

Prof. dr hab. Elżbieta Wyroba
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Ocena rozprawy doktorskiej Mgr. Przemysława Gagata pt.
'Evolution of protein transport systems in primary plastids and *Paulinella*
chromatophores'.**

Celem rozprawy doktorskiej Pana mgr. Przemysława Gagata było poszukiwanie szlaków ewolucji systemów transportu białek w plastydach pierwotnych oraz importu białek do chromatoforów.

W toku ewolucji życia na Ziemi jednym z najważniejszych procesów była endosymbioza pierwotna – dotyczyła ona m.in. powstania plastydów pierwotnych zdolnych do fotosyntezy – które pojawiły się w wyniku tego procesu ('pochłonięcia') sinicy z grupy β -Cyanobacteria przez fagotroficznego eukarionta około 1.5 mld lat temu. Taki proces zaszedł ponownie całkiem niedawno (ok. 60 mln lat temu) u heterotroficznego przodka ameby *Paulinella chromatophora*, który nabył sinicę należącą do grupy α -Cyanobacteria. Dlatego też ten model badawczy jest niezwykle interesujący, a inspiracją do badań była m.in. hipoteza D. Bhattacharya i współpracowników o tzw. wczesnym transporcie do tych organelli przez system wewnątrz błonowy i inne publikacje – w tym E.C.M. Novak z 2008 roku w *Current Biology*, gdzie już tytuł publikacji dawał przedsmak rewolucji w poglądach: 'Chromatophore Genome Sequence of *Paulinella* Sheds Light on Acquisition of Photosynthesis by Eukaryotes'.

Recenzowana rozprawa doktorska (w języku angielskim) ma następujące rozdziały: Wstęp obejmuje 21 stron i jest wprowadzeniem zawierającym kilkanaście kolorowych ilustracji zebranych w 8 rycin. Szczególnie świetnie opracowana jest czteroczęściowa ryc.7 wskazująca na możliwe szlaki importu białek do chromatoforów *Paulinella chromatophora* oraz rycina 8 z 11-oma rysunkami historii ewolucji plastydów. Materiały z opisem programów bioinformatycznych to 7 stron, a Rezultaty wraz z Dyskusją zajmują 45 stron - w tym 13 rycin obejmujących zarówno drzewa filogenetyczne, wykresy hydropatii białek, jak i modele transportu – w tym przejrzysta

i interesująca rycina 21 złożona z wielu części. Podsumowanie i streszczenie jest w rozprawie zamieszczone w języku angielskim i polskim.

Należy zwrócić uwagę na niezwykle dużą liczbę cytowanych publikacji – jest ich aż 343. Pewną niedogodnością jest fakt niealfabetycznego cytowania bibliografii, co utrudnia poszukiwanie kolejnych publikacji tych samych autorów (np. artykułów autorstwa D. Bhattacharya jest 13) i śledzenie 'ewolucji' ich poglądów w miarę rozszerzania się baz danych m.in. z sekwencjonowania kolejnych genomów.

Do najważniejszych dokonań doktoranta należy wykazanie, że:

1. chromatofory i plastydy pierwotne *Paulinella* mają odmienne pochodzenie: te pierwsze od α -sinic (pokrewnych *Cyanobium*), a drugie z wczesnych linii β -sinic i zostały nabyte niezależnie;
2. cztery z analizowanych białek (CAH1, NPP1, α Amy3 i α Amy7) znane u roślin wyższych jako docierające do plastydów pierwotnych na drodze transportu pęcherzykowego (co wykazali doświadczalnie inni badacze) nie pochodzą z endosymbiozy sinic, lecz wywodzą się od białek eukariotycznych (gospodarza) i dotarły tam poprzez system wewnątrz błonowy, ponieważ wymagają glikozylacji lub/i są transportowane nie tylko do jednego kompartmentu komórkowego;
3. RB60, specyficzne białko z zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*, kierowane za pomocą peptydu sygnałowego zarówno potranslacyjnie do plastydów pierwotnych (poprzez system Toc-Tic) i kotranslacyjnie do siateczki śródplazmatycznej, nigdy nie było importowane do plastydów w pęcherzykach systemu wewnątrz błonowego, gdyż posiada sygnał retencji (KDEL);
4. transport białek do plastydów pierwotnych zachodził od początku ewolucji plastydów pierwotnych poprzez kompleks Toc-Tic, który ulegał modyfikacjom;
5. pięć białek spośród 10-ciu, których geny zostały 'przetransferowane' z genomów chromatoforów *Paulinella* do genomu gospodarza (w tym białka istotne w fotosyntezie) posiada sekwencje sygnałowe (lecz pochodzące od tegoż gospodarza), co umożliwia transport wewnątrz błonowy do zewnętrznej błony chromatoforów;

6. nastąpił horyzontalny transferu genów m.in. pomiędzy roślinami i bakteriami czy pomiędzy roślinami i *Monosiga brevicolis*, co doktorant wykazał za pomocą wielu analiz filogenetycznych białek NPP1, αAmy3, αAmy7 i RB60.

Analizy filogenetyczne wzbudzają nadal wielkie i często burzliwe dyskursy naukowe – czego przykładem była debata na konferencji PROTIST 2012 w Oslo, organizowanej wspólnie przez 2 międzynarodowe towarzystwa (jako 62 spotkanie International Society of Protistologists i XIX International Society for Evolutionary Protistology. Konferencja ta - na którą byłam zaproszona - zgromadziła 216 badaczy z 4 kontynentów. Symposium pt. *'Phylogeny and classification'* było najdłuższe – podzielone na 2 sesje trwało ponad 6 godzin. Dyskutowano m.in. nad nowymi metodami klasyfikacji gatunków w oparciu o sekwencjonownie Illumina, używanie bazy danych TaxCollector-modified NCBI, wyborze genów do drzew filogenetycznych, a także o nowych technikach obrazowania w celu porównania morfologii komórek.

Z obowiązku recenzenta należy wskazać, że nieprawidłowe jest użycie w rozprawie sformułowania 'retikulum endoplazmatyczne', gdyż od lat stosowana jest forma 'siateczka śródplazmatyczna' zalecana też przez 'Słownik biochemiczny angielsko-polski i polsko-angielski' Edwarda Bańkowskiego (Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011). Kolejnym błędem jest użycie określenia 'posttranslacyjne' w tekście polskim zamiast 'potranslacyjne'. Te uchybienia nie wpływają na moją ocenę rozprawy.

Osiągnięcia naukowe doktoranta są imponujące: jest on współautorem 8 publikacji – w tym 4 z listy JCR związanych z tematyką pracy doktorskiej. Te wykraczające poza rozprawę to dwa bardzo obszerne artykuły w wydawnictwach Elsevier oraz Springer, artykuł w *Nucleus* i jedyna w jęz. polskim w tym zestawie: 39-stronicowy artykuł przeglądowy w *Biotechnologia* (brak jednak roku wydania). Ponadto w latach 2009 – 2013 cztery ustne prezentacje konferencyjne – w tym jedna nagrodzona 1-szą nagrodą oraz 11 posterowych. Mgr P.Gagat jest też kierownikiem grantu NCN.

Podsumowując: doktorant opracował szczegółowy model transportu białek do organelli fotosyntetycznych *Paulinella* dokonując szczegółowych analiz genomu tych chromatoforów, bazy sekwencji EST tej ameby oraz sekwencji kierujących w importowanych białkach.

Rozprawa doktorska Mgr. Przemysława Gagata spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 z późn. zm.).

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną i fakt, że wyniki zostały opublikowane w poniższych czterech publikacjach z listy filadelfijskiej:

- Gagat P, Bodyl A, Mackiewicz P: How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. *Biol Direct* 2013, 8:18.
- Mackiewicz P, Bodyl A, Gagat P: Possible import routes of proteins into the cyanobacterial endosymbionts/plastids of *Paulinella chromatophora*. *Theory Biosci* 2012, 131:1-18.
- Mackiewicz P, Bodyl A, Gagat P: Protein import into the photosynthetic organelles of and its implications for primary plastid endosymbiosis. *Symbiosis* 2012, 58:99-107.
- Bodyl A, Mackiewicz P, Gagat P: Organelle evolution: *Paulinella* breaks a paradigm. *Curr Biol* 2012, 22:R304-306

Warszawa 16.lipca 2014

Rozprawa doktorska Mgr. Przemysława Gagata spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 z późn. zm.).

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną i fakt, że wyniki zostały opublikowane w poniższych czterech publikacjach z listy filadelfijskiej:

- Gagat P, Bodyl A, Mackiewicz P: How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. *Biol Direct* 2013, 8:18.
- Mackiewicz P, Bodyl A, Gagat P: Possible import routes of proteins into the cyanobacterial endosymbionts/plastids of *Paulinella chromatophora*. *Theory Biosci* 2012, 131:1-18.
- Mackiewicz P, Bodyl A, Gagat P: Protein import into the photosynthetic organelles of and its implications for primary plastid endosymbiosis. *Symbiosis* 2012, 58:99-107.
- Bodyl A, Mackiewicz P, Gagat P: Organelle evolution: *Paulinella* breaks a paradigm. *Curr Biol* 2012, 22:R304-306

Warszawa 16.lipca 2014


Prof. dr hab. Elżbieta Wyroba