



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. Katarzyna Niedojadło, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 22.09.2021

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr. Artura Pińskiego
pt. „*Analiza udziału białek ściany komórkowej w odpowiedzi na stres temperaturowy u modelowego gatunku trawy *Brachypodium distachyon**”

wykonanej w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin
Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Hasteroka jako promotora
oraz dr hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ jako promotora pomocniczego

Ściana komórkowa to dynamiczna i wielofunkcyjna struktura, która nie tylko koordynuje wzrost i warunkuje kształt komórki ale zapewnia także kontakt i wymianę cząsteczek sygnałowych między komórkami oraz chroni komórkę/roślinę przed niekorzystnym wpływem abiotycznych i biotycznych czynników środowiska. Obecne badania naukowe skupiające się na poznaniu molekularnych mechanizmów powyższych procesów, mają nie tylko charakter badań podstawowych ale również istotną wartość aplikacyjną. Poznanie architektury i zmian w składzie macierzy zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi komórki/rośliny na zmieniające się (niekorzystne) warunki środowiska otwiera możliwość opracowania w przyszłości odmian roślin o pożądanym właściwościach. Realizowany w ramach rozprawy doktorskiej projekt naukowy Pana mgr. Artura Pińskiego skupia się na zagadnieniach związanych z wpływem stresu temperaturowego na białka ściany komórkowej *Brachypodium distachyon*, modelowego gatunku dla traw, m.in. zbóż i roślin energetycznych, blisko spokrewnionego z najważniejszymi pod względem ekonomicznym zbożami, takimi jak pszenica, jęczmień i owies. Badania Doktoranta są niezwykle cenne, bowiem wpisują się nurt wiodących na świecie kierunków badań, związanych z przeciwdziałaniem wpływu negatywnych skutków zmian klimatu wynikających z globalnego ocieplenia m.in. na produkcję roślin uprawnych i wzrastające zapotrzebowanie na żywność.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Artura Pińskiego to zbiór trzech oryginalnych artykułów stanowiących spójną tematycznie i logicznie całość. Prace opublikowane zostały w czasopiśmie indeksowanym w bazie JCR o łącznym wskaźniku IF 16,232



i pkt MNISW 380. Według dołączonych przez Doktoranta i współautorów publikacji oświadczeń, Pan mgr Artur Piński ma znaczący udział w ich powstawaniu, m.in. w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu eksperymentów i analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W dwóch pierwszych pracach z cyklu Pan mgr Artur Piński jest pierwszym autorem i w jednej autorem korespondencyjnym. Warto podkreślić, że badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki pozyskanych przez promotora ale również Pana mgr. Artura Pińskiego. Ponadto artykuły są efektem licznej współpracy z zespołami macierzystego Wydziału ale także z innych ośrodków w Polsce i za granicą. W świetle tych informacji Pan mgr Artur Piński jawi się jako niezwykle aktywny i skuteczny młody naukowiec, który potrafi pozyskać środki finansowe na własne badania, współpracuje i zdobywa doświadczenia od innych naukowców.

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmuje sześć rozdziałów, z których pierwszy to „Autoreferat rozprawy” z klasycznym układem podrozdziałów, typowym dla prac naukowych. Rozpoczyna się on „Wprowadzeniem”, w którym Pan mgr Artur Piński w zwięzły sposób naświetla podjęty problem badawczy i podkreśla unikalność realizowanego projektu. Następnie Doktorant przechodzi do podrozdziału „Cel pracy doktorskiej”, w którym zgodnie z kolejnością załączonych publikacji, przedstawia realizowane cele (aczkolwiek zabrakło mi w wymienianych punktach odnośników do danych publikacji). Warto podkreślić, że stawiane przez Doktoranta cele badawcze są precyzyjne i spójne. Warsztat naukowy Pana mgr. Artura Pińskiego jest imponujący i obejmuje szeroki wachlarz metod, m.in. technik *in situ* i metod biologii molekularnej, w tym inżynierii genetycznej. „Materiały i metody” to przegląd stosowanego panelu technik immunocytochemicznych, RT-qPCR, analizy proteomu ściany komórkowej z zastosowaniem chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz ukierunkowanej mutagenezy z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9. Wszystkie wymienione techniki są właściwe dla realizacji zadań badawczych Doktoranta. W najobszerniejszym z podrozdziałów pt. „Wyniki i dyskusja” Pan mgr Artur Piński przedstawia uzyskane wyniki badań zgodnie z kolejnością stawianych sobie celi badawczych i dołączonych w rozprawie doktorskiej publikacji. Wyniki uzupełnione są krótką dyskusją. Rozdział I kończy się wykazem cytowanych prac. Rozdział II zawiera publikacje stanowiące cykl ocenianej rozprawy doktorskiej. W Rozdziale III Pan mgr Artur Piński podsumowuje uzyskane wyniki prezentując sześć ogólnych wniosków końcowych. Rozprawa doktorska uzupełniona jest także streszczeniem w



języku polskim (Rozdział IV) i angielskim (Rozdział V) oraz dołączonymi oświadczeniami współautorów wszystkich publikacji (Rozdział VI).

Cele badawcze ocenianej rozprawy doktorskiej zostały przez Pana mgr. Artura Pińskiego w pełni osiągnięte. Doktorant podjął się próby scharakteryzowania w liściach *Brachypodium distachyon* zmian w dystrybucji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak AGP (białka arabinogalaktanowe) i EXT (ekstensyny) w odpowiedzi na stres wywołany obniżoną (4°C) i podwyższoną (40°C) względem optymalnej (21°C) temperaturą. W roślinach kontrolnych za pomocą technik immunofluorescencyjnych Doktorant lokalizował białka AGP głównie w apoplacie wiązek przewodzących ale także komórek je otaczających, tj. w zewnętrznej i wewnętrznej pochwie okołowiazkowej, natomiast EXT wykrywał na terenie macierzy zewnątrzkomórkowej mezofilu. W roślinach poddanych działaniu wysokiej i niskiej temperatury istotne zmiany w dystrybucji i poziomie badanych białek Pan mgr Artur Piński odnotował dla AGP wiązanych przez cztery przeciwciała - JIM8, JIM16, LM2 i LM6. W przypadku stresu wywołanego wysoką temperaturą poziom antygenów dla przeciwciał JIM8, LM2 i LM6 wzrastał. W porównaniu do liści roślin kontrolnych, oprócz apoplastu wiązek przewodzących, intensywniejsze sygnały fluorescencji odnotowano dla AGP wiązanych przez LM2 w ścianach komórkowych epidermy i mezofilu. Epitop wiązany przez przeciwciała JIM16 nie został wykryty w miękiszu ksylemu. W roślinach poddanych stresowi niskiej temperatury poziom badanych białek AGP obniżał się a istotne różnice odnotowano dla AGP wiązanych przez przeciwciała JIM16. W przypadku immunolokalizacji EXT Doktorant nie uzyskał istotnych różnic w poziomie sygnału fluorescencji a także nie zaobserwował zmian w ich dystrybucji.

AGP wpływają na właściwości ściany komórkowej poprzez oddziaływanie z β -glikanami. Wiadomo że arabinogalaktany typu II mogą wiązać się z pektynami i poprzez oksydacyjne sieciowanie łańcuchów HG (homogalaktouronian) prowadzić do wzmocnienia struktury ściany komórkowej. Z drugiej strony AGP przypisuje się także rolę plastyfikatorów pektyn, odpowiadających za wzrost porowatości ścian komórkowych a tym samym wpływają więc na ruchliwość i dostępność enzymów i cząsteczek sygnałowych. Czy według Doktoranta u *Brachypodium distachyon* poddanych działaniu niskiej/wysokiej temperatury zaobserwowane zmiany wzmożonej syntezy/degradacji AGP albo enzymatycznej modyfikacji tych białek (?) mogą dowodzić proponowanym funkcjom AGP w odpowiedzi komórki/rośliny na stres temperaturowy? Dane literaturowe odnoszące się do tych zagadnień są do tej pory fragmentaryczne. Interesującym aspektem uzyskanych wyników jest także obserwowany przez Doktoranta wzrost poziomu AGP



w ścianach komórek mezofilowych. AGP zaangażowane są nie tylko we wzrost ale także różnicowanie komórek, m.in. w przekształceniu komórek mezofilu w elementy przewodzące. Czy podobny mechanizm funkcjonowałby u badanego gatunku? W prezentowanych wynikach badań immunolokalizacji zabrakło mi danych ilościowych pomiarów intensywności fluorescencji. Dane liczbowe jednoznacznie pozwoliłyby na określenie różnic w poziomach badanych AGP w poszczególnych typach komórek i tkanek. Stosowanie określenia typu „wzrost intensywności sygnału” – ale o ile?, „obecny w niewielkiej ilości”, „epitop był bardziej obfity” nie pozwalają w pełni porównywać zmian w poziomach badanych AGP w porównaniu do roślin kontrolnych. Dołączona w publikacji tabela z pewnością ułatwia analizę uzyskanych wyników a są to dane subiektywne. Zachęcam także Doktoranta w przyszłości do rozszerzenia tych badań o immunolokalizację badanych AGP i EXT na poziomie ultrastruktury. Zastosowanie mikroskopii elektronicznej z pewnością uzupełni wiedzę dotyczącą dystrybucji badanych białek w liściach *Brachypodium distachyon* nie tylko w macierzy zewnątrzkomórkowej ale także w miejscach ich syntezy, czy modyfikacji.

W kolejnym etapie badań Pan mgr Artur Piński określił poziom transkryptów wybranych genów kodujących białka AGP i ekstensyny, które usztywniają i „stabilizują” ścianę komórkową. Doktorant poddał analizie ekspresję pięciu genów kodujących białka FLA (ang. *Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein*) - białek AGP podobnych do faskylin oraz dziewięć genów kodujących kinazy receptorowe ekstensyn i białek podobnych do ekstensyn (ang. *EXT-like receptor kinase*) w liściach *Brachypodium distachyon* kontrolnych oraz poddanych stresowi niskiej i wysokiej temperatury. W przypadku transkryptów wszystkich pięciu genów *FLA* poziom w porównaniu do wariantu kontrolnego istotnie wzrastał w roślinach poddanych inkubacji w 40°C, natomiast w przypadku trzech wzrost odnotowano także w roślinach poddanych niskiej temperaturze. Z kolei analizy drugiej grupy genów wykazały wzrost ekspresji i akumulacji transkryptów czterech genów w roślinach poddanych stresowi wysokiej temperatury i dwóch w roślinach poddanych inkubacji w 4°C. W przypadku genów *FLA* wzrost poziomu ekspresji *Bradi2g60270* Doktorant odnotował tylko w roślinach poddanych działaniu wysokiej temperatury a genu *Bradi3g39740* aż 28-krotny wzrost poziomu transkryptu w tym wariantcie hodowli. Z kolei ekspresję genu ekstensyny *PERK Bradi3g31976* Doktorant obserwował tylko w roślinach poddanych zarówno stresowi niskiej i wysokiej temperatury. Ponieważ glikoproteiny ścienne ulegają intensywnym modyfikacjom potranslacyjnym, poziom transkryptu tego białka trudno jest interpretować w kontekście jego funkcji. Na przykład reszty cukrowe stanowią ponad 90% masy AGP



i to one determinują daną rolę białka. Jednakże niezwykle istotny wzrost lub pojawienie się transkryptu danego genu daje podstawy do rozpatrywania go jako ważnego i biorącego udział w odpowiedzi rośliny na stres. Aby lepiej określić rolę białka należałoby jednak poznać ilość białka z odpowiednią modyfikacją oraz jego lokalizację w poszczególnych typach komórek. Obecnie technika mikrodysekcji laserowej daje możliwość analizy transkryptomu i proteomu pojedynczej komórki, czy grupy komórek danego typu tkanki. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktoranta, czy widzi zasadność zastosowania tej techniki w swoich badaniach i jeśli tak, to w jakim kontekście?

Kolejnym wyzwaniem Pana mgr. Artura Pińskiego było określenie zmian w proteomie ścian komórek liści *Brachypodium distachyon* poddanych stresowi wysokiej temperatury (Piński i wsp. 2021). Analiza białek z wykorzystaniem chromatografii LC-MS/MS umożliwiła identyfikację 1533 unikalnych białek, z których 338 stanowiło grupę białek ściany komórkowej. Wśród nich 39 to nowo zidentyfikowane białka macierzy zewnątrzkomórkowej u tego gatunku z 738 białek znajdujących się w bazie *WallProtDB* dla *B. distachyon*. Zaskakująca jest tak duża ilość białek, które nie są klasyfikowane jako białka ścianowe (1195). Czy tak duża ilość białek świadczy o tym, że ściana komórkowa jest bogata w białka występujące w protoplaście, czy są to zanieczyszczenia? Jeśli to ta druga ewentualność, to czy metoda izolacji białek ścianowych jest właściwa? Na podstawie jakich cech Doktorant wybrał 338 białek i określił je jako ścianowe? W roślinach kontrolnych zidentyfikowano 311 białek natomiast w roślinach poddanych temperaturze 40°C 253. Doktorant wykazał brak 60 białek macierzy zewnątrzkomórkowej roślinach poddanych stresowi, które obecne były z kolei w roślinach kontrolnych. W przypadku 46 białek z 7 funkcjonalnych klas Pan mgr Artur Piński wykazał zróżnicowaną obecność, wśród nich 4 białka były na wysokim a 42 na niskim poziomie w roślinach poddanych inkubacji w temperaturze 40°C. Były to enzymy działające na polisacharydy ścian należące do hydrolaz glikozydowych (w tej grupie Doktorant odnotował istotny wzrost inhibitora ksylanazy/chitynazy klasy II z rodziny GH18 i obniżenie poziomu poligalaktouronazy z rodziny GH28), proteaz asparaginowych, peroksydaz klasy III i lipaz GDSL. Następnie Doktorant dla 5 z 6 genów (*Bradi1g52050*, *Bradi1g38780*, *Bradi1g5250*, *Bradi1g25517*, *Bradi1g58997*, *Bradi4g09417*, *Bradi4g09430*) wykazał korelację między poziomami transkryptu danego genu i białka. Według Pana mgr. Artura Pińskiego analiza proteomiczna jest bardziej informatywna niż analiza ekspresji genu, ponieważ pozwala na identyfikację białek uwzględniając różne poziomy regulacji ich syntezy (w tym potranskrypcyjna, czy czas półtrwania mRNA i białka) podczas całego okresu 24 godzinowego poddawania roślin



wysokiej temperaturze. Dzięki porównaniu proteomów ścian komórkowych liści roślin obu wariantów hodowli Doktorant w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury wskazał obniżoną aktywność proteaz, lignifikację, oraz ekspansję i rearanżację ścian komórkowych wynikającą z modyfikacji jej elementów polisacharydowych, zwłaszcza pektyn. W przeprowadzonej analizie nie udało się zidentyfikować białek AGP. Złożone polisacharydowe łańcuchy boczne osłaniają białkowy rdzeń, co prawdopodobnie uniemożliwia izolację białek.

Kolejnym celem rozprawy doktorskiej Pana mgr. Artura Pińskiego była inaktywacja u *Brachypodium distachyon* genu kodującego FLA (*Bradi3g39740*) i PME (metyloesteraza pektynowa) (*Bradi3g24750*) przy użyciu technologii CRISPR/Cas9. Ostatnia z prac ocenianego cyklu (Hus i wsp. 2020) zawiera szczegółowy protokół opracowanej metody. Bardzo wysoko oceniam tę publikację, ponieważ technika ta jest nowatorska i ciągle rzadko stosowana w badaniach roślin. W przypadku mutantów obu genów Doktorant nie zaobserwował znaczących różnic we wzroście roślin w odpowiedzi na stres temperaturowy, w przeciwieństwie do stresu solnego, który hamował kiełkowanie i wzrost mutantów. W związku z brakiem wyników potwierdzających powyższe wnioski w rozprawie doktorskiej (dane niepublikowane) prosiłabym Doktoranta aby w trakcie obrony przedstawił dodatkowe dane. Brak efektu mutacji obu genów w przypadku stresu wysokiej temperatury według Pana mgr. Artura Pińskiego wynika z tego, że geny *FLA* i *PME* należą do rodzin wielogenowych i ich inaktywacja może być kompensowana ekspresją innych genów w rodzinie. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktoranta ile jest genów kodujących FLA i PME w tych rodzinach i ile z tych genów jest aktywnych transkrypcyjnie w liściach? Czy nie należało się spodziewać takich wyników? Czy w związku z tym Doktorant inaczej zaprojektowałby to doświadczenie dzisiaj? Podsumowując, chciałabym podkreślić, że system ukierunkowanej mutagenyzy jest doskonałym narzędziem, które otwiera Doktorantowi możliwości dokonywania analiz funkcjonalnych kolejnych genów białek ścian komórkowych u badanego gatunku.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pana mgr Artura Pińskiego spełnia wszystkie warunki ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust.1 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Artura Pińskiego przez Radę Naukową w



dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wartościowe, nowatorskie i opublikowane wyniki badań zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej przez mnie rozprawy doktorskiej.

Katarzyna Niedojadło