



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD FIZJOLOGII MOLEKULARNEJ ROŚLIN
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 41 16
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Wrocław, 11.12.2019r.

Dr hab. Małgorzata Janicka, prof. UW
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytetu Wrocławskiego

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Paweli zatytułowanej:
„Rola transporterów ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego u *Medicago truncatula*”

W naturalnych warunkach rośliny stale narażone są na działanie różnych czynników stresowych. Ilość tych czynników rośnie wraz ze wzrostem uprzemysłowienia oraz postępującym skażeniem środowiska. Z uwagi na niekorzystne zmiany klimatu, takie jak wzrost średnich temperatur, zmniejszenie ilości opadów skutkujące wzrostem powierzchni obszarów suchych, a przez to i zasolonych – stres wodny, osmotyczny stają się poważnym zagrożeniem dla współczesnego rolnictwa. Stąd kompleksowe zrozumienie reakcji obronnych roślin na dehydratację oraz scharakteryzowanie białek zaangażowanych w te reakcje wydaje się być niezwykle ważne. Stres osmotyczny jest najpierw spostrzegany przez komórkę jako zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu plazmolemy. Jest to spowodowane utratą ciśnienia turgorowego, po którym następuje wzrost stężenia kwasu abscysynowego (ABA) w cytosolu i w apoplasmie. ABA jest 15-węglowym terpenoidem - seskwiterpenem. Hormon ten produkowany jest przez wszystkie organy roślin: liście, nasiona, owoce i korzenie, a transportowany jest zarówno przez ksylem jak i przez floem, przy czym obficie występuje we floemie. Biosynteza kwasu abscysynowego odbywa się drogą bezpośrednią z kwasu miewalonowego lub pośrednio z karotenoidów. Stężenie wolnego ABA w cytosolu jest też regulowane przez degradację, kompartmentację i transport. Efekty fizjologiczne wywoływane przez ABA wynikają z jego wpływu na przepuszczalność błon komórkowych, a także na zdolność do modyfikacji ekspresji genów. ABA zaliczany jest do grupy inhibitorów wzrostu i rozwoju roślin, gdyż w wielu procesach jest antagonistą auksyn, giberelin i cytokinin. ABA jest również ważnym hormonem stresowym uczestniczącym w adaptacji roślin do zmieniających się warunków środowiskowych. W trakcie dehydratacji tkanek wzrasta poziom ABA w apoplasmie. Odwodnienie indukuje wypływ kwasu abscysynowego z komórek i jego transport z korzeni do części naziemnych. W ostatnich latach prace prowadzone na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* doprowadziły do odkrycia kilku transporterów kwasu abscysynowego, należących do rodziny białek transporterowych ABC, tj. ABCG25, ABCG30, ABCG31 i ABCG40. Oprócz transporterów ABCG, pośród danych literaturowych wskazywane są również inne rodzaje transporterów, które posiadają zdolność transportowania ABA, a są nimi między innymi białka AIT1/NRT1.2, należące do rodziny transporterów azotanowych (NPF), które lokalizowane są w plazmolemie. Badania wskazują, że wypływ i napływ ABA za pośrednictwem transporterów błonowych, jest niezbędny do

kontroli homeostazy ABA w roślinach, a same transportery ABA są przez to kluczowymi składnikami regulacyjnymi w reakcjach roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe.

Przedstawiona mi do oceny praca na temat roli transporterów ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego u *Medicago truncatula* wpisuje się w tą aktualną i ważną tematykę badawczą. Została ona wykonana w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin, w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Michała Jasińskiego prof. ICHB PAN. Praca jest ściśle związana z głównym nurtem badań Zespołu dotyczącym analizy funkcjonalnej transporterów ABC, ale, co szczególnie cenne, wprowadza do nich istotny element nowości, jakim jest szczegółowa charakterystyka plazmolemowego białka ABCG20 w transporcie hormonu stresowego - ABA.

Praca doktorska Aleksandry Paweli składa się z 6 rozdziałów i materiałów uzupełniających (spis literatury i załączniki). Ma układ typowy dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. Praca obejmuje 123 strony, 35 rycin (z czego 9 rycin we wstępie, 23 na których przedstawiono wyniki pracy własnej oraz 4 ryciny z wynikami w załącznikach), 55 tabel (z czego 54 w rozdziale materiały i metody, a jedna z wynikami pracy własnej). W pracy doktorskiej umieszczono także jedną współautorską publikację (Pawela i wsp. 2019, The Plant Journal, 98: 511-523), a także szczegółowe dane o źródłach finansowania badań, spis publikacji powstałych w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz wyróżnienia mgr Aleksandra Paweli w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Pracę przygotowano w języku polskim, załączając anglojęzyczne streszczenie.

Ocena merytoryczna rozprawy jest mi w dużej mierze ułatwiona, z uwagi na fakt, że prezentowane w dysertacji wyniki są w znacznej części opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie (The Plant Journal) o wysokim współczynniku oddziaływań (IF ponad 5.7), gdzie zostały poddane ocenie niezależnych recenzentów.

Wstęp pracy, określony tutaj nietypowo jako „wprowadzenie literaturowe”, podzielony jest na cztery podrozdziały przedstawiające w sposób uporządkowany aktualną wiedzę dotyczącą podjętego tematu. Rozpoczyna się wprowadzeniem czytelnika w tematykę badawczą, następnie przybliżony jest obiekt badawczy - roślina modelowa z rodziny bobowatych - *Medicago truncatula*. Kolejny podrozdział poświęcony jest ABA. Doktorantka w oparciu o najnowszą literaturę omówiła budowę i biosyntezę ABA, wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy kwasu abscysynowego, jego udział w spoczynku i kiełkowaniu nasion oraz w odpowiedzi na stres suszy. Ostatni, najdokładniej opisany podrozdział wstępu dotyczy roślinnych transporterów ABC, ze szczególną uwagą poświęconą białkom ABCG - najliczniejszej grupie transporterów ABC. Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy pisze w nim o udziale transporterów ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego. Wstęp stanowi płynne wprowadzenie do **Celu pracy**, którym było zidentyfikowanie transporterów ABC zaangażowanych w dystrybucję kwasu abscysynowego u *Medicago truncatula*.

Najobszerniejszym (44 strony) w pracy doktorskiej jest rozdział **Materiały i metody**, w którym znalazł się opis warunków uprawy roślin (*Medicago truncatula* i *Arabidopsis thaliana*) oraz hodowli zawiesiny komórek kalusa *Nicotiana tabacum*, prace z bakteriami, tj. przygotowanie kompetentnych komórek bakteryjnych do elektroporacji, transformacja komórek bakteryjnych metodami elektroporacji lub szoku cieplnego, czy opis przechowywania konstrukcji genowych w bakteriach. Ponadto zostały opisane transformację *Medicago* za pomocą *Agrobacterium* oraz transformację i regenerację *Medicago* poprzez somatyczną

embriogenezę. Doktorantka opisała izolację i transformację protoplastów *Arabidopsis thaliana* oraz transformację komórek *Nicotiana* z wykorzystaniem *Agrobacterium*. Ponadto zamieściła opis zróżnicowanych metod użytych w doświadczeniach, obejmujących izolację frakcji błonowych, izolację kwasów nukleinowych, reakcje odwrotnej transkrypcji, analiza ekspresji genów metodą PCR i PCR w czasie rzeczywistym, techniki elektroforetyczne i Western blott. Znajduje się tutaj również opis przygotowania konstrukcji genowych z zastosowaniem różnych metod klonowania. Dalej w rozdziale zostały opisane analiza przestrzenna aktywności promotorów *MtABCG* i analiza lokalizacji subkomórkowej transporterów *MtABCG*, metoda BiFC oraz eksperymenty skupiające się na pomiarach transportu ABA w pęcherzykach błonowych i nasionach *Medicago*. Moim zdaniem wielką zaletą przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej i na szczególne wyróżnienie zasługuje bardzo bogaty, zróżnicowany warsztat metodyczny. Uważam, że zarówno obiekt badawczy jak i nowoczesne metody biologii molekularnej zostały dobrane w sposób właściwy, umożliwiając realizację założeń pracy. Jednak, o ile całościowo dobór metod i ich zastosowanie jest bardzo trafne to pewne wątpliwości budzi we mnie metoda izolacji błon komórkowych. Doktorantka podejmując się tego zadania miała zapewne jasno wytyczone cele - którą z frakcji błonowych chce izolować - w domyśle plazmolemę. W komórkach roślinnych znajduje się więcej niż tuzin różnych błon. Zastosowana metoda wirowania różnicowego opisana na stronie 51 wskazuje, że w wyniku ostatniego wirowania uzyskano mieszaninę mikrosomów składających się z różnych błon, z dużym udziałem zarówno pęcherzyków plazmolemowych jak i tonoplastowych, ale nie tylko. Metoda wirowania różnicowego jest najłatwiejszą metodą izolacji frakcji subkomórkowych ale niestety, nie pozwalającą na uzyskanie frakcji błonowych o wysokim stopniu czystości, co wydaje się tutaj konieczne. Jeśli do dalszych etapów swojej pracy Doktorantka zamierzała użyć pęcherzyków plazmolemowych, to w mojej ocenie powinna zastosować metodę izolacji w układzie dwufazowym np. dekstranT500/PEG3350, która bazuje na wirowaniu różnicowym, a w końcowym etapie izolacji stosuje się układ dwu-fazowy aby precyzyjnie odizolować frakcje plazmolemy od pozostałych mikrosomów. Natomiast do otrzymania pęcherzyków tonoplastowych powinno się po wirowaniu różnicowym, zastosować metodę z użyciem skokowego gradientu np. sacharozy, pozwalającą na uzyskanie frakcji pęcherzyków tonoplastowych o wysokiej czystości. Doktorantka wprowadziła ocenę jakości wyizolowanej błony testem ACMA, ale dotyczył on tylko sprawdzenia integralności błon a nie ich rodzaju i czystości. Czy doktorantka na podstawie wykonanych analiz może z całą pewnością stwierdzić na jakich pęcherzykach pracowała (tonoplastowych czy plazmolemowych) w dalszych etapach, tj np. podczas pomiaru transportu ABA w pęcherzykach błonowych? Tutaj przy okazji pytanie/uwaga czy w trakcie oznaczania transportu znakowanego ABA w pęcherzykach błonowych rzeczywiście użyto ortowanadanu sodu w końcowym stężeniu 200 mM? Na podstawie danych literaturowych wydaje się bowiem, że stężenie to jest około 1000-krotnie zawyżone.

Przechodząc do dalszej części pracy doktorskiej, **Wyniki** opisane zostały na 22 stronach i zilustrowane 23 rycinami oraz 1 tabelą. Merytoryczna zawartość rozdziału poświadcza, że recenzowana rozprawa nie ma charakteru przyczynkarskiego, lecz jest dogłębną analizą poważnego problemu naukowego. Doktorantka na początku tego rozdziału, przedstawiając pierwsze wyniki wyjaśnia dlaczego dalsza praca będzie poświęcona tylko transporterowi

MtABCG20, choć według mnie równie ciekawe do dalszej analizy wydaje się być białko MtABCG26, zresztą pojawia się ono później, przy analizie tworzenia heterodimeru z białkiem MtABCG20. W moim ocenie badania przeprowadzono w logicznie ułożonych etapach, z których każdy rozpoczyna kilka zdań uzasadniających i kończy krótkie podsumowanie, co czyni całość logiczną i spójną. Tutaj mała uwaga odnośnie braku precyzyjności niektórych opisów pod rysunkami, np. opis Ryc 4.14 (str. 93), dotyczącej oznaczenia wpływu ABA z kontrolnych komórek *Nicotiana* i nadekspresją *MtABCG20*. W opisie pod rysunkiem zabrakło wskazania różnic pomiędzy wykresem A i B, tzn. opis wskazuje na wykonanie tych samych warunków doświadczeń, a przedstawione wyniki na wykresach wyraźnie różnią się i nie są kopią tego samego doświadczenia. Z tekstu dowiadujemy się, że wyniki ryciny A przedstawiają dane uzyskane dla temperatury kontrolnej (nie podano jej wartości), a na wykresie B wyniki eksperymentu przeprowadzone w obniżonej temperaturze (18 °C). Brakuje takiego zapisu pod wykresem. Przy okazji opisu wyników tego doświadczenia niefortunnie dobrano słowa „...Analiza HPLC/MS ekstraktów uzyskanych z komórek wykazała, że ilość ABA w komórkach ekspresjonujących *MtABCG20* znacząco zmniejsza się w czasie...”. Znaczy to, że w czasie zmiana będzie postępować, tzn. zmniejszać się lub zwiększać, a na wykresie widać przecież i dalej jest też zapisane (str. 93), że zmiana „utrzymywała się na podobnym poziomie, do końca trwania eksperymentu” a nie ulegała zmianie w czasie. Ponadto wydaje się, że niektóre opisy wyników, są ich dyskusją z danymi literaturowymi i powinny być przeniesione do dalszej sekcji „Dyskusja”. Dotyczy to np. str. 86 (linia 11-16) opis roli kwasu ABA w kiełkowaniu, opis wyników ze strony 95 na temat zależności transportera MtABCG20 od wewnętrznego szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego (linia 3-6, 13-15), czy na stronie 97 (linia 6-13) na temat akumulacji radioaktywnie znakowanego ABA w nasionach *Medicago*. Dalej str. 98 i 99, tu również zapis znacznie przekracza zwykły opis wyników i zdecydowanie klasyfikuje się do kolejnego podrozdziału, co byłoby nawet wskazane. **Dyskusja** bowiem wydaje się być stosunkowo uboga w kontekście obszerności zapisu. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji części doświadczalnej rozprawy doktorskiej zostały lakonicznie (5 stron) lecz rzeczowo omówione w Dyskusji. Na koniec Doktorantka podjęła się próby wyciągnięcia wniosków (w ilości 9-ciu) na podstawie uzyskanych wyników. W mojej ocenie są one zwięzłe i trafne. Do tej części pracy nie wnoszę uwag. Szkoda może tylko, że nie zostały one uwieńczone schematem/ryciną podobną do tej, którą możemy znaleźć w publikacji The Plant Journal z 2019 r. autorstwa Doktorantki i pozostałych współautorów. Po analizie tej części rozprawy (wyniki, dyskusja i wnioski), z uznaniem pragnę podkreślić, że Doktorantka wykazała się biegłą znajomością ogromnej liczby nowoczesnych technik biologii molekularnej, posiada ugruntowaną wiedzę w badanym przez siebie obszarze oraz charakteryzuje się dużą dojrzałością naukową.

Po przeczytaniu pracy doktorskiej i mając na uwadze dokonane już osiągnięcia Doktorantki skłaniam się do zadania pytania. Biorąc pod uwagę, że transportery ABA, to nie tylko ABCG ale też transportery azotanowe, które są niezwykle ważne dla procesu wzrostu roślin, to czy ich ekspresja również może podlegać regulacji przez ABA i jak ma się to do pobierania i asymilacji azotanów, a w konsekwencji wzrostu roślin? Zarówno ABA jak i NO_3^- mogą regulować architekturę korzenia, czy wobec tego istnieje relacja między azotanami i ABA w odpowiedzi na stresy środowiskowe?

Konkluzja

Reasumując, uważam, że rozprawa mgr Aleksandry Paweli ma charakter oryginalnej pracy naukowej i spełnia wszelkie wymogi stawiane dysertacji doktorskiej. Autorka wykazała duże kompetencje merytoryczne i dobrą znajomość literatury dotyczącej opracowywanego tematu, bardzo dobre opanowanie różnorodnych i trudnych metod badawczych. Układ pracy, a zwłaszcza dobór odpowiednich obiektów badawczych i metod oraz sekwencja przeprowadzonych analiz dowodzą, że badania zaplanowano i wykonano z pełną świadomością osiągnięcia założonych celów i rzetelną troską o wiarygodność wyników. Wobec powyższego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Paweli do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplinie nauki biologiczne.

Dr hab. Małgorzata Janicka, prof. UW

Wrocław, 11.12.2019
M. Janicka