



dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka  
Zakład Fizjologii Roślin  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6,  
61-614 Poznań

Poznań, 19.07.2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Zboińskiej pt.  
„Ścieżki sygnałowe uczestniczące w regulacji wakuolarnej H<sup>+</sup>-ATPazy w  
warunkach stresu kadmowego ”**

**Wprowadzenie**

Metale ciężkie niefunkcjonalne dla roślin, czy funkcjonalne przy ponad optymalnych stężeniach, jak kadm, rtęć czy ołów, wykazują w stosunku do nich wysoką toksyczność. Powodują zmiany procesów fizjologicznych, które prowadzą do hamowania wzrostu, ograniczenia pobierania składników mineralnych, chlorozy lub nekrozy liści, zmian ultrastruktury komórki i morfologii roślin. Jednocześnie czynnik stresujący indukuje wiele mechanizmów obronnych w roślinie pozwalających przywrócić jej homeostazę. Strategia tolerowania stresu jest dominująca w mechanizmie odporności roślin na działanie metali ciężkich. W szczególności istotne są dwa jej mechanizmy należące do strategii unikania zmian szkodliwych, mianowicie proces detoksykacji metali oraz proces usuwania reaktywnych form tlenu. Sprawna detoksykacja metali odbywa się m.in. na drodze transportu kompleksów kadmu do wakuol komórek, głównie korzenia, co ograniczona ich translokacją poprzez ksylem do części nadziemnej. Transport kompleksów do wakuoli zachodzi, w dużym uproszczeniu, za pomocą Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antyportu zależnego od gradientu H<sup>+</sup> poprzez tonoplast a odpowiedni gradient H<sup>+</sup> utrzymuje H<sup>+</sup>-ATPaza (V-ATPaza). Proponowana rozprawa doktorska poświęcona jest badaniom regulacji aktywności tonoplastowej pompy protonowej korzeni ogórka w warunkach stresu wywołanego obecnością kadmu w środowisku.

**Ocena szczegółowa dysertacji**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Zboińskiej jest opracowaniem obszernym, zawartym na 230 stronach maszynopisu. Zawiera 72 ryciny złożone i 4 tabele. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje istotne części składowe tj. wstęp, przegląd literatury, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz 496 zacytowanych pozycji literaturowych, głównie pozycji, w tym najnowszych, literatury anglojęzycznej. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów. Napisana jest w formie przyjątej dla prac naukowych.

Praca wykonana była pod kierunkiem Pani Profesor Katarzyny Kabały w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego i stanowi kontynuację wieloletnich badań Jej zespołu nad funkcjonowaniem tonoplastowych pomp protonowych w komórkach roślinnych. Rola tonoplastowych pomp protonowych w przystosowaniu roślin do stresów środowiskowych jest dobrze udokumentowana w przypadku zasolenia, niedotlenienia czy stresu niskiej



temperatury. Funkcjonalna i molekularna charakterystyka V-ATPazy w roślinach poddanych działaniu metali ciężkich jest mało rozpoznana. Wybór tematyki rozprawy doktorskiej dokonany przez Promotorkę i Doktorantę w aspekcie biologii stresu, uważam za ważny, tak ze względów naukowych jak i aplikacyjnych. Porównanie gatunków roślin wrażliwych z tolerującymi obecność metali ciężkich wskazuje, że odporność na metale związana jest zazwyczaj z aktywnością białek transportowych w błonach. Aktywność tych białkowych systemów zależy w dużej mierze od aktywności wakuolarnych pomp protonowych. Z drugiej strony pompy protonowe jak i inne białka błonowe narażone są na szkodliwe działanie metali.

Kadm jest jednym z groźniejszych zanieczyszczeń środowiska. Do głównych źródeł emisji kadmu zaliczyć można procesy spalania w sektorze komunalnym. Pierwiastek ten występuje w powietrzu najczęściej w postaci tlenków, które są łatwo rozpuszczalne w wodzie. Na skutek tego bardzo łatwo dochodzi do skażenia tym metalem ekosystemów wodnych, ale także i gleby. Jest on szczególnie niebezpieczny przez łatwość w jego akumulowaniu w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Ze względu na szerokie występowanie kadmu w przemyśle, stanowi on istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Biorąc pod uwagę powyższe fakty szczególnie istotne jest zintensyfikowanie badań zmierzających do pełnego zrozumienia mechanizmu odpowiedzi roślin na ekspozycję na kadm. Reakcja na stres stanowi wielowymiarową sieć zależności molekularnych przekładających się na wiele płaszczyzn, jak np. morfologię czy fizjologię rośliny. Mimo prowadzenia wielu badań, identyfikacja szlaków sygnałowych kluczowych dla regulacji odpowiedzi na stres, określenie mechanizmu ich działania oraz późniejsze wykorzystanie tej wiedzy w celu sterowania odpowiedzią roślin, czyniąc je lepiej zaadaptowanymi, wciąż wymaga zaangażowania badaczy.

**Nadrzędnym celem pracy**, zdefiniowanym na str. 65 rozprawy, było przedstawienie nowego spojrzenia na zagadnienie negatywnej regulacji wakuolarniej pompy protonowej przez kadm. W związku z tym podjęto badania, których ideą było poznanie elementów uczestniczących w regulacji V-ATPazy w roślinach poddanych działaniu kadmu oraz określenie ich roli w indukowanych przez Cd mechanizmach prowadzących do hamowania funkcji tego enzymu.

**Aby osiągnąć założony cel Doktorantka badała:**

- Wpływu  $H_2O_2$ ,  $H_2S$ , NO oraz fitohormonów na aktywność V-ATPazy, mierzoną zarówno jako hydroliza ATP jak i zależny od ATP transport protonów, we frakcjach tonoplastowych izolowanych z roślin kontrolnych oraz poddanych działaniu kadmu. Do doświadczeń Doktorantka użyła rośliny traktowane w/w małymi cząsteczkami sygnałowymi oraz hormonami, jak również inhibitorami biosyntezy tych związków lub ich zmiataczami.
- Wpływ cząsteczek sygnałowych, kwasu jasmonowego i kadmu na ekspresję wybranych genów *VHA* kodujących podjednostki V-ATPazy oraz poziom białka podjednostek VHA-A, VHA-B i VHA-E w korzeniach ogórka poddanych stresowi.



- Wpływ S-sulfhydracji na aktywność hydrolityczną V-ATPazy. Było to bardzo ciekawe podejście metodyczne.
- Wielokierunkowe powiązania pomiędzy fitohormonami i cząsteczkami sygnałowymi w regulacji aktywności V-ATPazy w stresie kadmowym, badając między innymi aktywności enzymów zaangażowanych w biosyntezę cząsteczek będących tematem zainteresowania.

Zaplanowane przez Doktorantkę zdania badawcze zostały wykonane. **Do naukowo bardzo interesujących osiągnięć należy zaliczyć:**

- Weryfikację hipotezę, że stymulujący wpływ  $H_2S$  na aktywność V-ATPazy może wynikać z indukowanej przez tą cząsteczkę S-sulfhydracji. Reakcja ta stanowi odwracalną, kowalencyjną modyfikację tioli, w tym reszt cysteinowych białek, co wpływa na ich aktywność biologiczną. Doktorantka założyła, że rolą S-sulfhydracji w warunkach stresowych może być ochrona reszt cysteiny przed indukowaną kadmem oksydacją, która hamuje aktywność enzymu. Doktorantka najpierw zdobyła pośredni dowód zachodzenia S-sulfhydracji, wykazała zmianę aktywności białka po traktowaniu korzeni ogórka  $H_2S$  eksponowanych na kadm w warunkach *in vitro*. Analiza stopnia S-sulfhydracji V-ATPazy została zawężona do trzech podjednostek enzymu: VHA-A, VHA-B i VHA-E. Dwie z nich, VHA-A i VHA-E, można było uznać za prawdopodobny cel modyfikacji z uwagi na dostępne w literaturze dane dotyczące regulacji redoks jakiej podlegają. Dla realizacji celu Autorka przeprowadziła analizy bioinformatyczne, porównała dostępne w białkowej bazie danych UniProt sekwencje aminokwasowe białek VHA podjednostek A, B i E pomiędzy *C. sativus*, *A. thaliana*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* i *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorantka wykazała, że w komórkach korzeni ogórka S-sulfhydracji ulegają podjednostki VHA-A i VHA-B V-ATPazy. Modyfikacja ta może być rozwojowo zależna, gdyż została zidentyfikowana w korzeniach kontrolnych a egzogennie podany kadm,  $H_2O_2$  i kwas jasmonowy nie wpłynęły na poziom i jakość modyfikacji. Ponadto, zaobserwowała że w reakcji frakcji białek z korzeni ogórka z przeciwciałami anti-VHA-B na błonie widoczne są dwa prążki a we frakcji białek po S-sulfhydracji obecny jest tylko jeden z nich, odpowiadający białku o większej masie, co sugeruje, że tylko jedna z izoform VHA-B ulega modyfikacji. Jest to pierwsze doniesienie tego typu. Hipotezę zweryfikowano negatywnie.
- Doktorantka zastosowała podejście genomiki translacyjnej i funkcjonalnej w identyfikacji mechanizmu działania S-sulfhydracji w aktywności V-ATPazy u ogórka. Wykorzystała mutanty *Arabidopsis thaliana*, u których jedna z konserwowanych Cys została zastąpiona Ser. Wcześniej wykazała, że w sekwencji podjednostki A wszystkich analizowanych gatunków występują 3 konserwowane reszty Cys, które dla ogórka i *Arabidopsis* numerowane są jako Cys<sub>256</sub>, Cys<sub>279</sub> i Cys<sub>535</sub>. Zastąpienie Cys<sub>256</sub> przez Ser powodowało ponad dwukrotny wzrost poziomu podjednostki VHA-A enzymu, natomiast u roślin z mutacją w Cys<sub>279</sub> ilość tego białka była niższa w porównaniu z typem



dzikiem. Mutanty nie miały istotnie obniżonego poziomu modyfikacji reszt cysteinowych białka w obrębie podjednostki VHA-A V-ATPazy.

**Poniżej chciałabym wyszczególnić zalety pracy:**

- Część teoretyczna pracy, czyli Wstęp i przegląd literaturowy, są napisane komunikatywnie i świadczą o bardzo dobrej znajomości literatury przez Doktorantkę.
- W rozdziale Materiały i metody Doktorantka precyzyjnie scharakteryzowała materiał badawczy. Opisy protokołów badań są szczegółowe. Dla lepszej czytelności niektóre informacje są zebrane w tabelach.
- W odniesieniu do całej pracy należy stwierdzić poprawność redakcyjną. Szata graficzna pracy jest bardzo staranna. Język poprawny. Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości czy błędów edytorskich, które nie pomniejszają wartości merytorycznej dysertacji.
- Rozdział Wyniki jest pełnym, obiektywnym opisem uzyskanych wyników. Dla lepszej przejrzystości tekst został podzielony na podrozdziały. Doktorantka kolejno przechodzi do opisu analiz, które w swoim założeniu powinny doprowadzić ją do osiągnięcia założonego celu.
- Wyniki badań są poparte testami statystycznymi pozwalającymi określić czy prezentowane w wynikach różnice są rzeczywiście statystycznie istotne.
- W rozdziale Dyskusja Autorka w sposób wnikliwy analizuje otrzymane wyniki, konfrontując je z najnowszymi danymi literaturowymi dotyczącymi poruszanych zagadnień.
- Szereg rycin-schematów w części teoretycznej dysertacji dobrze ilustruje opisywane zagadnienia i pozwala lepiej zrozumieć przedstawiony problem.
- Eleganckim zakończeniem pracy jest graficzna prezentacja badanych mechanizmów w postaci oryginalnego schematu, dokładniej uzupełnienie o nowe elementy dotąd obowiązującego (mowa o schemacie opublikowany przez Doktorantkę i wsp. w czasopiśmie *Physiologia Plantarum* 2018:166(2), DOI: 10.1111/ppl.12819).
- Ponadto, co jest godne podkreślenia, badania były finansowane w ramach kilku projektów, w tym projektu NCN ETIUDA. I wierzę, że zostaną opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie/czasopismach naukowych.



**Spostrzeżenia, pytania i uwagi krytyczne:**

- W mojej opinii Wstęp dysertacji nie jest do końca napisany rzeczowo. Sposobem właściwym porządkowania informacji w tej części pracy jest przyjęcie struktury zagadnieniowej. W rozdziale tym należy porządkować treści w sposób doprowadzający czytelnika do pytań, które są problemami współczesnej nauki, a których rozwiązania Doktorantka podejmuje się w swojej pracy. We wstępie pojawiają się w dużej ilości informacje, które nie stanowią punktu wyjścia dla postawionego przez Doktorantkę celu pracy.
- Jedno z ważniejszych pytań, które stawiała sobie recenzentka studiując pracę było czy cel pracy został osiągnięty i czy wnioski korespondują z wytyczony celem? Takiej odpowiedzi jasno nie uzyskałam. Doceniam jednak ogrom pracy włożony przez Doktorantkę w przeprowadzone badania i pisemne przygotowanie rozprawy.
- Zastosowano 10, 50, 100 lub 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  - jakiemu natężeniu stresu kadmowego odpowiadają wybrane stężenia - nic nie wiadomo na temat parametrów morfometrycznych i/lub fizjologicznych roślin wzrastających w wybranych stężeniach. Tym samym nie wiadomo jak interpretować opisane zmiany przy 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Czy mówimy tu o stresie łagodnym, umiarkowanym czy subletalnym dla ogórka odmiany Wiskonsin, czy możemy w ogóle mówić o tolerancji?
- Testy wrażliwości należałoby przeprowadzić dla wszystkich egzogennie podawanych związków.
- SNP przy dekompozycji generuje oprócz NO również toksyczne cyjanki (w niskich stężeniach też mogą wywoływać efekty fizjologiczne), przy tym donorze powinno się zastosować również kontrolę w postaci wyświeconego SNP, gdzie oddziałują wyłącznie cyjanki. Innymi słowy brakuje kontroli negatywnej do zastosowanego donora. Rekomenduję w przyszłości podawanie bardziej fizjologicznego donora np. GSNO.
- W związku z niekompletną wiedzą na temat enzymatycznych źródeł NO w roślinie znacznie lepszym wskaźnikiem zmian zależnych od NO jest zastosowanie zmiatacza ogólnej puli NO w postaci cPTIO lub PTIO. Poza tym NO wyrażono na g świeżej masy, a podawane są inhibitory syntezy enzymatycznej. Bardziej miarodajnym byłoby zatem wyrażenie syntezy NO na mg białka.
- W mojej opinii wyniki qPCR są tak prawdziwe, jak dobry jest gen referencyjny i osobiście nie popieram stosowania tylko jednego z nich. W tej konkretnej dysertacji ważkość zmian ekspresji jest dyskutowana ostrożnie, bez wyolbrzymiania znaczenia zmiany typu 1,5x, i słusznie, co można by w przypadku jednego genu referencyjnego poddać w wątpliwość.
- Doktorantka oceniła czystość i stężenie RNA wykorzystywanego do analiz transkryptomicznych. Warto jednak określić jego jakość, czy przypadkiem wyizolowany RNA nie jest zdegradowany. Tej oceny nie jesteśmy w stanie dokonać korzystając z urządzeń typu NanoDrop. Najprostszą metodą jest



- elektroforeza w żelu agarozowym i optyczna analiza obrazu i jakość prążków dla poszczególnych frakcji RNA. Bardziej dokładną techniką jest elektroforeza kapilarna.
- Czy w analizie ilościowej podjednostek VHA-A, VHA-B i VHA-E metodą immunodetekcji został sprawdzony, dla każdego z przeciwciał, zakres liniowości reakcji, aby uniknąć detekcji w zakresie wysycenia sygnału?
  - W jakim stopniu zastosowane inhibitory syntezy NO ( $H_2O_2$ ,  $H_2S$ ) ograniczały formowanie wybranych sygnałów w analizowanym układzie doświadczalnym? Nie widzę jak np.  $WO$  wpływał na syntezę NO. Ciężko jest zatem mówić, że np. NR jest głównym źródłem NO w korzeniach ogórka.
  - Doktorantka w Dyskusji szczegółowo omawiała własne wyniki, ale zbyt mało dążyła do uogólnień, do formułowania praw biologicznych. W tym miejscu pracy warto pochwalić się, że coś właśnie zostało zaobserwowane i opisane po raz pierwszy i co nowego wnoszą wyniki w tej pracy do wiedzy w badanej dziedzinie. Dyskusja nie nakreśla, a mogłaby, perspektywy uprawianego kierunku na przeszłość.
  - W dyskusji na str. 183. Doktorantka napisała, że obniżenie poziomu NO w korzeniach ogórka w warunkach stresu kadmowego może wynikać z zahamowania aktywności NR - dlaczego tego nie sprawdzono? Nie można zatem twierdzić, że "Pod wpływem kadmu dochodzi do hamowania aktywności V-ATPazy, co związane jest .... oraz zmniejszoną syntezą NO w wyniku hamowania reduktazy azotanowej (str. 195)".
  - Różnice w zmianie ekspresji genów *VHA-c1* i *VHA-c2* doktorantka wyjaśnia możliwością kompensacji ekspresji, co do mnie trochę nie trafia. Jeżeli autorka sugeruje możliwość istnienia mechanizmów kompensacyjnych, raczej wiąże się to z założeniem, że całkowita ekspresja białek kompleksu pozostaje bez zmian. Po co zatem dyskutować znaczenie wzrostu ekspresji jedynie genu *VHA-c2*. Uważam, że należy rozpatrywać oba geny razem. Skoro zmiany w *VHA-c2* są jednymi ze znaczniejszych, pewnie można by było pokusić się o dalszą analizę obu genów jednocześnie i poszukiwać zależności bądź skali redundancji/specjalizacji między nimi. Wydaje się to niezmiernie ciekawe.
  - Ryc. 67. Jak wytłumaczyć wzrost CAT po SNP skoro powszechnie wiadomo, że NO inhibuje CAT również u roślin?
  - Regulacja poziomu NO - to za dużo powiedziane - oznaczono tylko NR, a nawet nie wiemy w jakim stopniu odpowiada ten enzym za produkcję NO w korzeniach ogórka (aby mówić o regulacji NO musielibyśmy przynajmniej poznać poziom ONOO, aktywność GSNOR, poziom S-nitrozotoli)
  - Schemat: skoro Cd hamuje NR (główne źródło NO) to jak ma NO stymulować SA/ $H_2O_2$  w stresie kadmowym?



- Wniosek 6. W korzeniach roślin poddanych stresowi kadmowemu NR uczestniczy w wytwarzaniu  $H_2O_2$  – na podstawie korelacji nie można mówić o mechanizmie.

- Wniosek 13. Wzrost poziomu  $H_2S$ , następujący w późniejszym etapie reakcji na stres niż zmiany zawartości  $H_2O_2$  i NO, prawdopodobnie odpowiada za ochronę enzymu przed oksydacją - nie rozumiem. Skoro ROS generowane są wcześniej (od 2h) a  $H_2S$  później (od 24h) to jak ma to działać ochronnie?

Uwagi drobne:

- odmiana odporna na metale ciężkie vs odmiana wykazująca tolerancję (o odporności na stresy abiotyczne mówimy jeśli znamy podłoże genetyczne, str. 26.)

- peroksynitryl, persulfidacja czy aktywność NOS-like - to spolszczenia, które mnie wyjątkowo raziły. Według nomenklatury chemicznej to nadtlenoazotyn i S-sulhydracja oraz aktywność NOS-podobna lub aktywność podobna do NOS typu zwierzęcego

- "głównym nerwie" – określenie нефизjologiczne

- „S-nitrozylacja jest najszerzej opisaną OxPTM” - to nie O jest reaktywny, ale N

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy i w podsumowaniu stwierdzam, że treść i forma przedstawionej mi do recenzji dysertacji odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Praca stanowi element nowości naukowej w dociekaniach nad poznaniem roli tonoplastowej pomp protonowej V-ATPazy w aklimatyzacji roślin do stresów abiotycznych.

**Wniosek końcowy**

**W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Zboińskiej wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Ewa Sobieszczuk-Nowicka*  
dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka