

Prof. dr hab. Zbigniew Miszański
Instytut Fizjologii Roślin PAN
Kraków

Kraków, 02.01.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Dągmary Jakubowskiej pt. „Udział brassinosteroidów w adaptacji roślin do stresu wywołanego obecnością kadmu w środowisku”

Rozprawa doktorska mgr Dągmary Jakubowskiej koncentruje się na charakterystyce dwóch białek odpowiedzialnych za oddziaływanie metali ciężkich, a w szczególności kadmu, w tkankach relatywnie dobrze przebadanej rośliny ogórka. Opracowywany temat transportu i sposobu oddziaływania metali ciężkich w komórkach roślinnych był tematem wielu prac, jednak szczegóły umożliwiające zrozumienie wielu zjawisk związanych z odpornością roślin na działanie tego czynnika stresowego nie są poznane, a wybór tematu jest nowatorski i zasługuje na uznanie. Praca doktorska jest kontynuacją prac rozpoczętych wiele lat temu pod kierunkiem prof. Grażyny Kłobus i Doktorantka korzystała z doświadczeń Zespołu. Zainteresowania badaczy reprezentujących nauki fizjologiczno-biochemiczno-genetyczne często koncentrowały się na opisie roli poszczególnych genów i białek, które zmieniają się na skutek obecności badanego metalu ciężkiego. Zaniedbywano natomiast fakt, że toksyczne działanie metali związane jest z zakłóceniem przebiegu podstawowych procesów metabolicznych regulowanych hormonalnie i mających fundamentalne znaczenie dla rośliny. Wiemy, że odporność na metale ciężkie obecne w środowisku jest związana bezpośrednio z ekspresją szeregu genów i mamy świadomość, że znamy jedynie fragment procesów zachodzących w organizmie. Przedstawione eksperymenty mają przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale wyniki mogą mieć w przyszłości także znaczenie praktyczne.

Oceniana praca obejmująca 114 stron, 10 tabel, 10 rycin i 19 wykresów, zawiera elementy typowe dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. Tekst składa się z typowych rozdziałów. Wykaz stosowanych skrótów znajdujący się na początku pracy niepotrzebnie wyjaśnia co to jest: NO, H₂O₂ czy ATP. Na ogół zakładamy, że czytelnik pracy doktorskiej dysponuje już podstawową wiedzą biologiczną i chemiczną. Nie jest też dla mnie

jasne dlaczego niektóre skróty są wyjaśnione po polsku, a inne również po angielsku. Ta uwaga tyczy się całego tekstu rozprawy.

Wstęp nazwany tu dość nietypowo '*Wstępem teoretycznym*' stanowi obszerny fragment rozprawy i donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. W pierwszym podrozdziale Autorka charakteryzuje znaczenie kadmu i jego detoksykacji w środowisku. Kolejny podrozdział poświęciła reakcjom fizjologicznym i szlakom sygnałowym uruchamianym w obecności jonów tego metalu ciężkiego. Autorka opisała też ogólnie mechanizmy decydujące o transporcie i odporności roślin na metale ciężkie. W kolejnych podrozdziałach zestawiała dane dotyczące roli brassinosteroidów w komórkach roślinnych, a w szczególności w obecności nadmiaru metali. W tym fragmencie skupiła się w dużej mierze na systematyce chemicznej i percepcji biologicznej tych związków o naturze hormonów. Kolejny fragment wstępu poświęciła roli oksydazy NADPH i plazmolemowej H^+ ATPazy, ich roli w komórkowej regulacji metabolizmu w poszczególnych kompartmentach oraz aktywności w warunkach działania stresów środowiskowych. Przyniosła tu bardzo dużo danych znanych z opisu komórek roślinnych i zwierzęcych. Przedstawione wiadomości są syntezą prac opublikowanych w ostatnich dekadach, a rozdział ten jest wyposażony w zaczerpnięte z literatury graficzne przedstawienie struktury białek. Z zestawionych informacji wynika wprost jak wiele znamy szczegółów budowy białek i jak wiele informacji dotyczących ich funkcjonowania i fizjologicznej roli wymaga wyjaśnienia. Jako najważniejszy wytyczony cel rozprawy doktorskiej Doktorantka postawiła określenie roli brassinosteroidów w oddziaływaniu na oksydazę NADPH i PM H^+ ATPazę w przebiegu reakcji roślin na stres kadmowy. Ze względu na charakter analizowanych białek dużo miejsca poświęciła oddziaływaniu na funkcjonowanie poszczególnych membran komórkowych.

Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że we wstępie Autorka wykazała się dobrą znajomością szerokiego fragmentu literatury. Omawiany rozdział został przedstawiony logicznie i w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. Doktorantka podjęła próbę usystematyzowania aktualnej wiedzy i zaproponowała kluczowe mechanizmy reakcji roślin na obecność kadmu. Doktorantka wykazała się też umiejętnością dostrzeżenia aktualnych, a niezbadanych obszarów i określenia problemu badawczego. Ten fragment pracy pomimo wypunktowanych zalet budzi jednak pewne zastrzeżenia. We wstępie w mojej opinii jak na pracę cenzusową, zbyt skrótowo potraktowano rolę poszczególnych kontrolowanych hormonalnie procesów fizjologicznych odpowiedzialnych za kształtowanie odporności, tym bardziej, że praca dotyczy jednego z hormonów, któremu przypisuje się ważną rolę. W pracy cenzusowej powinno być miejsce dla takich treści. Szczegółowo opisano szlak syntezy

brassinolidu, ale w próbkach stwierdzono przecież dodatkowo homokastasteron i 2,4epibrassinolid. W pracy brak jest informacji jakie jest pochodzenie tych związków i współzależności między nimi. Uważam również, że fragmenty dotyczące struktury białek, aczkolwiek bardzo ciekawe, przynoszą informacje, które nie są potrzebne do omówienia wyników uzyskanych w niniejszej pracy. Zatem w omawianym wstępie widzę pewien brak równowagi treści niezbędnych do zrozumienia podjęcia problemu i tych, które dość pośrednio wiążą się z tą tematyką. Należy tu podkreślić, że same analizy molekularne często nie dają się łatwo interpretować, chociaż dają obraz wyniku tych zmian, dlatego takie wyważenie proporcji tekstu jest bardzo ważne dla zrozumienia istoty zarejestrowanych zmian. Ponadto zauważyłem szereg drobnych błędów i nieścisłości. Poniżej tylko niektóre z nich: gęstość kadmu metalicznego ma się nijak do prezentowanej pracy; kadm jako metal jest mało mobilny, a mobilne są jego pochodne; fitochelatyny nie są małymi cząsteczkami; celem działania jonów kadmu nie są białka; jak mamy rozumieć, że rośliny jako organizmy nieprzemieszczające się są stale narażone na czynniki stresogenne- ta myśl jest chyba zniekształcona; stres „zapobiegania” nazywamy stresem unikania (ang. stress avoidance); które to kompartmenty komórkowe są „nieaktywne biologiczne”?, co Autorka rozumie pod terminem „śluz korzeniowy”; fitochelatyny zwykle oznaczamy jako „PC” a nie „PS”.

Mgr Jakubowska zastosowała różnorodne metody pozwalające na wykonanie prac molekularnych na wybranym materiale badawczym i na wielostronne podejście do zagadnienia. W rozdziale *Materiały i Metody* znajdujemy opis postępowania w trakcie przygotowania materiału, oznaczania aktywności analizowanych enzymów, immunodetekcji badanych białek, rozdziałów elektroforetycznych DNA, izolacji RNA, syntezy cDNA, przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym, oznaczenia poziomu brassinosteroidów, siarkowodoru i nadtlenu wodoru oraz aktywności fotochemicznej tkanek. Opis poszczególnych technik jest szczegółowy, umożliwiając ich powtórzenie i często wchodzi w detale laboratoryjne jak to zazwyczaj bywa opisywane w pracach doktorskich. Opis w wielu miejscach można skrócić poprzez wykreślenie wielokrotnie powtarzanych identycznych sekwencji jak na stronie 35. Muszę także zaznaczyć, że nie doszukałem się informacji na temat źródła stosowanego światła do hodowli roślin, co przy analizie sygnałów hormonalnych może mieć dość kluczowe znaczenie, a opis „pudełek z wydrążonymi otworami”, w których hodowano materiał nie jest precyzyjny. Podziękowania pani dr hab. Janeczko za wykonanie analiz brassinosteroidów są na stronie 48, ponownie to samo znajdujemy na stronie 79 i na stronie 95. Oprócz tych drobnych błędów szczegóły techniczne opisane w pracy wskazują na fakt, że Autorka ma świadomość wielu zagrożeń uzyskiwania

błędnych wyników i utrudniających powtórzenie doświadczeń. Ogólnie oceniając metodyka pracy jest właściwie dobrana.

W części eksperymentalnej opisanej w rozdziale *Omówienie wyników* Doktorantka może pochwalić się całym szeregiem osiągnięć. Wszystkie pomysłowo przeprowadzone i zróżnicowane serie doświadczeń zaowocowały dużą ilością wyników. W pierwszym rzędzie Pani Jakubowska dokonała oceny wpływu kadmu na aktywność obu badanych enzymów oksydazy NADPH i PM H⁺ ATPaz izolowanych z korzeni ogórka, identyfikacji genów kodujących oksydazę NADPH i ich powiązań filogenetycznych oraz oddziaływania aplikowanych zewnętrznie brassinosteroidów na ekspresję obu genów i aktywność PM H⁺ ATPaz. Przeprowadziła też pomiary w obecności propikonazolu inhibitora syntezy brassinosteroidów. Ze względu na brak odpowiednich mutantów ogórka wybrane analizy wykonano z zastosowaniem *Arabidopsis thaliana*. Kolejne dane relacjonują o potranslacyjnych modyfikacjach PM H⁺ ATPaz w następstwie oddziaływania brassinosteroidów i zmieniającego się poziomu nadtlenu wodoru. Równoległe badania skoncentrowane były na aktywności oksydazy NADPH i te prace przeprowadzono także na mutantach i typie dzikim *A. thaliana*. Dodatkowa seria badań poświęcona była określeniu oddziaływania H₂S podejrzanego o udział w reakcji roślin na działanie kadmu. Kolejnym osiągnięciem Doktorantki które zwięźczy przeprowadzone testy biochemiczne i molekularne jest potwierdzenie efektów fizjologicznych w pomiarach aktywności fotochemicznej, w tym przypadku tkanek liściowych roślin poddanych stresowi metalu ciężkiego i traktowanych dodatkowo brassinosteroidami. W moim przekonaniu zebranie w niniejszej pracy faktów, które stanowią silny dowód na zaangażowanie brassinosteroidów w uruchomienie reakcji roślin na stres kadmu jest niezwykle istotnym osiągnięciem rozprawy. Kluczowe dane przedstawione w pracy doktorskiej są już opublikowane, i to w czasopiśmie dobrze rozpoznawanym w środowisku fizjologów. Obserwacje te funkcjonują już w literaturze przedmiotu, a praca z 2015 roku doczekała się już kilkunastu cytowań.

Wyniki i rezultaty są przedstawione w sposób bardzo skondensowany, podobnie jak w opublikowanych publikacjach. Praca jest napisana zwięzłym językiem, ale w wielu miejscach tekst jest niedopracowanym stylistycznie. Fragmenty pracy dotyczące aspektów czysto biochemiczno-molekularnych są napisane znacznie bardziej dojrzałym językiem. Przeprowadzone badania umożliwiły wyciągnięcie wielu wniosków i dokonanie pewnych uogólnień. Różnorodność podejścia eksperymentalnego pozwala na szeroką i odważną dyskusję. W rozdziale *Dyskusja* przeanalizowano uzyskane wyniki na tle wielu innych prac z podobnego zakresu. Badań wykonanych na podobnym materiale i analizujących omawiany

problem jest stosunkowo niewiele, a analiza uzyskanych wyników nie jest łatwa. W tej części pracy Autorka wykazała się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów, unikając nadinterpretacji. *Dyskusja* dostarcza czytelnikowi dużej porcji informacji i jest rzeczowa. Dysponując tak bogatym materiałem dowodowym można było zaryzykować dość odważne wnioski. Z dużym prawdopodobieństwem można sądzić, że wykonane prace będą inspiracją do dalszych badań. Mam jednak jedną wątpliwość a mianowicie: na stronie 18 znajdujemy informację jakoby brassinolid (BL) i jego prekursor kastasteron (CS) posiadały największą aktywność biologiczną, natomiast na stronie 95 czytamy, że najbardziej aktywny jest brassinolid i 28-homobrasinolid, a kastasteron jest znacznie mniej aktywny. Jak to jest ostatecznie?

Uzyskane wyniki były podstawą do sprecyzowania 8 wniosków. Kolejność tych wniosków zmieniałbym, tak aby czytelnik dowiadywał się o odkryciach w sekwencji faktów metabolicznych, a nie chronologii dochodzenia do poszczególnych stwierdzeń przedstawianych w tekście. Ponadto stosowane nazewnictwo w obrębie wniosków powinno być ujednoczone i należy zastosować skróty nazw albo ich pełny zapis.

Opis wyników aktywności fotochemicznej nie jest precyzyjny. Przedstawione wartości mogą jedynie korelować z wydajnością fotosyntezy, ale nie są pomiarami intensywności fotosyntezy. Trudno też mówić o tym, że jakikolwiek parametr uległ „poprawie”. Bardzo często podwyższone wartości świadczą o obniżeniu aktywności fotosyntetycznej. Niewłaściwe jest także stwierdzanie, że zabsorbowana energia kwantów jest „wykorzystywana” do wygaszania fotochemicznego, lub pisanie o „stratach” związanych z rozpraszaniem świetlnym. Nie jest dla mnie jasne co oznacza „zysk fotosyntezy netto”. Podobne wyrażenie „zysku” atomów węgla stosuje się w analizie bilansu asymilacji/fotooddychania. W omawianym kontekście, prawdopodobnie chodzi o bilans wymiany gazowej netto, ale tego parametru w pracy nie mierzono. Ponadto, zwiększenie poziomu zawartości chlorofilu wcale nie musi być korzystne dla rośliny, podobnie jak i aktywność enzymów antyoksydacyjnych nie zawsze odzwierciedla oddziaływanie tzw. stresorów.

Pod względem redakcyjnym praca wymagałaby szeregu poprawek, gdyby nie to, że zasadnicze tezy już są opublikowane. Pouczanie Doktorantki jak należy redagować tekst traci w aktualnej sytuacji sens, ale z obowiązku recenzenta zamieszczam poniżej moje krytyczne uwagi dotyczące tekstu. Nie ma potrzeby wymieniania w całym tekście pełnych nazw łacińskich stosowanego materiału roślinnego. Jeśli wyjaśniamy wprowadzone skróty to tylko przy pierwszym ich zastosowaniu w tekście. Zastosowane jednostki powinny być takie jak

przyjęte w literaturze przedmiotu i tak np. jednostki aktywności enzymów oznaczamy „U”, a nie „u”. Układ zacytowanych prac byłby znacznie lepszy gdyby był alfabetyczny, ale rozumiem, że przyjęto sposób cytowania taki jaki wymaga redakcja *Plant Science*. W recenzowanej pracy doktorskiej należałoby się zdecydować, czy figury nazywamy rycinami czy wykresami. Dokonywanie takiego rozróżniania nie jest potrzebne. Nie widzę też potrzeby wprowadzania tabeli prezentującej dwie wartości (Tabela 7). Niektóre wartości podane w tabelach są zaznaczone czerwoną ramką, ale możemy się tylko domyślać co te ramki oznaczają. Za nietypowy uznałbym też sposób zacytowania *in extenso* w tekście (str. 87 i 93) obu prac opublikowanych w *Plant Science*. Zazwyczaj w sytuacji oparcia pracy doktorskiej o opublikowane materiały załącza się wykaz publikacji.

Dyskusja wyników ujawniła, że powiązanie obserwacji fizjologicznych z analizą ekspresji genów może być trudne. Uzyskane wyniki pomimo zastosowania wyrafinowanych technik nie rozwiązały ostatecznie problemu chociaż zapewne stanowią milowy krok na drodze do wyciągnięcia wniosków wyjaśniających przyczyny wrażliwości/odporności roślin na obecność kadmu. Dla fizjologa dyskusja ta otwiera nowe niezbadane pola np. udziału innych hormonów w reakcji na stres kadmu. Praca doktorska jednoznacznie wskazuje na powiązania istniejące między różnie zlokalizowanymi białkami i białkami, którym przypisuje się całkowicie odmienne funkcje. Moje uwagi stanowiące w gruncie rzeczy pochwały i komplementy w oczywisty sposób nie ujmują wartości merytorycznej pracy i stanowią jedynie uwagi dotyczące w ogólności opracowywanego tematu. Opisane powyżej spostrzeżenia dotyczące ocenianej pracy i mając na uwadze już pewne dokonania Doktorantki skłaniają mnie do sformułowania pytania. Ponieważ dyskusja wyników toczy się wokół problemów ekspresji genów w obecności kadmu, a wiemy, że szereg białek odpowiedzialnych za transport metali ciężkich reprezentuje rodziny białek obecne u wszystkich organizmów w tym grzybów i zwierząt, a również brassinosteroidy mają swoje odpowiedniki w innych grupach organizmów żywych powstaje pytanie czy zestawienie tych danych nie wskazuje na fakt ewoluowania tych procesów od jakiegoś wspólnego pnia?

Podsumowanie:

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich i spełnia wszelkie wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Autorka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną, znajomością nowoczesnych

technik, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. Ponadto wypracowała szereg cennych szczegółów metodycznych oraz wykonała dużą ilość badań, które zostały opublikowane i stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących wrażliwości roślin na analizowane czynniki stresowe. W związku z tym stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Dagmary Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



-/ Zbigniew Miszański