

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Dagmary Jakubowskiej

Tytuł rozprawy: UDZIAŁ BRASSINOSTEROIDÓW W ADAPTACJI ROŚLIN DO

STRESU WYWOŁANEGO OBECNOŚCIĄ KADMU W

ŚRODOWISKU

Promotor: dr hab. prof. Małgorzaty Janickiej

Kadm (Cd) zaliczany jest do grupy metali ciężkich, których obecność nawet w niewielkich stężeniach wywołuje toksyczny efekt. W środowisku naturalnym metal ten występuje w niewielkich ilościach najczęściej w minerałach rud cynku lub ołowiu. Duży problem stanowią jednak antropogenne źródła emisji tego pierwiastka do środowiska naturalnego, w tym m.in. procesy spalania w sektorze przemysłowym czy komunalnym. Toksyczność Cd wynika m.in. z jego wysokiego powinowactwa do wielu grup chemicznych o istotnym znaczeniu biologicznym, generowaniu zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu oraz zaburzeniu homeostazy mineralnej. Cd stanowi poważny problem, ponieważ metal ten jest mobilny, łatwo przyswajalny przez rośliny i akumuluje się w środowisku. Dostaje się on do roślin przede wszystkim poprzez system korzeniowy, ale również liście. Pobieranie tego pierwiastka zachodzi na zasadzie współzawodnictwa o miejsce w przenośniku transbłonowym z innymi jonami takimi jak: potas, wapń, magnez, żelazo, mangan, cynk, miedź. Dostrzegalnymi symptomami toksyczności Cd dla roślin są m.in.: obniżona produkcja biomasy, zahamowanie wzrostu i chloroza liści. W toku ewolucji rośliny jako organizmy osiadłe wykształciły różne mechanizmy adaptacyjne, pozwalające tolerować Cd bądź zapobiegać jego toksyczności. Mechanizmy zapobiegania polegają na ograniczeniu pobierania jonów Cd z roztworu glebowego oraz ich translokacji (np. poprzez immobilizację w ścianie komórkowej, czy ograniczenie importu). Mechanizm tolerowania natomiast polega na neutralizacji toksycznego działania Cd po przekroczeniu bariery jaką stanowi błona komórkowa (np. poprzez jego wiązanie w cytoplazmie przez grupy tiolowe glutationu, metalotionein oraz fitochelatyn i transport takich kompleksów do wakuoli). Istotnym a wciąż mało poznanym elementem w/w mechanizmów oraz skutecznej adaptacji do skażenia środowiska metalami ciężkimi jest aktywność dwóch białek błony komórkowej tj. H^+ -ATPazy oraz oksydazy NADPH.

H^+ -ATPaza generując gradient elektrochemiczny w poprzek błony utrzymuje homeostazę jonową komórki poprzez utrzymanie/kontrolę wtórnego transportu, co ma wielorakie/istotne znaczenie dla fizjologii komórki. Aktywność H^+ -ATPazy jest regulowana kompleksowo na poziomie transkrypcji, translacji oraz poprzez modyfikacje potranslacyjne a badania nad kaskadami sygnałowymi modulującymi jej aktywność stanowią istotną składową współczesnej fizjologii roślin. Mimo iż obserwowano zmiany aktywności H^+ -ATPazy także pod wpływem jonów metali ciężkich niewiele jest jednak danych literaturowych dotyczących udziału tego białka w regulowaniu odpowiedzi komórki roślinnej na ten rodzaj stresu abiotycznego.

Oksydaza NADPH to enzym z klasy oksydoreduktaz. Katalizuje transfer elektronów w poprzek błony z cytoplazmatycznego donora - NADPH na zewnątrzkomórkowy akceptor, tlen cząsteczkowy z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego. Liczne dane literaturowe wskazują na jej istotną rolę w indukowanym Cd stresie oksydacyjnym. Reaktywne formy tlenu generowane w wyniku zwiększonej aktywności oksydazy NADPH, uczestniczą np. w zależnych od Cd procesach zahamowania wzrostu korzeni i programowanej śmierci komórek. Powstawanie takich reaktywnych form tlenu jest jednym z przejawów odpowiedzi na stres abiotyczny i pośrednio wpływa również na aktywność H^+ -ATPazy.

Warto podkreślić, iż oba mechanizmy odpowiedzi na stres wywołany obecnością jonów metali ciężkich w środowisku tj. zapobieganie oraz tolerowanie, jak i udział/aktywności w/w białek błony komórkowej, w tej odpowiedzi są pod wpływem hormonów roślinnych. W reakcję na toksyczne działanie Cd są zaangażowane m.in. hormony stresowe takie jak etylen, kwas jasmonowy i kwas abscysynowy. Mimo wzrastającej wiedzy o hormonalnych szlakach transdukcji sygnałów uruchamianych w roślinach w reakcji na Cd, ciągle mało wiemy o roli w procesach adaptacyjnych hormonów wzrostowych takich jak auksyny czy brassinosteroidy. I to pomimo przesłanek o wpływie tych ostatnich na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych czy nabywanie tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich.

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Dagmary Jakubowskiej było wykazanie roli brassinosteroidów w adaptacji roślin do stresu kadmowego poprzez ich wpływ na aktywność H^+ -ATPazy oraz oksydazy NADPH. Badania prowadzono na ogórku oraz rzodkiewniku. Wykorzystując m.in. mutanty rzodkiewnika z zaburzoną syntezą lub kaskadą sygnałową brassinosteroidów wykazano ich wpływ na indukowaną przez Cd aktywność H^+ -ATPazy oraz oksydazy NADPH. Pokazano m.in., że w warunkach stresowych brassinosteroidy indukują zależną od oksydazy NADPH akumulację przekaźnika sygnału tj. H_2O_2 , mogącego wpływać na ekspresję genów kodujących H^+ -ATPazę. Przeprowadzono także testy fenotypowe mutantów brassinosteroidowych (wzrost oraz wydajność aparatu fotosyntetycznego) podkreślające udział tych hormonów wzrostowych w łagodzeniu stresu abiotycznego jakim jest obecność w środowisku toksycznego Cd.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwiera ją poza technicznymi informacjami (spis treści i wykaz skrótów) obszerny Wstęp Teoretyczny (24 strony), który szczegółowo i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia, takie jak: Kadm, Brassinosteroidy, Oksydaza NADPH, Plazmolemowa H^+ -ATPaza. Ta część tekstu uzupełniona jest poglądowymi ilustracjami (str. 19, 21, 23, 25 i 26). Następnym rozdziałem to Cel Pracy a kolejne sekcje to: Materiały, Metody oraz Omówienie Wyników i Dyskusja. Całość zamykają jednostronicowe Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Spis literatury. Wykorzystane we wstępie ryciny mają odnośniki do oryginalnych tekstów źródłowych. Do pracy nie dołączono materiałów w wersji elektronicznej.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

W dysertacji nie ma rażących błędów stylistycznych. Praca napisana jest z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Dobrym zabiegiem edytorskim jest zadbanie o wykaz skrótów (str.6-9) niemniej jednak jest on wybiórczy i niektóre ze skrótów obecnych w tekście nie figurują w wykazie (np. EDTA str.36 *ethylenediaminetetraacetic*, IPTG str. 39 *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) lub nie są rozwijane (np. FAD, PM str. 27, 29 i wiele więcej) lub rozwijane niezrozumiale/ wielokrotnie (ABA str. 16) Autorka czasem posługuje się językowymi zapożyczeniami /żargonem pisząc np. „...z zaburzoną syntezą lub sygnalingiem BR..” str. 99, „Brassinosteroidy nie podlegają w roślinie transportowi długodystansowemu” str. 88, „Western blot z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko.” Str. 67. Autorka trafne uzupełnia Wstęp ilustracjami, choć wymagają one (np. Rycina 3, 4, 5) bardziej szczegółowego wyjaśnienia a legendy do nich są wręcz minimalistyczne, bez podstawowych informacji (np. czym jest BKII na Rycinie 3?). Śledząc zamysł/kolejność eksperymentów w sekcji Wyniki podrozdziały 4.13 i 4.19 mogłyby zostać połączone razem z innymi dedykowanymi rzodkiewnikowi (4.7-4.9). Kończąca dysertację sekcja Wnioski dobrze podsumowuje/wypunktowuje najważniejsze wyniki i myślę, że Rycina 11 (model adaptacji roślin do stresu kadmowego) mogła by być jej zwieńczeniem. Niektóre wykresy (np. Wykres 19) mogłyby mieć bardziej kontrastowe rozwiązania oznaczeń słupków. Całość rozprawy to 114 stron tekstu, 11 rycin, 19 Wykresów, 10 tabel, 213 cytowane publikacje.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pracy doktorskiej mgr. Dagmary Jakubowskiej wyodrębnić można dziewięć zasadniczych części. Pierwszą z nich jest Wstęp Teoretyczny. Rozdział ten koncentruje się na szczegółowym opisie ważnych elementów składowych opisanej historii i podzielony jest na następujące podrozdziały: Kadm, Brassinosteroidy, Oksydaza NADPH, Plazmolemowa H⁺-ATPaza. Podrozdział Kadm opisuje czym jest ten pierwiastek, mechanizmy jego pobierania i translokacji, przyczynę toksyczności, sposoby detoksykacji oraz rolę hormonów w transdukcji sygnału w roślinie w odpowiedzi na Cd. Celowo i selektywnie, w końcowej części, Autorka pozycjonuje podobieństwo pomiędzy regulacją przez Cd odpowiedzi na stres oksydacyjny z potencjalną rolą brassinosteroidów w tym procesie. Kolejny fragment Wstępu dedykowany jest bardziej szczegółowo brassinosteroidom. To obszerna część i o ile opis czym one są, przy całej ich złożoności, jest uzasadniony tak jak i informacja o sposobie przekazywania sygnału, to można odnieść wrażenie, że detale o syntezie i percepcji są zbędne. Rozumiem, że mają ułatwić zrozumienie czym są mutanty stosowane w badaniach ale ten fragment mógłby być prostszy. Dalej mamy informacje o oksydazie NADPH i H⁺-ATPazie. To dobre części Wstępu, zwłaszcza w kontekście wprowadzenia tych białek jako istotnych w odpowiedzi na stres kadmowy. Znow jednak niepotrzebne są tak szczegółowe opisy budowy (np. str. 27 czy 30) tym bardziej, że nie są kluczowe dla interpretacji i zrozumienia wyników. Czemu mają służyć np. Ryciny 5 i 6, słabo pasujące do tekstu i bardzo słabo opisane w legendach? Należy jednak podkreślić, iż kompozycja, zawartość, aktualność prezentowanych informacji sprawiają, że Wstęp Teoretyczny jest bardzo solidną częścią rozprawy dobrze przygotowującą czytelnika na odbiór i interpretację wyników.

Kolejna część rozprawy to Cel Pracy. Tutaj zabrakło precyzji. Niektóre fragmenty są właściwie jak ze Wstępu. Jest to mini wstęp (strona tekstu!) - niepotrzebnie. Sam cel pracy (to co najistotniejsze) to jedno –ostatnie- zdanie tego rozdziału.

Dalszą część rozprawy stanowi opis Materiałów i Metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to 14 stron. W dużej mierze opis ten dotyczy warunków upraw/stresu dla roślin wykorzystywanych w eksperymentach, klonowań celem potwierdzenia sekwencji (?) genów przewidzianych *in silico* oraz biochemicznych metod stosowanych do oznaczania aktywności badanych białek.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki badań. Na wstępie należy docenić pomysł/konsekwencje działań molekularnych i biochemicznych na dwóch roślinach modelowych ogórku i rzodkiewniku prowadzące do uzyskanych wyników. To ciekawy przykład synergii eksperymentalnej. Autorka rozpoczyna badania od oznaczenia aktywności plazmolemowej oksydazy NADPH w korzeniach siewek ogórków. Jest to poniekąd kontynuacja wcześniejszych obserwacji poczynionych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin UW r dla H⁺-ATPazy i wpływie Cd na jej aktywność. To zabieg uzasadniony koncepcyjnie i pokazujący pewną zbieżność istotną dla całej historii. Autorka następnie logicznie łączy obserwacje dotyczące aktywności z analizami poziomu ekspresji genów kodujących plazmolemową oksydazę NADPH. Poprzedzone jest to identyfikacją *in silico* genów kodujących ten enzym w dostępnych sekwencjach genomu ogórka. W nawiązaniu do tej części pracy chciałbym poprosić o komentarz niskiego poziomu ekspresji czy nawet jej spadku dla szeregu np. CsRbohD, CsRbohE, CsRbohF3, CsRbohJ (Wykres 2) oksydaz po 6 dniach od podania Cd oraz zmian ilości transkryptu dla CsRbohF3, CsRbohJ w warunkach 3dni oraz 3/3dni w zestawieniu z wynikami z wykresu 1 (aktywność enzymatyczna).

Solidna jest część pracy dedykowana brassinosteroidom m.in. ich wpływowi na aktywność plazmolemowej H⁺-ATPazy w korzeniach siewek ogórków. Analizując te wyniki można zaobserwować wyraźnie stymulujący wpływ na aktywność tego białka 10 nM stężenia 24-epibrassinolidu. Efekt brassinosteroidów na ekspresję/aktywność H⁺-ATPazy znajduje poparcie w biochemicznych eksperymentach z wykorzystaniem propiconazolu, specyficznego inhibitora syntezy brassinosteroidów. Inhibitor ten znosił działanie brassinosteroidów na ekspresję/aktywność H⁺-ATPazy. W dalszej części pracy wstępne wyniki uzyskane na ogórku sugerujące rolę brassinosteroidów w modyfikacji aktywności plazmolemowej H⁺-ATPazy, są wsparte serią eksperymentów z wykorzystaniem mutantów rzodkiewnika z zaburzoną syntezą (dwarf4) lub kaskadą sygnałową brassinosteroidów (bril i bak1). Jest to ważna część eksperymentalna doskonale uzupełniająca wstępną hipotezę i ilustrująca w/w synergię eksperymentalną. Ostatnią część wyników stanowi seria biochemicznych testów przeprowadzonych ponownie na ogórku, ilustrująca udział brassinosteroidów w: (i) potranslacyjnej modyfikacji H⁺-ATPazy, (ii) indukowanej przez kadm akumulacji H₂O₂, (iii) indukcji aktywności oksydazy NADPH, (iv) ekspresji genów kodujących oksydazę NADPH (CsRboh). Autorka bada także udział oksydazy NADPH w stymulowanej przez brassinosteroidy aktywności H⁺-ATPazy oraz oznacza poziom endogennego H₂S i brassinosteroidów (przy współpracy) w siewkach ogórków. Istotna w tej części wydaje się

korelacja aktywności oksydazy NADPH i H⁺-ATPazy traktowanych 10 nM 24-epibrassinolidem, aczkolwiek zaskakuje efekt 100μM 24-epibrassinolidu i prosiłbym o kilka słów komentarza o zamiśle stosowania takich stężeń. Analizując wzory ekspresji genów kodujących oksydazę NADPH chciałbym prosić także o komentarz różnic ich ekspresji pomiędzy wykresami 2 i 15 (o ile w ogóle możliwe jest takie porównanie). Podsumowując wyniki warto w tym momencie podkreślić, iż wraz z trzema publikacjami będącymi współdziałaniem Pani Dagmary Jakubowskiej stanowią one ciekawe/nowe otwarcie w zrozumieniu roli oksydazy NADPH, H⁺-ATPazy jak i hormonów wzrostowych w adaptacji roślin do stresu wywołanego obecnością Cd w środowisku.

Rozprawę zamyka rozdział Dyskusja i krótkie Podsumowanie. Dyskusja jest rozdziałem bardzo dobrze uzupełniającym całość dysertacji. Zawiera informacje o niemalże każdym aspekcie pracy. Nie jest to jednak tylko opis. To refleksja, która odzwierciedla świadomość mgr. Dagmary Jakubowskiej o złożoności zjawiska biologicznego, które bada. Widać to we fragmentach dedykowanych np. aktywności H⁺-ATPazy, roli apoplastycznego pH i ich wpływie na strukturę ściany komórkowej, czy znaczeniu badań białko –białko w rozwikłaniu brassinosteroidowego szlaku transdukcji sygnału i potencjalnego oddziaływania pomiędzy receptorem BRI1 a H⁺-ATPazą.

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy a także publikacje będące owocem pracy Pani Jakubowskiej pozwalają sądzić, że jej Autorka jest sprawną badaczką posiadającą szeroką i ugruntowaną wiedzę. Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Dagmary Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu.

Poznań 14.01.2019



