

Warszawa, 15.07.2014r.

prof. dr hab. Bożena Zakryś
Zakład Systematyki
i Geografii Roślin,
Wydział Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego
tel.: + 48 22 5530550
e-mail: zakrys@biol.uw.edu.pl



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Przemysława Gagata
pt. „Evolution of protein transport systems in primary plastids and *Paulinella* chromatophores”**

Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Mackiewicza w Zakładzie Genomiki, na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego; promotorem pomocniczym jest dr Andrzej Bodył.

Powstanie nowych organelli komórkowych, takich jak plastydy (chloroplasty), u wspólnego przodka supergrupy Archaeplastida (wcześniej Plantae, rośliny) było wydarzeniem kluczowym dla ewolucji całego świata żywego na Ziemi. W procesie „zniewolenia” endosymbiotycznej sinicy, która ostatecznie uległa przekształceniu w plastyd (znany jako plastyd pierwotny) możemy wyróżnić dwa niezwykle ważne procesy. Pierwszym z nich był horyzontalny transfer genów z genomu sinicy do genomu komórki gospodarza; w efekcie zmieniło się miejsce syntezy większości białek pochodzenia endosymbiotycznego. Drugim procesem było wykształcenie systemu, który umożliwiał transport licznych, syntetyzowanych w cytoplazmie gospodarza białek do właściwego miejsca ich działania tj. plastydów. Procesy te działy się w bardzo odległym czasie, dlatego badanie ich współcześnie jest dużym wyzwaniem. Szczęśliwie, w chwili obecnej dysponujemy coraz większą liczbą danych na temat genomów jądrowych i organellarnych organizmów fotosyntetyzujących oraz coraz większą wiedzą na temat funkcjonowania plastydów u różnych przedstawicieli Archaeplastida (głaukofitów, krasnorostów, zielenic, rośliny wyższych) oraz innych fotoautotroficznych eukariontów.

W poznawaniu ewolucji plastydów ogromną rolę pełnią narzędzia bioinformatyczne, które umożliwiają złożoną analizę gromadzonych danych. Takimi właśnie narzędziami posłużył się Doktorant i skutecznie wykorzystał je w swoich badaniach, których przebieg oraz wyniki zaprezentował w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Ocena formalna struktury pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne i redakcyjne właściwe dysertacji naukowej. Treść całej rozprawy ma objętość 121 stron maszynopisu, w tym: 101 stron tekstu, wykaz piśmiennictwa (343 pozycje o szerokim spektrum tematycznym), przypisy zawierające wykaz publikacji związanych z pracą (4) oraz innych publikacji i wystąpień konferencyjnych Doktoranta. Rozprawa napisana jest w języku angielskim, ale streszczenie i wnioski mają również wersję polską. Praca ma typowy układ rozdziałów tj. Wstęp, Cele badań, Materiał i Metody oraz Wyniki połączone z dyskusją; uzupełnieniem tekstu jest 6 tabel i 21 kolorowych rycin. Treść pracy odpowiada tematowi określone w tytule.

Ocena merytoryczna pracy

1. Wstęp liczy 21 stron i jest podzielony na liczne podrozdziały, w których Autor przedstawił podstawowe informacje na temat pochodzenia, struktury oraz funkcji plastydów pierwotnych. Opisał również fotosyntetyczne organelle komórkowe (chromatofory) pochodzenia sinicowego u *Paulinella chromatophora*, które zostały nabyte niezależnie od plastydów pierwotnych. W bardzo interesujący sposób zostały scharakteryzowane systemy transportu białek do plastydów pierwotnych oraz mechanizmy transportu pęcherzykowego zachodzącego przez system wewnątrz błonowy, tj. retikulum endoplazmatyczne (ER) i/lub aparat Golgiego. Podsumowana została również wiedza na temat transportu białek do chromatoforów *Paulinella chromatophora*. W odrębnym podrozdziale Autor przedstawił hipotezę, z którą polemizuje w dalszej części pracy. Zakłada ona, że pierwotny mechanizm importu białek do plastydów pierwotnych wykorzystywał system wewnątrz błonowy.

Omawiane zagadnienia są bogato ilustrowane oryginalnymi, kolorowymi schematami, które nie tylko ułatwiają zrozumienie omawianych zagadnień, ale są prawdziwą ozdobą tekstu. Jest to gotowy materiał do publikacji polskojęzycznej skierowanej do szerokiego grona odbiorców (uczniów, nauczycieli, studentów), na co usilnie namawiam Autora.

Podsumowując tę część pracy – nie mam wątpliwości, że wiedza Doktoranta na temat wspomnianych problemów jest imponująca i bardzo aktualna, a sposób jej prezentacji prosty i zrozumiały.

2. Cele. W tym rozdziale Doktorant przedstawił cele swojej pracy, jakimi były: (1) weryfikacja wspomnianej hipotezy sugerującej, że transport białek do plastydów pierwotnych z wykorzystaniem

systemu wewnątrzłonowego wyewoluował zanim pojawił się system oparty na translokacjach Toc/Tic; (2) poszukiwanie potencjalnych dróg importu białek do chromatoforów *Paulinella*.

Cele pracy zostały sformułowane poprawnie i jednoznacznie.

3. Materiał i metody. W rozdziale trzecim, poświęconym metodyce, Doktorant opisuje bazy danych, z których czerpał informacje oraz metody bioinformatyczne i filogenetyczne wykorzystywane w pracy. W przypadku analiz filogenetycznych Doktorant postępował zawsze wg ściśle przyjętej strategii: (1) wyczerpujące poszukiwanie homologów w bazach danych, (2) przygotowanie alignmentu, (3) wybór metody analizy, (4) wybór oprogramowania dla konkretnej analizy, (5) wybór modelu substytucji, (6) analiza, (7) szacowanie współczynników wsparcia, (8) testowanie topologii. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wszelkie wybory podjęte przez Autora co do przeszukiwanych baz danych, narzędzi do przygotowywania alignmentów i typowania modeli substytucji, metod analizy i jej testowania były prawidłowe, a uzyskane wyniki wiarygodne. Różnice w szczegółowym podejściu do zbiorów danych odmiennych typów świadczą o niezwyklej rzetelności Autora, dbałości o jakość oszacowań oraz o potrzebie wyeliminowania wszelkich potencjalnych błędów i arbitralnych decyzji.

Kolejnym typem analiz przeprowadzonych przez Autora było poszukiwanie presekwencji aminokwasowych sugerujących konkretną lokalizację białek. W tym przypadku należy również stwierdzić, że analiza została przeprowadzona rzetelnie. Autor wykorzystywał praktycznie wszystkie narzędzia dostępne do takiej analizy, co znowu wskazuje na wysoką jakość jego pracy.

3. Wyniki i dyskusja.

W pierwszej części Autor zaprezentował efekty analiz filogenetycznych dla białek kierowanych do plastydów pierwotnych za pośrednictwem systemu wewnątrzłonowego. Uzyskane drzewa filogenetyczne mają w wielu miejscach niestabilne gałęzie i dlatego tłumaczenie Autora tej niespodziewanej topologii horyzontalnym transferem genów jest w kilku przypadkach nieprzekonywujące. Dotyczy to przede wszystkim analiz dla fosfataz – umiejscowienie grupy heterotroficznyc eukariontów w obrębie roślin lądowych (klad B) wcale nie jest dobrze wsparte jak sugeruje Autor. Jest całkiem prawdopodobne, że właściwa pozycja tej grupy znajduje się u podstawy kladu roślinnego. Jednak co najważniejsze, oszacowania filogenetyczne wskazują jednoznacznie na brak bezpośredniego pokrewieństwa białek roślinnych z sinicowymi, dlatego wnioskowanie Autora na temat ich pochodzenia jest jak najbardziej słuszne.

W drugiej części zaprezentowane zostały wyniki badań nad importem białek do chromatoforów *Paulinella chromatophora*. Autor wskazał α -sinice z rodzaju *Cyanobium* jako najbliższych krewnych

endosymbiotycznych chromatoforów oraz przedstawił wyniki poszukiwań homologów białek tworzących translokony TOC i TIC w proteomie chromatoforowym, a także wyniki poszukiwania presekwencji, które mogłyby być odpowiedzialne za kierowanie białek syntetyzowanych w cytoplazmie gospodarza do chromatoforów. Przedyskutowany został także problem nabycia przez te białka (w toku ewolucji) odpowiednich sekwencji kierujących. Na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowany został model importu białek do chromatoforów, który zakłada, że pokonanie zewnętrznej błony fosfolipidowej jest możliwe dzięki transportowi pęcherzykowemu, natomiast za transport przez błonę wewnętrzną odpowiada system przypominający uproszczony translokon TIC. W tym miejscu na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że przewidywania Autora zostały już potwierdzone eksperymentalnie przez inną grupę badawczą, co jest kolejnym świadectwem jakości jego pracy.

Rozdział czwarty kończy się bardzo dojrzałą dyskusją podsumowującą ewolucję systemów importu białek do organelli fotosyntetyzujących pochodzenia sinicowego, gdzie Autor przedstawia nie tylko podobieństwa, ale przede wszystkim różnice pomiędzy systemami transportu do plastydów pierwotnych i chromatoforów *Paulinella chromatophora*.

W kolejnym, piątym rozdziale przedstawione są wnioski, jakie Autor sformułował na podstawie przeprowadzonych przez siebie doświadczeń i badań literaturowych. Nie mam wątpliwości, że są one poprawne; dotyczy to także punktu 8 odnoszącego się do zaobserwowanych horyzontalnych transferów genów – w tym miejscu podkreślone zostały tylko takie wydarzenia, które rzeczywiście mają potwierdzenie w uzyskanych oszacowaniach filogenetycznych.

Ostatnim rozdziałem pracy jest bibliografia, która liczy aż 343 bardzo dobrze dobrane pozycje, co jest świadectwem ogromnej wiedzy Doktoranta, jak również świadczy, podkreślam to po raz kolejny, o bardzo wysokiej jakości przeprowadzonych przez niego badań.

Podsumowując: praca doktorska mgra Przemysława Gagata jest znakomitym dziełem ukazującym ewolucję systemów importu białek do organelli fotosyntetyzujących w nowym świetle. Jego badania nie tylko kwestionują uznawane dotychczas teorie (zwłaszcza Bhattachatya i wsp. 2007), ale wnoszą mnóstwo nowych informacji do naszej wiedzy o ewolucji plastydów i chromatoforów. Autor wykazał przede wszystkim, że transport za pośrednictwem systemu wewnątrzblonowego nie był mechanizmem pierwotnym, obecnym u wspólnego przodka Archaeplastida, a wyewoluował później, najprawdopodobniej dopiero u roślin wyższych, dla pewnej grupy białek o określonych parametrach. Zaproponował także model transportu białek do chromatoforów *Paulinella*, który w tej chwili jest weryfikowany eksperymentalnie – póki co pozytywnie. Drobne błędy, które pojawiają się w pracy (np. *Malawimonas californiana* na rysunku 12 powinien zostać oznaczony jako przedstawiciel

Malawimonads, nie Amoebas) nie są warte komentarza i w żadnym stopniu nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór pracy.

W związku z powyższym, uważam iż recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych (Dz. U. Nr 65/03 poz. 595) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgra Przemysława Gagata do dalszych etapów przewodu i nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. **Wnioskuję również o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą**, tym bardziej, że wszystkie wyniki zostały już opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.



(Bożena Zakryś)