



Lublin, 4 lipca 2021 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. (081) 537 50 64
email: mwojcik@umcs.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Magdaleny Zboińskiej**

pt. „Ścieżki sygnałowe uczestniczące w regulacji wakuolarniej H⁺-ATPazy w warunkach stresu kadmowego”

wykonanej w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin
Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kabały, prof. UW

Działalność antropogeniczna, zwłaszcza wydobywanie surowców, rozwój przemysłu, komunikacji, urbanizacja i nieprawidłowe zabiegi agrotechniczne prowadzą do poważnego zanieczyszczenia środowiska naturalnego metalami ciężkimi i innymi pierwiastkami śladowymi. Wśród nich, kadm jest zaliczany do najbardziej toksycznych, zaburzając procesy metaboliczne w organizmach żywych, w tym u ludzi, już przy niewielkich stężeniach. Kadm jest pierwiastkiem bardzo mobilnym, jest stosunkowo łatwo pobierany przez rośliny i kumulowany w kolejnych ogniwach łańcuchów troficznych. Dlatego poznanie mechanizmów adaptacji roślin do środowisk zanieczyszczonych kadmem jest interesującym i ważnym problemem badawczym. Badania podjęte przez Doktorantkę i przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej znakomicie wpisują się w nurt badań dotyczących mechanizmów tolerancji roślin na kadm, a szczególnie funkcjonowania wakuolarniej H⁺-ATPazy (V-ATP-azy), będącej przedmiotem zainteresowania Pani Profesor Katarzyny Kabały i innych pracowników Zakładu Fizjologii Molekularnej roślin od wielu lat.

Wakuolarna H⁺-ATPaza jest enzymem zaangażowanym w wiele procesów fizjologicznych niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, m.in. utrzymanie właściwego pH komórki, homeostazy jonowej, turgoru, a także adaptacji roślin do stresów abiotycznych, w tym stresu kadmowego. Celem badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej było określenie mechanizmów regulacji tego enzymu (na poziomie transkryptu, białka i post-translacyjnych modyfikacji wybranych podjednostek białkowych) w siewkach ogórka *Cucumis*



sativus eksponowanych na kadm. Szczególną uwagę zwrócono na rolę małych cząsteczek sygnałowych (H_2O_2 , H_2S , NO) i fitohormonów (gł. kwasu salicylowego i jasmonowego) w modyfikacji funkcjonowania V-ATPazy, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i inhibicji pod wpływem kadmu. Rolę tych czynników badano dodając te małe cząsteczki sygnałowe i fitohormony (lub ich prekursor/donory) do środowiska wzrostu roślin (pożywki), jak również stosując inhibitory biosyntezy tych związków lub ich wymiatacze, aby modulować poziom przekaźników sygnału, a przez to badać ich wpływ na aktywność enzymu (mierzoną jako hydroliza ATP oraz zależny od ATP transport protonów przez tonoplast). Określono poziom tych substancji w roślinach, jak również aktywności enzymów zaangażowanych w ich biosyntezę lub neutralizację. Aby lepiej zrozumieć rolę post-translacyjnej modyfikacji (persulfidacji) w funkcjonowaniu V-ATPazy, zastosowano również typ dziki oraz trzy mutanty rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, w których jedna z konserwatywnych u wszystkich eukariontów reszt cysteiny (w różnych pozycjach łańcucha białkowego podjednostki VHA-A) została zastąpiona przez serynę.

W mojej ocenie, zarówno tematyka badawcza, jak również gatunek rośliny wykorzystany do badań zostały dobrane właściwie, a wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są bardzo interesujące i wartościowe. Na podkreślenie zasługuje niezwykle szeroki i kompleksowy zakres badań, wymagający od Doktorantki nie tylko bardzo obszernej wiedzy dotyczącej realizowanej tematyki, ale również bardzo dużego nakładu pracy i opanowania wielu różnorodnych technik badawczych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania formalne stawiane pracom eksperymentalnym. Treść pracy, obejmującej 230 stron maszynopisu, została podzielona na sześć rozdziałów (Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski) poprzedzonych wykazem skrótów. Za dobry pomysł uważam tłumaczenie wszystkich użytych w pracy skrótów dodatkowo w przypisach dolnych na stronie, na której się pojawiały. Pracę zamyka spis literatury, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz informacja na temat finansowania badań (ze źródeł Narodowego Centrum Nauki – projekt Etiuda 7 oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – dotacje celowe). Dokumentację pracy stanowią 72 ryciny (wykresy, fotografie i schematy) oraz cztery tabele.

Rozdział „Wstęp” został podzielony na cztery spójne tematycznie podrozdziały, w których dla większej przejrzystości wyróżniono podrozdziały niższych rzędów. Autorka przedstawiła w nich budowę, mechanizm działania i funkcje V-ATPazy, a następnie opisała źródła zanieczyszczeń kadmem w środowisku, jego toksyczny wpływ na rośliny, mechanizmy adaptacji roślin do stresu kadmowego oraz funkcjonowanie V-ATPazy w obecności kadmu. W dalszej części podała charakterystykę ścieżek sygnałowych zaangażowanych w transdukcję sygnału w warunkach stresu kadmowego, opartych głównie na jasmonianach, H_2O_2 , H_2S , NO oraz oksydacyjne post-translacyjne modyfikacje cysteiny indukowane przez małe cząsteczki sygnałowe (S-sulfenylacja, S-nitrozylacja, S-sulhydracja). Wstęp prezentuje bardzo logicznie poprowadzoną i przejrzyste przedstawioną syntezę wiadomości, które stanowią doskonałe wprowadzenie do badań prezentowanych w pracy. Na wyróżnienie zasługuje zamieszczenie w tym rozdziale 16 schematów, bardzo starannie przygotowanych i bardzo dobrze opisanych, które obrazowo przedstawiają opisywane treści i znacznie ułatwiają ich zrozumienie



Rozdział 2. przedstawia „Cel pracy”. Zarówno cel główny, jak i cztery cele szczegółowe prowadzące do jego osiągnięcia zostały sformułowane logicznie i poprawnie. Założono, że na podstawie uzyskanych wyników zostanie przedstawiony model regulacji V-ATPazy w warunkach stresu indukowanego kadmem, opisujący ścieżki sygnałowe z udziałem badanych przekaźników.

W liczącym 23 strony rozdziale „Materiał i metody”, Autorka usprawiedliwiła wybór ogórka siewnego oraz rzodkiewnika pospolitego (w niektórych doświadczeniach) jako materiału badawczego i szczegółowo opisała warunki uprawy roślin. Bardzo dokładnie opisała procedury oraz metody badawcze i analityczne, począwszy od izolacji pęcherzyków tonoplastowych, plazmolemowych i frakcji cytozolowej, poprzez oznaczanie aktywności enzymów, poziomu fitohormonów, małych cząsteczek sygnałowych, a skończywszy na analizach ekspresji genów (cDNA, RNA), poziomu białek i ich post-translacyjnych modyfikacjach. Przedstawiła również wykorzystane bazy danych i narzędzia informatyczne, a także zastosowane analizy statystyczne. Stosowane metody badawcze są bardzo różnorodne i trafnie dobrane. Świadczy to o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę oraz umiejętności wyboru i łączenia różnych, konwencjonalnych i nowoczesnych, technik badawczych. Ich precyzyjny opis umożliwia odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów.

Rozdział 4. – „Wyniki” stanowi najobszerniejszą, liczącą 57 stron część maszynopisu. Został logicznie podzielony na 10 podrozdziałów, opisujących poszczególne zagadnienia badawcze. Na wstępie przedstawiono indukowane kadmem zmiany w poziomie małych cząsteczek sygnałowych i fitohormonów, następnie opisano ich wpływ na aktywność V-ATPazy, ekspresję wybranych genów i poziom białka wybranych podjednostek enzymu. W dalszej kolejności dokonano analizy persulfidacji wybranych podjednostek białkowych i jej wpływu na aktywność enzymu. Określono wzajemne interakcje między badanymi substancjami, dynamikę zmian ich poziomu (2-24 h) i aktywność enzymów regulujących ich poziom, jak również wpływ kadmu, H₂O₂ i H₂S na poziom związków tiolowych zaangażowanych w metabolizm komórki i detoksyfikację metalu. Podoba mi się konsekwencja Autorki w rozwiązywaniu problemu badawczego. Przejawia się ona w podsumowaniach wyników w kolejnych podrozdziałach, z których wynika celowość przeprowadzenia kolejnych analiz lub konieczność zastosowania lub wyeliminowania pewnych wariantów doświadczalnych w dalszych analizach. Pomimo wielu kombinacji doświadczalnych, Autorce udało się stworzyć opis bardzo rozległych i różnorodnych wyników tworzący bardzo przejrzystą i logiczną całość.

W rozdziale 5. „Dyskusja”, niemal równie obszernym jak prezentacja wyników, zestawiono omawiane wcześniej wyniki z danymi dostępnymi w literaturze. Przeanalizowano ścieżki sygnałowe zaangażowane w regulację V-ATPazy w warunkach fizjologicznych i w stresie wywołanym kadmem, i ich wzajemne interakcje. Uważam, że dyskusja jest napisana w sposób bardzo dojrzały, bez zbędnych powtórzeń uzyskanych wyników, a Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością problematyki pracy i umiejętnością umiejscowienia własnych badań na tle literatury światowej. W podsumowaniu dyskusji przedstawiono model regulacji aktywności V-ATPazy łączący w bardzo przejrzysty i czytelny sposób uzyskane wielowątkowe wyniki.

Rozdział 6. – „Wnioski” zawiera 16 punktów przedstawiających najważniejsze wyniki i ich interpretację.

Wśród najważniejszych osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy należy wymienić:



- wykazanie po raz pierwszy, że H₂S uczestniczy w regulacji aktywności V-ATPazy w komórkach roślinnych i że pozytywna regulacja może być związana z indukowaną przez tą cząsteczkę post-translacyjną modyfikacją reszt cysteiny (persulfidacją) w obrębie podjednostek VHA-A, B i E;
- wykazanie, że aktywność V-ATPazy jest stymulowana przez H₂S i NO, a hamowana przez H₂O₂ oraz kwas jasmonowy, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności kadmu;
- wykazanie, że zmiany aktywności V-ATPazy pod wpływem badanych cząsteczek sygnałowych nie są bezpośrednio związane z modulacją ekspresji genów kodujących podjednostki enzymu;
- wykazanie, że hamowanie aktywności V-ATPazy pod wpływem kadmu może wynikać ze wzrostu endogennego poziomu H₂O₂ i jasmonianów oraz obniżenia zawartości NO; wzrost poziomu H₂O₂ jest związany z działalnością plazmolemowej oksydazy NADPH i hamowaniem aktywności peroksydazy askorbinianowej, a także obniżeniem zawartości NO, które z kolei jest konsekwencją hamowania przez kadm reduktazy azotanowej;
- zasugerowanie, że wczesna intensyfikacja wytwarzania H₂O₂ (również na skutek pretraktowania roślin tym związkiem przed indukcją stresu kadmowego) świadczy o kluczowej roli stresu oksydacyjnego w inicjacji ścieżek sygnałowych, a szlak zależny od H₂S jest uruchamiany w późniejszym etapie;
- zaproponowanie kompleksowego modelu regulacji aktywności wakuolarniej H⁺-ATPazy z udziałem poszczególnych cząsteczek sygnałowych, umiejscowienie ich na właściwych miejscach wzajemnych powiązań i wskazanie procesów/enzymów, które są odpowiedzialne za modyfikację ich poziomu i które ulegają stymulacji bądź inhibicji pod wpływem kadmu i/lub tych przekaźników informacji.

Pracę zamyka spis bardzo obszernej, liczącej 496 pozycji cytowanej literatury. Są wśród nich pozycje źródłowe, sięgające lat 70-tych ubiegłego wieku, jednak znakomitą większość stanowią publikacje bardzo aktualne, w tym duża grupa prac opublikowanych w roku 2020, a nawet w 2021 roku. Dobór pozycji literaturowych jest jak najbardziej odpowiedni, bardzo dobrze powiązany z tematyką pracy.

Należy podkreślić, że praca jest napisana wyjątkowo starannie i tylko z obowiązku recenzenta zwróciłam uwagę na kilka drobnych pomyłek, niedociągnięć lub literówek (np. błąd w rozwinięciu skrótu DTNB – powinno być *2-nitrobenzoesowy*; błędny numer podrozdziału opisującego hodowlę *Arabidopsis thaliana* – powinien być 3.1.2 a nie 3.3.1; brak rozwinięcia nazwy rodzajowej *H. vulgare* przy pierwszym użyciu nazwy łacińskiej jęczmienia – str. 19; skrót od „sekundy” w jednostkach SI brzmi *s* a nie *sek* – str. 53, 66; na str. 89 poziom H₂O₂ powinien być wyrażony w nmol / g świeżej a nie suchej masy), które absolutnie nie mają żadnego wpływu na moją wysoką ocenę pracy.

W ramach dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań postawionych poniżej:

- 1) Jakiej wielkości były doniczki, w których uprawiano *Arabidopsis thaliana* i jakiej gleby używano do tej hodowli (specjalne podłoże czy zwykła gleba ogrodnicza, autoklawowana czy nieautoklawowana)? Ile roślin trzeba było wykorzystać, aby uzyskać wystarczającą



masę korzeni do badań typu dzikiego i mutantów? Czy rośliny typu dzikiego i mutanty różniły się fenotypowo?

- 2) Na str. 181 zasugerowano (powołując się na pracę Gilli i Tuteja, 2011), że *zwiększenie zawartości tioli wynika najprawdopodobniej ze wzrostu poziomu wolnej Cys oraz zawierających ten aminokwas chelatorów kadmu: glutationu, fitochelatyn i metalotionein*. Chciałabym się dowiedzieć, czy znane są Pani z literatury przypadki izolacji białek metalotionein z materiału roślinnego bądź określenia ich poziomu? Na jakiej podstawie wnioskuje się o roli metalotionein w detoksyfikacji/tolerancji metali w roślinach?
- 3) Jak opisała Pani na str. 181, fitochelatyny *nie są syntetyzowane w oparciu o mRNA, ale dzięki aktywności syntetazy fitochelatynowej*. Która właściwość budowy fitochelatyn wyklucza możliwość ich kodowania przez geny?
- 4) Czy opisane przez Panią mechanizmy regulacji V-ATPazy są specyficzne wobec kadmu, czy mogą być uniwersalne w warunkach stresu indukowanego obecnością innych metali/pierwiastków śladowych?

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka podjęła się trudnego zadania wyjaśnienia bardzo złożonej sieci transdukcji sygnałów prowadzącej do zmiany funkcjonowania enzymu V-ATPazy pod wpływem kadmu. Z przyjemnością oznajmiam, że znakomicie wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celach pracy. Uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i nowatorskie, i wnoszą istotny wkład w poznanie regulacji działania V-ATPazy z udziałem cząsteczek sygnałowych: H_2O_2 , H_2S , NO oraz kwasu jasmonowego, jak również aktywności szeregu enzymów odpowiedzialnych za zmiany ich poziomu. Doktorantka wykazała się szerokim warsztatem badawczym, od powszechnie stosowanych metod spektrometrycznych, po skomplikowane i trudne interpretacyjnie metody molekularne oraz umiejętnością starannej dokumentacji oraz poprawnej interpretacji uzyskanych wyników.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania 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. z 2017 roku, poz. 1789), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669 ze zm.). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Zboińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w uznaniu bardzo szerokiego zakresu badań i wartościowych, znakomicie opisanych i zinterpretowanych wyników, rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS

