

dr hab. Arkadiusz Kosmala
Zakład Biologii Stresów Środowiskowych
Instytut Genetyki Roślin PAN
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, dnia 26 stycznia 2015 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr. Pawła Rodziewicza pt. „Analiza proteomiczna liści jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) – poszukiwanie potencjalnych biomarkerów odporności na suszę”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Pawła Rodziewicza została wykonana w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Macieja Stobieckiego (promotor) i dr. Łukasza Marczaka (promotor pomocniczy). Obaj promotorzy mają bardzo bogate doświadczenie w prowadzeniu badań wykorzystujących spektrometrię mas, w tym również badań związanych z analizą proteomu. Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę” i doskonale wpisuje się w jego tematykę badawczą. Warto podkreślić to, że Pan mgr P. Rodziewicz jest stypendystą w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej, co wskazuje na duży potencjał strategiczny badań prowadzonych przez Doktoranta.

Obiektem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) – jedno z najpowszechniej uprawianych zbóż na świecie, w tym również w Polsce. Jęczmień uznaje się także za roślinę modelową dla zbóż w badaniach z zakresu szeroko rozumianej biologii roślin, w tym biologii tolerancji stresów środowiskowych. W niniejszej pracy wybrane formy jare jęczmienia zwyczajnego zostały wykorzystane jako model do poznania reakcji tego gatunku na deficyt wody w glebie, w oparciu o analizę zmian w proteomie liścia, ważnego organu roślinnego, zaangażowanego m.in. w prowadzenie wymiany gazowej (w tym transpirację i asymilację CO₂) oraz fotosyntezę – a więc istotne procesy metaboliczne. Rozumiem, że głównie z tych powodów Doktorant wybrał liść jako przedmiot swoich badań. W kontekście szerszych prac prowadzonych w ramach projektu POLAPGEN i w ewentualnych kolejnych projektach, warto by rozważyć również badanie korzenia i reakcji tego organu na stres deficytu wody, także w ujęciu proteomicznym, prezentowanym w pracy doktorskiej. Moim zdaniem, główne cele prowadzonych przez Doktoranta badań to: (i) proteomiczna analiza porównawcza liści siewek jęczmienia jarego wzrastającego w warunkach niedoboru wody i w warunkach kontrolnych oraz (ii) identyfikacja białek o różnym poziomie akumulacji w warunkach stresu i w warunkach kontrolnych. Cele te są realizowane przy zastosowaniu różnych podejść metodycznych, do których nawiążę później. Cel przedstawiony w rozprawie doktorskiej w sposób nie dość jasny oddaje to, co zostało opisane w dalszych rozdziałach pracy. Ponadto, na tym etapie analizy rozprawy nie wiadomo, czym charakteryzowały się formy jęczmienia wykorzystane w badaniach i dlaczego właśnie one zostały wybrane jako obiekty badawcze. Trzeba tutaj również podkreślić to, na co słusznie zwraca uwagę sam Doktorant, że celem pracy nie była identyfikacja biomarkerów związanych z odpornością jęczmienia na suszę, lecz wytypowanie białek, które ewentualnie mogą takimi biomarkerami być. Wybór biomarkerów będzie możliwy dopiero po uwzględnieniu wyników innych badań

prorowadzonych na tym samym materiale roślinnym w ramach projektu, w tym analiz transkryptomu i metabolomu, ale przede wszystkim analiz związanych z parametrami fizjologicznymi, opisującymi poziom odporności poszczególnych form jęczmienia na stres deficytu wody. Ważne w tym ujęciu będą również parametry charakteryzujące plonowanie poszczególnych genotypów, w tym genotypów z populacji pokolenia F₈ zarówno w warunkach deficytu wody, jak i w warunkach kontrolnych. **Analizy przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej stanowią więc z jednej strony odrębny, ściśle wydzielony fragment szerszych badań, z drugiej zaś strony, głównie ze względu na możliwość rozpoznania kompleksowej reakcji jęczmienia na stres deficytu wody w glebie, są one ich niezbędnym elementem.** Niewątpliwie bardzo dużym atutem rozprawy doktorskiej jest solidna analiza statystyczna, wykonana przy współpracy z prof. dr hab. Pawłem Krajewskim z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, uznanym autorytetem w tej dziedzinie.

We wprowadzeniu literaturowym przedstawione zostały wszystkie zagadnienia niezbędne do zrozumienia istoty prowadzonych prac badawczych. Bogaty, a w niektórych fragmentach tego rozdziału detaliczny opis daje pewność, że Doktorant doskonale orientuje się w tematyce prowadzonych badań, a w konsekwencji umożliwia czytelnikowi śledzenie kwestii poruszanych w dyskusji i pełne zrozumienie uzyskanych przez Doktoranta wyników. Stawiana w rozprawie doktorskiej hipoteza badawcza zakłada, że reakcja wybranych form jęczmienia na deficyt wody znajdzie swoje odbicie w zmianach na poziomie proteomu, a niektóre zidentyfikowane białka o różnym poziomie akumulacji w warunkach stresowych i kontrolnych, będą mogły stanowić markery odporności na suszę. Wprowadzenie literaturowe rozprawy doktorskiej pokazuje, że reakcja rośliny na stres suszy jest bardzo złożona i może być rozpatrywana na wielu poziomach. Doktorant zdaje sobie sprawę z tego, że analizuje tylko wybrane komponenty kompleksowej odpowiedzi jęczmienia na deficyt wody i że przy wykorzystaniu proponowanych narzędzi, zidentyfikuje tylko niektóre białka liścia, charakteryzujące się różnym poziomem akumulacji w warunkach stresowych i kontrolnych u tego gatunku. W rozdziale *Wprowadzenie literaturowe* przytrafiły się Autorowi drobne uchybienia językowe i niejasności merytoryczne m.in.: (i) dość często stosowany jest zwrot „odpowiedź na suszę” wymiennie ze zwrotem „odporność na suszę” – to jednak nie to samo. Rośliny, które nie wykazują odporności lub wykazują niski poziom odporności również reagują na stres suszy. W wyniku reakcji rośliny na suszę zmienia się poziom akumulacji licznych białek, ale nie wszystkie te białka są zaangażowane w wykształcenie odporności na suszę. Równie istotne jest rozróżnianie pojęć „odporność na suszę” i „tolerancja suszy” – pierwsze z tych pojęć jest szersze i obejmuje także m.in. unikanie suszy i ucieczkę przed suszą; (ii) „zimno” (str. 9.) nie jest stresem abiotycznym, lecz subiektywnym odczuciem przez człowieka niskiej temperatury lub chłodu; (iii) czy aparaty szparkowe są zamykane, w celu ograniczenia ewapotranspiracji, czy transpiracji (str. 28.)? (iv) rozdział białek następuje w żelu poliakryloamidowym, a nie na żelu ‘poliakrylamidowym’; Moim zdaniem brak wysokiej powtarzalności pomiędzy elektroforegramami, często sygnalizowany w literaturze, wynika przede wszystkim z różnic w ilości ‘nakładanego’ na żel białka. Różnice te można do pewnego stopnia zniwelować dzięki normalizacji obrazu i uwzględnieniu w analizach tzw. znormalizowanej objętości plamek (relatywnej, względnej objętości). Należy zwrócić uwagę na to, że objętość plamki, względna objętość plamki, intensywność i względna intensywność plamki to różne parametry i nie należy ich stosować wymiennie. Ponadto, dwukierunkowa elektroforeza nie jest dobrą metodą do określenia masy cząsteczkowej i punktu izoelektrycznego białka, co dość często jest widoczne w postaci rozbieżności pomiędzy parametrami obserwowanymi na obrazach 2-D i dostępnymi w bazach danych.

Opis stosowanych metod badawczych podkreśla nie tylko kompetencje Doktoranta, ale też prawidłowość wyboru stosowanych metod do realizacji założonego celu badań. Nasuwają się jednak pytania i uwagi natury technicznej, dotyczące elektroforezy dwukierunkowej: dlaczego zastosowano paski żelowe o długości 11 cm i o zakresie pH 4-7? Czy dokonano tego na podstawie wcześniejszej preselekcji? Moja ocena obrazów 2-D w rozprawie doktorskiej jest jak najbardziej pozytywna, ale wydaje się, że długość 24 cm mogłaby poprawić rozdzielczość uzyskiwanych żeli, zwłaszcza, że na str. 92 rozdziału *Wyniki* Doktorant podaje, że nie wszystkie białka można było zidentyfikować u wszystkich analizowanych genotypów ze względu na ich niedostateczny rozdział w żelu. Metoda ekstrakcji białek, zwana metodą fenolową (Hurkman i Tanaka 1986), pozwala uzyskać szerokie spektrum białek, m.in. białka membranowe i białka organelowe, w tym białka chloroplastowe, a nie tylko białka cytoplazmatyczne, jak podaje Doktorant w tytule rozdziału 3.3 i w rozdziale 3.4. Jest to z resztą bardzo dobrze widoczne w wynikach opisanych w rozprawie doktorskiej (np. w Tabeli S1). Pozostaje nadal pewien niedosyt w opisie materiału roślinnego. Również na tym etapie analizy rozprawy nie wiadomo, czym charakteryzowały się formy jęczmienia wykorzystane w badaniach i dlaczego właśnie one zostały wybrane jako obiekty badawcze. Ponadto, brakuje tutaj charakterystyki (opisu) warunków środowiskowych, w których prowadzono eksperymenty związane z aplikacją deficytu wody w doniczkach, a zwłaszcza informacji o temperaturze i natężeniu światła. Jest to ważne nie tylko z punktu widzenia możliwości powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń, lecz również interpretacji uzyskiwanych wyników. Informacja podana w rozprawie, że warunki te były tylko częściowo kontrolowane, nie do końca daje pewność, że obserwowane różnice w poziomie akumulacji białek były jedynie skutkiem deficytu wody w podłożu. Materiał roślinny do badań zbierany był po 10 dniach od rozpoczęcia suszy (dlaczego akurat po takim okresie trwania stresu?). Analizowano więc poziom akumulacji białek i identyfikowano różnice pomiędzy warunkami stresowymi i warunkami kontrolnymi w jednym punkcie czasowym eksperymentu, co ze względu na znaczną liczbę obiektów badawczych (104), dla których uzyskano mapy białkowe 2-D, wydaje się być w pełni uzasadnione. Należy jednak jednocześnie zdawać sobie sprawę z tego, że obraz proteomu w innym punkcie czasowym stresu suszy może być inny, a identyfikowane białka różnicujące również do pewnego stopnia odmienne. Interesujące jest również to, jak wyglądałby poziom akumulacji identyfikowanych białek po powtórnym nawodnieniu roślin, czy byłby podobny do poziomu obserwowanego w warunkach kontrolnych, czy też inny. Chciałbym w tym miejscu podkreślić duży nakład pracy włożony przez Doktoranta, celem uzyskania map białkowych 2-D, będących podstawą do analizy poziomu akumulacji białek. Dla każdego ze 104 analizowanych genotypów uzyskano osiem żeli (2 powtórzenia biologiczne $\times$ 2 powtórzenia techniczne $\times$ warunki kontrolne/warunki stresowe), co dało w sumie 832 elektroforegramy.

Część wynikowa rozprawy doktorskiej została podzielona na dwa rozdziały: 4.1 *Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych* oraz 4.2 *Analiza proteomiczna populacji mapującej*.

Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych

W rozdziale tym dokonano krótkiej charakterystyki materiału roślinnego, ale nie rozwiewa ona do końca wątpliwości związanych z wyborem roślin do analiz. Doktorant podaje, że obie odmiany referencyjne – Sebastian i Stratus „charakteryzują się przypuszczalnie niską tolerancją na deficyt wody”, powołując się na pracę Łukowskiej i Józefaciuka (2013), w której to przypuszczenie jest podtrzymane. Natomiast linię hodowlaną Cam/B1/C1 i odmianę Maresi charakteryzuje jako te, które w warunkach deficytu wody „odznaczały się

dość wysokim indeksem odporności na suszę”, powołując się na pracę Górnego (2001). Ponadto, Doktorant zamieszcza Ryc. 4.2, na której porównuje fenotyp Cam/B1/C1 i Maresi w warunkach kontrolnych i po 10 dniach okresu deficytu wodnego, wnioskując, że redukcja biomasy u Cam/B1/C1 w warunkach stresu była znacznie niższa. Ponieważ badania związane z selekcją materiału roślinnego, określeniem jego potencjału odporności na suszę i analizą fizjologicznych wskaźników tej odporności nie były elementem rozprawy doktorskiej, zakładam, że są one prowadzone w ramach innych zadań projektu POLAPGEN i będą dostępne na etapie identyfikacji proteomicznych markerów odporności na suszę u jęczmienia. Wyniki analiz proteomicznych przedstawione są w sposób dość szczegółowy zarówno opisowo, jak i w postaci tabel i rycin. Doktorant podaje, że łącznie obserwował ponad 1000 różnych plamek białkowych w obrębie wszystkich analizowanych elektroforegramów, a analiza statystyczna umożliwiła detekcję 218 białek o zmienionym w warunkach deficytu wodnego poziomie akumulacji, w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Chociaż w pracy nie zamieszczono wszystkich wariantów żeli 2-D, obrazujących mapy białkowe dla powtórzeń biologicznych i technicznych każdej analizowanej formy, to chociażby na podstawie Ryc. 4.7 (obraz plamek białkowych dla oksydoreduktazy NADP^+ : ferredoksyna) jestem w stanie stwierdzić wysoki stopień powtarzalności eksperymentalnej w zakresie 2-D elektroforezy. Oczywiście, analiz poziomu akumulacji białka nie wykonuje się na podstawie bezpośredniej obserwacji intensywności każdej z plamek w żelu, lecz w oparciu o znormalizowane objętości plamek – efekt takiej normalizacji można obserwować na wykresach Ryc. 4.7. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na to, że lepiej używać w tym aspekcie zwrotu „zmiana poziomu akumulacji” niż „zmiana profilu akumulacji” – analizowany był tylko jeden punkt czasowy zarówno w warunkach stresowych, jak i kontrolnych. Nie jest dla mnie jasne to, według jakiego systemu pogrupowane zostały białka pod względem pełnionych funkcji. Ponieważ systemy klasyfikacji są różne, należy powołać się na jeden konkretny lub podać odpowiednią pozycję literaturową. Największą grupę białek różnicujących warunki stresowe i kontrolne stanowiły białka związane z mechanizmami obronnymi (37%), należy jednak zdawać sobie sprawę z tego, że system klasyfikacji białek do poszczególnych grup nie do końca odzwierciedla ich funkcję. W przypadku białek związanych z fotosyntezą i metabolizmem węgla nie zawsze jest możliwe postawienie ostrej granicy w klasyfikacji. Doktorant podaje na przykład, iż metabolizm węgla to glikoliza i cykl Krebsa, ale asymilacja dwutlenku węgla i cykl Calvina to przecież też szlaki związane z metabolizmem węgla, a np. aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu bierze udział zarówno w glikolizie (aldolaza cytoplazmatyczna), jak i cyklu Calvina (aldolaza chloroplastowa); w rozprawie doktorskiej izoforma B aktywazy Rubisco została w Tabeli 4.7 sklasyfikowana jako białko związane z metabolizmem węgla, natomiast w Tabeli 4.10 jako białko związane z fotosyntezą. W przypadku niektórych identyfikowanych białek, np. C-końcowej hydrolazy ubikwityny 19, tzw. stopień pokrycia sekwencji kształtował się tylko na poziomie 1%, natomiast jednocześnie obserwowano dużą rozbieżność pomiędzy teoretyczną i wyznaczoną eksperymentalnie masą cząsteczkową tego białka. Białka takie zostały zidentyfikowane na podstawie homologii ich sekwencji aminokwasowej do białek innych gatunków, w tym m.in. *Arabidopsis thaliana* i *Medicago sativa*. Ale np. sekwencja białka z plamki nr 14 (Tabela 4.3) wykazywała tylko 1% pokrycia z sekwencją acetylotransferazy dihydrolipo-lizyny jęczmienia. Proszę o komentarz Doktoranta w tej kwestii. Spośród zidentyfikowanych białek na szczególną uwagę zasługuje izoforma B aktywazy Rubisco, charakteryzująca się wyższym poziomem akumulacji w warunkach deficytu wody u wszystkich czterech analizowanych form jęczmienia, czyli zarówno u tych, które uważane są za formy o wyższym poziomie odporności na suszę, jak i u tych o niższym poziomie odporności. Z drugiej strony, z tych właśnie względów, enzym ten może nie być dobrym markerem odporności na suszę. Na tym etapie pracy nie wiadomo jednak, czy stopień odporności pomiędzy formami Cam/B1/C1

i Maresi, a formami Sebastian i Stratus był skrajnie odmienny. Ponadto, z obserwacji fenotypowych form Cam/B1/C1 i Maresi, wynika, że same genotypy uznane w rozprawie za odporne na suszę, zachowują się odmiennie w warunkach deficytu wody, chociażby pod względem redukcji biomasy. Może mieć to związek m.in. z różnicą w intensywności fotosyntezy, w tym w poziomie asymilacji CO₂ pomiędzy tymi dwiema formami i/lub z różnicą w intensywności transpiracji, ale nie tylko. Pomocna byłaby tu analiza fluorescencji chlorofilu i parametrów wymiany gazowej. Inny enzym, syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu, zaangażowany w syntezę proliny, wykazał niższy poziom akumulacji w warunkach suszy u form Maresi, Sebastian, Stratus, w porównaniu z warunkami kontrolnymi, natomiast w przypadku linii Cam/B1/C1 nie obserwowano różnic w poziomie akumulacji tego białka w warunkach stresowych i kontrolnych. W tym przypadku należy brać pod uwagę również to, że badano tylko jeden punkt czasowy stresu suszy i nie można wykluczyć różnic w poziomie akumulacji enzymów, biorących udział w syntezie proliny we wcześniejszym okresie stresu. Ponadto, w przypadku enzymów istotny jest nie tylko ich poziom akumulacji, lecz również poziom aktywności – nie są to właściwości tożsame. Analiza poziomu akumulacji proliny u czterech analizowanych tutaj form jęczmienia z pewnością dostarczy kluczowych informacji niezbędnych do prawidłowego zinterpretowania wyników analiz proteomicznych. Na koniec drobna uwaga natury językowej – unikałbym skrótów myślowych typu: „poziom akumulacji uległ zmniejszeniu w Sebastianie” lub „izofomy tego białka w Stratusie”, zdecydowanie lepiej brzmiałoby sformułowanie: „izofomy tego białka u odmiany Stratus”.

Analiza proteomiczna populacji pokolenia F₈

Analiza proteomiczna 100 genotypów populacji pokolenia F₈ została wykonana w dwóch różnych podejściach metodycznych. W pierwszym, porównywano poziom akumulacji białek odrębnie dla każdego genotypu, w warunkach suszy i w warunkach kontrolnych. Ogółem wytypowano 1738 białek różnicujących proteom liścia pomiędzy tymi warunkami, a zidentyfikowano około 30% tych białek (dlaczego tylko tyle?). Białka sklasyfikowano pod kątem pełnionej funkcji w komórce roślinnej; najliczniejszą grupę białek stanowiły białka związane z mechanizmami obronnymi (26%). Było to podejście metodyczne zbliżone do tego, które zastosowano w przypadku analizy proteomicznej form Cam/B1/C1, Maresi, Sebastian i Stratus, z tym że w tym wypadku badania prowadzono na 100 genotypach. Na szczególną uwagę w grupie zidentyfikowanych białek zasługuje izoforma B aktywazy Rubisco oraz dwa białka wiążące światła retikulum endoplazmatycznego, których poziom akumulacji zwiększył się w warunkach suszy u większości analizowanych genotypów. Analiza statystyczna wykazała podobną reakcję tych trzech białek na stres suszy pomiędzy genotypami populacji pokolenia F₈ w układzie: aktywaza Rubisco-izoforma 1 białka wiążącego światło retikulum, aktywaza Rubisco-izoforma 2 białka wiążącego światło retikulum, izoforma 1 białka wiążącego światło retikulum-izoforma 2 białka wiążącego światło retikulum (Ryc. 4.10).

W drugim podejściu proteomicznym przeprowadzono niecelowaną analizę 100 genotypów populacji pokolenia F₈ oraz dwóch form rodzicielskich Cam/B1/C1 i Maresi. Analizę wykonano w oparciu o tzw. żele referencyjne uzyskane dla każdego genotypu populacji w pierwszym podejściu metodycznym. Z różnych względów, których nie będę tutaj omawiał, odrzucono 297 błędnie utworzonych zbiorów plamek białkowych, a wzięto pod uwagę 257 zestawów, które stanowiły bazę dla całościowej analizy zmienności proteomu w warunkach suszy w populacji pokolenia F₈. Na uwagę zasługuje wysoka powtarzalność rozdzielów elektroforetycznych w odniesieniu do powtórzeń technicznych (Tabela 4.12 oraz Ryc. 4.12B). Metody spektrometrii mas umożliwiły identyfikację 190 białek. Analiza wariancji wykazała, że dla wszystkich białek istniały statystycznie istotne różnice w poziomie

akumulacji dla wszystkich badanych genotypów populacji i genotypów rodzicielskich. Efekt suszy, czyli różnica pomiędzy wartością poziomu akumulacji w warunkach suszy i wartością w kontroli, był istotny statystycznie dla 147 białek. Interakcje pomiędzy genotypami populacji i suszą były istotne dla 84 białek. Zarówno efekt suszy jak i efekt interakcji był istotny dla 55 białek. Charakterystykę analizowanych białek przedstawiono w Tabeli 4.12. Co ciekawe, najwyższy dodatni efekt suszy był obserwowany dla izoformy B aktywazy Rubisco, dwóch lizoform białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego oraz białka szoku termicznego. Podobnie, najwyższy efekt interakcji genotyp $\times$ susza obserwowano dla izoformy B aktywazy Rubisco i dwóch izoform białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego. Analiza PCA dla efektu suszy ujawniła, że odległość w przypadku form Maresi i Cam/B1/C1 w odniesieniu do białek związanych z fotosyntezą jest niewielka. Analiza skupień wykazała, że różnice pomiędzy badanymi genotypami jęczmienia dotyczą przede wszystkim poziomu akumulacji danego białka, a nie kierunku tej zmiany, co jak twierdzi Autor rozprawy „świadczy o silnie konserwatywnej odpowiedzi proteomu na suszę u badanych genotypów jęczmienia”.

Podsumowując rozdział *Wyniki*, należy stwierdzić, że prezentowane w pracy dane mają przede wszystkim wysoki aspekt poznawczy. Na tym etapie badań ich potencjał aplikacyjny jest jednak ograniczony, co nie znaczy, że dalsze prace, wykorzystujące wyniki przedstawione przez Doktoranta, nie doprowadzą do uzyskania markerów odporności na suszę, możliwych do wykorzystania w procesie hodowlanym do selekcji genotypów o pożądanych cechach. Warto wziąć pod uwagę to, że system markerowy nie może opierać się na elektroforezie 2-D i spektrometrii mas, przede wszystkim ze względu na czasochłonność takich badań. Ponadto, wartość potencjalnych markerów odporności będzie musiała zostać oceniona również w warunkach suszy polowej. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są jednak bardzo dobrym punktem startowym do tego typu analiz. **Stwierdzam, że Autor zrealizował wszystkie stawiane w rozprawie doktorskiej cele.**

W rozdziale *Dyskusja* Doktorant dokonuje m.in. przeglądu zidentyfikowanych białek, stara się interpretować różnice w poziomie ich akumulacji i wysuwa hipotezy na temat potencjalnych funkcji tych białek w odniesieniu do odporności jęczmienia na suszę. Oczywiście nie będę w recenzji oceniał słuszności tych dociekań, bo nie mam ku temu podstaw, opierając się tylko na danych proteomicznych, ale chciałbym podkreślić fakt, że dyskusowanie uzyskanych wyników analiz proteomicznych w kontekście ekspresji odporności na suszę wymagało od Doktoranta rozległej wiedzy. Zwrócę uwagę na kilka, moim zdaniem, ważnych kwestii poruszanych w tym rozdziale. Autor rozprawy sugeruje na przykład, że główną funkcją izoformy B aktywazy Rubisco w warunkach suszy może być rola białka opiekuńczego dla białek tylakoidów, uczestniczących w fotosyntezie. Taką rolę pełniła aktywaza w stresie wysokiej temperatury u szpinaku (Rokka i in. 2001). I stąd moje pytanie, na ile kontrolowano warunki temperaturowe w trakcie prowadzenia eksperymentów? Czy Doktorant ma pewność, że podczas prowadzenia doświadczenia nie wystąpił stres wysokiej temperatury, wynikający np. z dodatkowego ogrzewania roślin, generowanego przez lampy, będące źródłem światła. Co ciekawe, w literaturze można znaleźć prace, które pokazują wyższy poziom akumulacji izoformy B aktywazy Rubisco również w warunkach stresu niskiej temperatury u form charakteryzujących się wyższym potencjałem mrozoodporności. Taką zależność zaobserwowano m.in. u traw kompleksu *Lolium-Festuca*, którymi się zajmuję. O potencjalnej roli aktywazy będzie można powiedzieć więcej po uzyskaniu wyników dotyczących poziomu asymilacji CO₂ w warunkach stresu. Podobnie jak i o efektywności cyklu Calvina. Tylko na podstawie obserwacji niższego poziomu akumulacji niektórych enzymów tego cyklu – aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego trudno wnioskować o wszystkich reakcjach fotosyntetycznej fazy niezależnej od światła. Chciałbym też zwrócić uwagę na inny aspekt badań, a dotyczący

integracji danych proteomicznych np. z danymi fizjologicznymi. Otóż, moim zdaniem, zbiór materiału roślinnego zarówno do analiz proteomu, jak i pomiarów fizjologicznych wskaźników odporności na suszę powinien mieć miejsce w trakcie tego samego eksperymentu. Tylko wtedy można mieć pewność, że charakteryzowane będą te same warunki środowiskowe zarówno stresowe, jak i kontrolne. I na koniec komentarza dotyczącego tej części rozprawy drobna uwaga językowa, należy unikać takich zwrotów żargonowych jak: „krzyżówka”, „względna ilość białka” oraz „ekspresja białka”.

Pan mgr P. Rodziewicz podsumowując rozprawę doktorską formułuje 10 wniosków. Moim zdaniem z wniosków nr 1, 2 i 5 można zrezygnować bez znacznego uszczerbku dla wartości rozprawy. Ponadto, wnioski powinny być tak przedstawione by były zrozumiałe bez konieczności czytania całej rozprawy, proszę więc o odpowiedź na pytanie, jak należy rozumieć wniosek czwarty w odniesieniu do wniosku szóstego.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej zaliczam:

- uzyskanie 832 wysokiej jakości elektroforegramów 2-D, umożliwiających analizę poziomu akumulacji białek w warunkach stresowych i kontrolnych,
- przeprowadzenie analizy porównawczej proteomu w warunkach kontrolnych i w warunkach deficytu wody oraz identyfikację różnic w poziomie akumulacji wybranych białek tak dla form rodzicielskich i referencyjnych, jak i 100 genotypów populacji pokolenia F₈ i form rodzicielskich,
- przeprowadzenie całościowej analizy (analizy niecelowanej) proteomu w warunkach kontrolnych i w warunkach deficytu wody dla 100 genotypów populacji pokolenia F₈ i form rodzicielskich; oszacowanie tzw. efektu suszy i interakcji genotyp × susza; analizę składowych głównych dla wyodrębnionych kategorii funkcjonalnych białek oraz analizę PCA dla efektu suszy,
- identyfikację tzw. „białek różnicujących” przy wykorzystaniu spektrometrii mas.

Na zakończenie chciałbym podkreślić to, że rozprawa doktorska Pana mgr. P. Rodziewicza mimo wskazanych przeze mnie uchybień i niejasności prezentuje wysoki poziom merytoryczny. Moje uwagi należy traktować jako wskazówki pomocne w czasie przygotowaniu publikacji. Autor wykonał ciężką pracę eksperymentalną i bioinformatyczną. Nie mam wątpliwości, że wyniki uzyskane przez Doktoranta mają szansę być opublikowane w dobrym czasopiśmie, zwłaszcza po ich integracji z wynikami badań fizjologicznych. Badania zmian w proteomie jęczmienia w warunkach deficytu wody były już prowadzone przez inne zespoły, ale nie na tak dużą skalę. Analiza niecelowana proteomu zasługuje w niniejszej rozprawie na szczególne wyróżnienie.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji pracy stwierdzam, że spełnia ona kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Pawła Rodziewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Arkadiusz Kosmala