

prof. dr hab. inż. Rafał Barański
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt.:
**„Analiza udziału białek ściany komórkowej
w odpowiedzi na stres temperaturowy
u modelowego gatunku trawy *Brachypodium distachyon*”**

autor rozprawy:
mgr Artur Piński

Podstawa prawna

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z dnia 15.07.2021 powołująca recenzentów do oceny rozprawy „Analiza udziału białek ściany komórkowej w odpowiedzi na stres temperaturowy u modelowego gatunku trawy *Brachypodium distachyon*” przedłożonej przez jej autora mgr Artura Pińskiego. Uchwała została podjęta zgodnie z art. 14 ust. 2 pkt. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. z 2017 r., 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 r., poz. 1669). W związku z powyższym, w recenzji uwzględniono wymagania i sformułowano konkluzje na podstawie przepisów zawartych w wyżej wymienionych ustawach.

Opis rozprawy

Badania będące podstawą do rozprawy zostały wykonane w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego. Promotorem jest prof. dr hab. Robert Hasterok, a promotorem pomocniczym dr hab. Alexander Betekhtin, prof. UŚ. Rozprawa została przygotowana w roku 2021. Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane w ramach dwóch projektów badawczych NCN: 1) Harmonia-6 nr 2014/14/M/NZ2/00519 realizowany w latach 2015-2019 i którego kierownikiem był promotor prof. dr hab. Robert Hasterok oraz 2) Preludium-16 nr 2018/31/N/NZ1/01418, realizowanego zgodnie z planem w latach 2019-2022 i którego kierownikiem jest autor rozprawy mgr Artur Piński.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl trzech artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem.

- 1) **Piński A**, Betekhtin A, Sala K, Godel-Jedrychowska K, Kurczynska E, Hasterok R. Hydroxyproline-rich glycoproteins as markers of temperature stress in the leaves of *Brachypodium distachyon*. Int J Mol Sci 2019, 20(10), 2571, doi:10.3390/ijms20102571.

- 2) **Pinski A**, Betekhtin A, Skupien-Rabian B, Jankowska U, Jamet E, Hasterok R. Changes in the cell wall proteome of leaves in response to high temperature stress in *Brachypodium distachyon*. *Int J Mol Sci* 2021, 22(13), 6750, doi: 10.3390/ijms22136750.
- 3) Hus K, Betekhtin A, **Pinski A**, Rojek-Jelonek M, Grzebelus E, Nibau C, Gao M, Jaeger K.E, Jenkins G, Doonan J.H, Hasterok R. A CRISPR/Cas9-based mutagenesis protocol for *Brachypodium distachyon* and its allopolyploid relative, *Brachypodium hybridum*. *Front Plant Sci* 2020, 11, 614, doi:10.3389/fpls.2020.00614.

Artykuły zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych o uznanej renomie i charakteryzujących się znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi tj: dwa artykuły w *International Journal of Molecular Science* (aktualny IF: 5,923; 140 pkt. w listy czasopism MEiN za lata 2019 i 2021) i jeden artykuł w *Frontiers in Plant Science* (aktualny IF: 5,753; 100 pkt. w listy czasopism za rok 2020). Rozprawa obejmuje oprócz artykułów, streszczenie w j. polskim i angielskim, spis treści i wykaz artykułów stanowiących cykl, przegląd literatury stanowiący wprowadzenie do prowadzonych badań, cel badań, rozdział poświęcony wykorzystanym materiałom i metodom oraz omówienie wyników i ich dyskusję. Część opisową zamyka sześć wniosków podsumowujących badania i spis wykorzystanej literatury. Opracowanie to jest podsumowaniem treści zawartych w cyklu trzech artykułów. Doktorant jest pierwszym autorem w dwóch pierwszych artykułach i trzecim spośród jedenastu w trzecim artykule. We dwóch pracach Doktorant uczestniczył w opracowywaniu koncepcji badań i projektowaniu doświadczeń, przeprowadzał eksperymenty i analizował uzyskane wyniki. Ponadto w pracy pierwszej analizował ekspresję genów, wykonał dokumentację graficzną obserwacji mikroskopowych i opracował manuskrypt w wersji oryginalnej i końcowej. W pracy drugiej zajmował się analizą białek i ekspresją genów, opracował manuskrypt w wersji oryginalnej i końcowej, zdobył środki na badania. W pracy trzeciej uczestniczył w planowaniu eksperymentów, wykonywał je i analizował wyniki oraz uzyskał mutanty z inaktywowanymi genami. Całościowo, Jego wkład w powstanie artykułów jest znaczący, co potwierdza pierwsza pozycja na liście autorów (dwa artykuły) i przypisana rola autora korespondencyjnego (jeden artykuł), i co jest zgodne z oświadczeniami pozostałych współautorów dołączonych do rozprawy jak i deklaracjami opisującymi wkład autorów zawartymi bezpośrednio w opublikowanych artykułach.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przesłanką do podjęcia badań opisanych w rozprawie są zmiany klimatyczne, których nasilające się skutki negatywnie oddziałują na środowisko. Szczególnie wrażliwe na zmiany temperatury i dostępności wody są rośliny uprawne, które stosowane w nowoczesnej produkcji rolniczej wymagają zapewnienia rygorystycznych warunków. Nawet niewielkie anomalie w trakcie okresu wegetacyjnego zaburzające zdolność roślin do pobierania wody i składników mineralnych, modyfikujące procesy metaboliczne zachodzące w komórkach i tym samym wpływające na funkcjonowanie całych organizmów zwykle prowadzą do obniżenia plonu jak i jego jakości. Skutkuje to produktami rolnymi o obniżonej wartości odżywczej, przydatności do spożycia, przechowywania i przetwarzania w produkcji przemysłowej. Straty ekonomiczne są odczuwalne przez producentów, a wywołane nimi podwyżki cen surowców rolnych i przetworzonych produktów niosą za sobą dodatkowe obciążenie dla konsumentów. Nowoczesne, zrównoważone rolnictwo oparte o bezpieczne wykorzystanie zasobów naturalnych wymaga wdrażania do produkcji rolniczej odmian

charakteryzujących się tolerancją na szereg stresów, w tym abiotycznych takich jak stres temperaturowy. Uzyskanie takich form uprawnych wymaga najpierw zrozumienia mechanizmów reakcji roślin na stres, a w szczególności mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za reakcję obronną i adaptacyjną. Reakcja ta jest zawsze wielopoziomowa i objawia się zmianami ekspresji genów prowadzącymi do modyfikacji składu białkowego i metabolitów zaangażowanych w tak różnorodne i złożone procesy jak chociażby fotosynteza, transport, przekazywanie sygnałów czy budowa komórek, tkanek i organów. Szczególną rolę ochronną przed różnymi stresami stanowi ściana komórkowa. Dlatego zrozumienie zmian zachodzących w jej składzie i strukturze oraz jakie mechanizmy prowadzą do tych zmian stanowi kluczowe wyzwanie. Ich poznanie, w dobie galopującego postępu metod precyzyjnej inżynierii genetycznej, umożliwi projektowanie rearanżacji materiału genetycznego mające na celu aktywowanie i utrwalanie zmian prowadzących w efekcie do pozyskania materiałów roślinnych wyróżniających się nowymi cechami sprzyjającymi funkcjonowaniu roślin w warunkach stresowych i tym samym wartościowych dla zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego w przyszłości. Z tych względów podjęta tematyka badawcza przez Autora rozprawy jest w pełni uzasadniona i ważna. Doktorant zmierza bowiem do poznania mechanizmów odpowiedzi roślin na stres temperaturowy poprzez badanie białek ściany komórkowej. Znaczenie różnych białek występujących w ścianie komórkowej w kontekście reakcji roślin na stres przedstawił w rozdziale zatytułowanym Wprowadzenie. Krótko i przejrzyście wskazane zostały główne grupy białek ze szczególnym uwzględnieniem tych, które były przedmiotem badań Doktoranta. Wprowadzenie zawiera także wyjaśnienie użycia *Brachypodium distachyon* jako materiału badawczego z uwagi na jego modelowy charakter. Należy przyznać, że dobór gatunku jest trafny właśnie z uwagi na postęp jaki w ostatnich latach został dokonany pod względem poznania genomu i budowy komórkowej tego reprezentanta roślin zbożowych, w czym niewątpliwie znaczącą rolę odgrywa zespół naukowców Uniwersytetu Śląskiego, z którym Doktorant ma możliwość współpracy. Pomimo dużej skrótowości rozdziału wprowadza on w najistotniejsze zagadnienia uzasadniające podjętą tematykę i wyznacza kierunki badawcze realizowane w trakcie doktoratu i opisane w rozprawie.

Głównym celem badawczym było scharakteryzowania zmian w ścianie komórkowej u *B. distachyon* pod względem składu białkowego w odpowiedzi na stres wywołany niską (4 °C) i wysoką temperaturą (40 °C) względem optymalnej (ok. 21 °C). W szczególności celami było określenie rozmieszczenia epitopów AGP i ekstensyn w liściach w warunkach kontrolnych i ich zmiany po traktowaniu niską i wysoką temperaturą. W dalszej kolejności powiązanie tych zmian z profilem ekspresji genów kodujących badane grupy białek. Ostatecznym celem było uzyskanie mutantów z inaktywowanymi genami kodującymi wybrane w toku badań białka ściany komórkowej tj. białko arabinogalaktanowe typu Fasciclin i metyloesterazę pektynową.

Dla realizacji powyższych celów Doktorant przeprowadził szereg eksperymentów i analiz immunocytochemicznych, proteomu ściany komórkowej, ekspresji genów, a także ukierunkowanej mutagenyzy z wykorzystaniem wektorów CRISPR/Cas9. Zarówno materiał badawczy jak i metody stosowane we wszystkich pracach zostały zwięźle i spójnie przedstawione w rozdziale Materiał i metody. Dzięki temu Doktorant uniknął zbędnych powtórzeń przy omawianiu poszczególnych artykułów. Dobór materiału i metod, układ doświadczalny i zastosowane metody analizy wyników uważam za trafny. Udział Doktoranta w wykonywaniu różnorodnych analiz od przygotowania preparatów i wykonania obserwacji

mikroskopowych poprzez analizy genetyczne i proteomu po inżynierię genetyczną wektorów oraz transformację genetyczną protoplastów i uzyskanie zmutowanych roślin w warunkach kultur *in vitro* wskazuje na opanowanie przez Autora rozprawy szerokiego wachlarza narzędzi, technik i metod badawczych zarówno tych rutynowo stosowanych w badaniach biologicznych jak i tych wymagających pogłębionej wiedzy i dużego doświadczenia.

Rozprawa doktorska musi charakteryzować się nowością osiągnięć o znaczeniu dla rozwoju dyscypliny naukowej oraz w przypadku cyklu publikacji, merytoryczną ich spójnością. Zaprezentowane w rozprawie artykuły z wynikami badań niewątpliwie spełniają te wymagania. Jak wspomniano powyżej, wszystkie prace koncentrują się wokół wspólnego celu, obejmują jeden dobrze zdefiniowany materiał badawczy wykorzystywany we wszystkich badaniach, który poddawany jest ustalonemu traktowaniu stresorem. Analizy i wnioski ukierunkowane są na zdefiniowaną grupę związków i genów je kodujących. Opisane eksperymenty łączą się w logiczny ciąg, w których wyniki wcześniejszych badań implikują decyzje o kształcie i zakresie kolejnych eksperymentów. W wyniku złożonych badań Doktorant uzyskał nowe wartościowe wyniki, które poszerzają obecną wiedzę dotyczącą budowy ściany komórkowej i zmian w niej zachodzących w wyniku procesów aktywacji i represji wskazanych genów i zachodzących pod wpływem oddziaływania stresu temperaturowego. Wyniki te i wypływające z nich wnioski będą przydatne przy planowaniu i realizowaniu kolejnych etapów badań wykraczających już poza zakres niniejszej rozprawy. Ponadto, opracowane zostały nowe metodyki umożliwiające planowanie i wykonanie ukierunkowanej mutagenyzy *Brachypodium* z wykorzystaniem systemów opartych o mechanizm CRISPR/Cas9. Poszerzony został zatem warsztat badawczy dla przyszłych badań biologicznych w tym gatunku. Zostały także wytworzone unikalne materiały badawcze stanowiące mutanty typu knockout, które będą stanowiły dogodny przedmiot kolejnych eksperymentów dla zdobycia dalszych wyników dotyczących funkcjonowania roślin w warunkach stresu.

Do najważniejszych oryginalnych osiągnięć zaprezentowanych w rozprawie zaliczyłbym:

- 1) zobrazowanie rozmieszczenia białek ściany komórkowej w poszczególnych tkankach liścia *B. distachyon*,
- 2) wykazanie zmian obecności białek AGP, ale nie ekstensyn, w wyniku traktowania stresem niskiej i wysokiej temperatury oraz lokalizację tych zmian do określonych tkanek liścia,
- 3) wykazanie znacznie bardziej znaczących zmian wywołanych wysoką temperaturą w stosunku do traktowania niską temperaturą,
- 4) wskazanie genów, których ekspresja ulega zmianie w wyniku traktowania stresem temperaturowym i wykazanie różnej reakcji w zależności czy stres wywołany jest niską czy wysoką temperaturą,
- 5) wskazanie białek ściany komórkowej uczestniczących w reakcji na stres temperaturowy oraz zmian budowy niektórych z nich oraz związek z budową ściany komórkowej,
- 6) uzyskanie mutantów funkcjonalnych w obrębie genów białka AGP typu Fasciclin i metyloesterazy pektynowej stanowiących unikalne materiały do dalszych badań.

Uwagi i pytania

Cała rozprawa została przygotowana starannie pod względem redaktorskim z jasno wydzielonymi rozdziałami i podrozdziałami. Opis metod, wyników i dyskusja napisane są logicznie, zwięźle i w przejrzysty sposób, z użyciem fachowej poprawnej terminologii

naukowej, z przestrzeganiem reguł pisowni. Rozdział wprowadzający sprawia jednak wrażenie niedopracowanego pod względem językowym (np. „wyniki badań są /.../ niejednorodne pod względem obszarów geograficznych”; powiększająca się populacja ludzi i zmniejszająca się powierzchnia gruntów /.../ wymusza wzrost produktywności roślin”; „Badania /.../ skupiały się na *Brachypodium*”; „*B. distachyon* posiada /.../ genom referencyjny”), czego nie można zarzucić kolejnym rozdziałom. Z drobnych uwag chciałbym także zwrócić uwagę na kilkukrotne błędne stosowanie określenia „hodowla”. Poprawne znaczenie tego terminu odnosi się do procesu tworzenia lub reprodukcji odmian, a nie uprawy roślin, choć potocznie często właśnie tak jest stosowany.

Uważam także, że nie mają specjalnego uzasadnienia zawarte w opracowaniu rozważania na temat efektywności systemu ukierunkowanej mutagenезы i frekwencji występowania określonych typów mutacji w przypadku porównywania zaledwie kilku mutantów.

Kilka aspektów jest w mojej opinii wartych dyskusji. Prosiłbym o ustosunkowanie się podczas obrony do poniższych kwestii.

1. Prosiłbym o komentarz dotyczący stwierdzenia zawartego w rozdziale wprowadzającym, które mnie zaintrygowało i mówiącego, że białka ściany komórkowej stanowią do 10% suchej masy u roślin dwuliściennych i do 1% u roślin jednoliściennych. Czym można tłumaczyć tak dużą różnicę i jakie może mieć to znaczenie dla funkcjonowania roślin?
2. W pracy wykrywana była obecność różnych epitopów, np. AGP, dzięki zastosowaniu zestawu przeciwciał monoklonalnych. Prosiłbym o krótkie omówienie na czym polegają różnice w budowie epitopów i jakie ma to implikacje pod względem funkcji epitopów.
3. Prosiłbym o komentarz, jak można tłumaczyć silniejsze zmiany w składzie ścian komórkowych i ekspresji genów zaobserwowane przy stresie podwyższoną temperaturą w stosunku do stresu niską temperaturą.
4. Prosiłbym o opinię, czy przeprowadzanie testów skuteczności wektorów CRISPR/Cas9 poprzez dostarczanie ich do protoplastów ma uzasadnienie w świetle uzyskanych wyników i czy należy zatem takie testy w przyszłości przeprowadzać?

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych metod w celu uzyskania zakładanych celów, a wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także, że mgr Artur Piński wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując, uważam że praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr. Artura Pińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 17 września 2021



prof. dr hab. Rafał Barański