy wyrażenia żargonowe, których zdecydowanie w rozprawie doktorskiej należałoby unikać. Do takich zaliczam: „The protoplasts treated with tyr51 behaved normally. (str. 77)”; „...punctuate structures observed in *N. benthamiana* protoplasts supported the results obtained with epidermal cells” (str. 89); „...soluble phot2 was absent after high speed centrifugation.” (str. 89).
- Niekiedy pojawiają się takie swoiste „potworki” językowe, jak: „Endocytosis and its fate (str. 29)”; „The chemical agents used in studying endomembrane trafficking were first demonstrated in animal cells and from there they have entered into plant system. (str. 34)”; „*Agrobacterium* constructs were grown... (str. 50)

EDYCJA TEKSTU

- Choć praca jest zredagowana bardzo starannie, to w rozprawie nie powinny mieć miejsca sytuacje (na przykład rysunki: 2, 6, 7, 26), gdy ilustracja oraz opisująca ją legenda znajdują się na różnych stronach. O ile nie jest to szczególnie uciążliwe przy zapoznawaniu się z informacjami zawartymi we Wstępie, o tyle

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek
ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 5972, fax. +48 61 829 5949
przemow@amu.edu.pl



taki układ bardzo psuje możliwość szczegółowej analizy uzyskanych wyników, zwłaszcza mikroskopowych.

- Godnym pochwalenia jest pomysł, by odniesienia literaturowe wyróżniać innym kolorem czcionki. Za tym jednak nie poszedł pomysł uporządkowania systemu cytowań, gdyż w pracy, zwłaszcza przy kilku odniesieniach, nie można zauważyć ani porządku alfabetycznego, ani chronologicznego (np. str. 27, czy 93).

OPIS MATERIAŁÓW I METOD

- Pod jednym względem opis nieco odbiega od przyjętych standardów. Właściwie z bardzo nielicznymi wyjątkami, stosowane w pracy metody są opisane bez odniesień literaturowych do publikacji źródłowych. O ile mogę zrozumieć takie postępowanie w przypadku np. elektroforezy białek, to już metoda ich ekstrakcji, czy też technika uzyskiwania protoplastów powinny być opisane wraz z cytowaniem właściwej literatury.
- W pracy pojawia się drobna, ale istotna nieścisłość opisu. Na str. 51 mikroskop Nikona opisany jest jako NIS. System konfokalny Nikona to A1-Rs, natomiast NIS jest oprogramowaniem do sterowania i obróbki danych.

OPIS WYNIKÓW

- Ponieważ analizy mikroskopowe były wykonywane na różnych mikroskopach, przyznam, że chętnie widziałbym w opisach zdjęć mikroskopowych informację, na którym systemie uzyskano konkretny wynik.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani Chhavi Aggarwal podejmuje ambitne wyzwanie znalezienia odpowiedzi na kilka ważkich pytań dotyczących mechanizmów przekazywania sygnały wywołanego bodźcem świetlnym przez fototropinę 2. Jej wyróżnikami są niewątpliwie: 1) bardzo rzetelne podejście metodyczne, oraz 2) ciekawe planowanie i wykonanie kolejnych doświadczeń z użyciem zróżnicowanego arsenału technik badawczych. W pracy Doktorantka jasno i przekonująco pokazała, że potrafi trafnie operować wiedzą teoretyczną i nabytymi umiejętnościami praktycznymi. Godnym podkreślenia jest również to, że badania Doktorantki były finansowane nie tylko ze środków programu ITN Marie Curie 7. Programu Ramowego Unii Europejskiej, ale również ze środków projektu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki. **Konkludując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia całkowicie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani Chhavi Aggarwal do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzących do nadania stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.**

P. Wojtaszek