



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Interdyscyplinarne Centrum
Nowoczesnych Technologii

dr hab. Agnieszka Zienkiewicz, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

20.06.2020

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Wojciechowskiej pt. „Mechanizmy procesu starzenia liści i korzeni chłonnych topoli kalifornijskiej (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Natalii Wojciechowskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Bagniewskiej-Zadwronej, prof. UAM w Zakładzie Botaniki Ogólnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Starzenie się jest istotnym etapem w cyklu życiowym rośliny, bezpośrednio poprzedzającym śmierć określonej grupy komórek, tkanek, organów lub całych organizmów. Starzenie roślin, jako jeden z typów programowanej śmierci komórkowej (PCD), jest procesem wysoce skoordynowanym obejmującym aktywację ekspresji specyficznych genów kodujących szereg enzymów, zaangażowanych w liczne procesy degradacyjne. Pomimo, iż proces starzenia się organów np. liści jest dość dobrze poznany, wiele aspektów jego regulacji wciąż jest nie do końca jasnych. Głównym celem badań Doktorantki było scharakteryzowanie procesu starzenia zarówno liści jak i korzeni chłonnych *Populus trichocarpa*. Doktorantka podjęła się zadania analizy porównawczej tych organów zarówno na poziomie morfologicznym, anatomicznym jak i molekularnym. Na rozprawę doktorską składają się cztery tematycznie powiązane publikacje, które zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym. Trzy prace doświadczalne ukazały się kolejno w następujących czasopiśmie naukowych: *BMC Plant Biology* w r. 2018 (IF=3.670), *International Journal of Molecular Science* w r. 2020 (IF=4.183) oraz, w tym samym roku, *Tree Physiology* (IF=3.477). Jedna z prac jest pracą przeglądową, która została opublikowana w czasopiśmie *Plant Biology* w r. 2018 (IF=2.159). Łączny współczynnik oddziaływania (impact factor, IF) wymienionych publikacji wynosi 13.489, co z punktu widzenia oceny bibliometrycznej jest bardzo dobrym dorobkiem naukowym. Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach

Doktorantka jest pierwszą autorką. W związku z faktem, iż wszystkie prace są wieloautorskie do rozprawy doktorskiej zostały dołączone oświadczenia współautorów, z których jasno wynika, że Doktorantka miała wiodący udział w przygotowywaniu wyżej wymienionych publikacji. Poza dołączonymi artykułami oraz oświadczeniami współautorów w skład rozprawy doktorskiej wchodziły liczące dwie strony streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, omówienie wyników oraz wnioski przygotowane w języku polskim. Ponadto, Doktorantka umieściła na osobnej stronie krótkie podsumowanie zawierające figurę systematyzującą uzyskane wyniki oraz listę obejmującą 48 pozycji piśmiennictwa.

Omówienie szczegółowe

Jak wspomniano we wprowadzeniu, nadrzędnym celem Doktorantki było „**poszerzenie wiedzy dotyczącej starzenia i zamierania korzeni chłonnych oraz zweryfikowanie hipotezy głównej zakładającej istnienie analogii w przebiegu procesu starzenia liści i korzeni chłonnych poprzez wykształcenie wspólnych mechanizmów**”. Dlatego też Doktorantka zaproponowała cztery, jasno i precyzyjnie sformułowane, zadania badawcze mające w ostateczności zweryfikować założoną hipotezę. Analiza publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jednoznacznie wskazuje, że Doktorantka zrealizowała wszystkie założone cele badawcze, które w konsekwencji doprowadziły do potwierdzenia hipotezy głównej. W tym celu Doktorantka wykorzystała szereg technik badawczych, m.in. techniki molekularne (np. RT-qPCR, analiza ekspresji genów za pomocą mikromacierzy), białkowe (np. immunodetekcja) i mikroskopowe (np. immunofluorescencja).

W pierwszej publikacji, która jest publikacją przeglądową i ukazała się w 2018 r. w *Plant Biology* Doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty i szczegółowy najnowsze dane literaturowe dotyczące regulacji starzenia się różnych organów roślinnych. W publikacji tej zostały zawarte informacje dotyczące regulacji procesu starzenia, zarówno na poziomie morfologicznym, molekularnym jak i biochemicznym. Bardzo dokładnie został przygotowany rozdział dotyczący roli hormonów roślinnych w procesie starzenia, dlatego też dziwi mnie fakt dlaczego Doktorantka pominęła istotną rolę kwasu salicylowego (SA) w omawianym procesie. Na uznanie zasługuje sposób przygotowania schematów umieszczonych w publikacji, a szczególnie schematu drugiego przedstawiającego szczegółowe podsumowanie wydarzeń zachodzących podczas starzenia się liści. Należy zaznaczyć, iż informacje zawarte w publikacji przeglądowej stanowią idealny wstęp do pozostałej części rozprawy doktorskiej.

W drugim artykule, który jest pierwszym artykułem doświadczalnym, opublikowanym w 2018 r. w *BMC Plant Biology* Doktorantka analizowała rolę autofagii w procesie starzenia zarówno korzeni chłonnych jak i liści *Populus trichocarpa*. Autofagia jest procesem konserwatywnym występującym zarówno w komórkach drożdży jak i zwierząt oraz roślin. Autofagia odgrywa istotną rolę w procesie degradacji różnorodnych składników komórki, takich jak kompleksy białkowe czy organelle komórkowe. W ostatnich latach pojawia się co raz więcej nowych informacji na temat roli autofagii w kontroli wzrostu i rozwoju roślin, m.in. starzenia, jednakże nasza wiedza dotycząca tego procesu u roślin jest wciąż fragmentaryczna i wymaga dalszych badań. Doktorantka, wykorzystując różnorodne techniki mikroskopii, zbadała żywotność i ultrastrukturę komórek korzeni chłonnych i liści oraz *in situ* lokalizację białka ATG8 w tych organach. W trakcie badania żywotności komórek Doktorantka jednoznacznie wykazała postępującą śmierć komórek podczas procesu starzenia, jednakże brak zdjęć z pola jasnego (z ang. *bright field*), jak również odpowiednich powiększeń znacznie utrudnia dokładną lokalizację sygnału fluorescencyjnego (Fig. 2 oraz 3). Podobne zastrzeżenia pojawiają się także podczas interpretacji zdjęć z immunofluorescencyjnej detekcji białka ATG8 (Fig. 9 oraz 10). Na uwagę zasługuje za to bardzo dobra jakość analizy ultrastrukturalnej na poziomie mikroskopu elektronowego. Jako że Doktorantka analizowała ekspresję genów *ATG8c*, *d*, *g* i *h*, nasuwa się pytanie ile genów *ATG8* zidentyfikowano w genomie *Populus trichocarpa*? Informacji tej nie zawarto bowiem ani we wstępie ani w dyskusji omawianego artykułu. Ponadto, na jakiej podstawie dokonano selekcji analizowanych genów *ATG*? Na Figurze 9A brakuje kontroli reakcji Western Blot w postaci analizy poziomu białka referencyjnego (np. aktyny czy też ubikwityny) lub chociażby wybarwionego żelu poliakrylamidowego przedstawiającego ilość nakładanych białek w każdej ścieżce.

W kolejnej publikacji, która ukazała się w 2020 r. w *International Journal of Molecular Science* Doktorantka sprawdzała rolę hormonów roślinnych w procesie starzenia *Populus trichocarpa*. W ostatnich latach, w badaniach prowadzonych głównie z wykorzystaniem modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*, wykazano iż hormony roślinne odgrywają istotną rolę w regulacji procesu starzenia się liści. Podobnie jak w poprzednich publikacjach doktorantka podjęła się porównania mechanizmów regulujących proces starzenia w dwóch różnych organach, a mianowicie korzeniach chłonnych i liściach. Wykonana przez Doktorantkę analiza mikromacierzy wykazała istotne zmiany w ekspresji licznych genów, w tym między innymi genów związanych z metabolizmem wielu hormonów roślinnych podczas starzenia obu badanych organów. Istotny wzrost poziomu ekspresji genów związanych ze szlakiem syntezy i metabolizmu kwasu abscysynowego (ABA) oraz kwasu salicylowego (SA) można zaobserwować szczególnie w liściach (Fig. 3), dlatego zastanawiam się dlaczego Doktorantka nie uwzględniła SA w dalszych analizach. Wziąwszy pod

uwagę, że jest to jeden z kluczowych hormonów regulujących ekspresję wielu genów (np. *SAG* ang. *SENESCENCE ASSOCIATED GENE*) zaangażowanych w aktywację procesu starzenia liści oraz istnienie sieci wzajemnych oddziaływań pomiędzy SA oraz JA, uwzględnienie SA w badaniach z pewnością pozwoliło by na uzyskanie bardziej kompleksowego spojrzenia na omawiany proces. Dodatkowo, jak wynika z Figury 3A nie wykazano znaczącej zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w szlaki związane z działaniem SA w korzeniach chłonnych, dlatego też analiza poziomu tego hormonu przyczyniła by się do uzyskania nowych informacji nie tylko o podobieństwach ale również różnicach w regulacji starzenia korzeni chłonnych i liści. Pomimo obserwowanego wzrostu poziomu JA oraz estru metylowego JA (Me-JA) podczas starzenia obu analizowanych organów odnotowano spadek poziomu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę JA. Co więcej, geny wymienione na Figurze 4D w części „JA biosynthetic pathway” kodują białka nie związane bezpośrednio z biosyntezą JA w liściach. Jak wiadomo z literatury geny kodujące enzymy zaangażowane w biosyntezę JA takie jak lipoksygenaza (LOX) czy też cyklaza tlenku allenowego (AOC), ulegają wysokiej ekspresji podczas procesu starzenia liści np. *Arabidopsis thaliana*. Nasuwa się więc pytanie dlaczego geny te nie znalazły się w grupie genów regulujących syntezę JA u *Populus trichocarpa*? Czy oznacza to że ekspresja tych genów nie uległa zmianie pomimo wzrostu poziomu JA w badanych organach? Nie wykazano również istotnych zmian w poziomie transkryptów wielu genów aktywowanych podczas starzenia liści, takich jak *SAG12*, *SAG29*, *SAG113* czy też *SEN4*, których ekspresja jest regulowana między innymi przez JA. Jak wiadomo aktywną biologicznie formą JA jest jego koniugat z aminokwasem izoleucyną (JA-Ile). Rozpoznanie JA-Ile w komórce przez kompleks białkowy COI1-JAZ prowadzi do degradacji białkowych represorów JAZ, co w konsekwencji umożliwia transkrypcję wielu genów, w tym także genu *SAG29* biorącego udział w aktywacji procesu starzenia liści. W związku z tym logiczne wydawało by się wykonanie analizy poziomu nie tylko JA oraz Me-JA, ale również JA-Ile.

W ostatniej pracy doświadczalnej, opublikowanej w 2020 r. w *Tree Physiology* Doktorantka badała proces remobilizacji makroelementów podczas starzenia się korzeni chłonnych jak i liści *Populus trichocarpa*. W tym celu Doktorantka nie tylko określała zawartość azotu i węgla w tych organach ale także wykonała kompleksową analizę ekspresji genów związanych z metabolizmem obu tych makroelementów. Ponadto, Doktorantka zwróciła szczególną uwagę na rolę syntetazy glutaminianowej (GS) w remobilizacji azotu w starzejących się korzeniach chłonnych i liściach *Populus trichocarpa*. O ile forma i prezentacja wyników jest satysfakcjonująca, o tyle we wstępie zabrakło krótkiej informacji na temat genów GS kodowanych przez genom *Populus trichocarpa*. Informacja ta pozwoliłaby czytelnikowi płynnie przejść do rozdziału wyników. Podobnie jak w

pierwszej publikacji doświadczalnej, Doktorantka nie zamieściła kontroli reakcji Western Blot (Figura 2C i D). Na szczególną uwagę zasługuje za to fakt, iż jest to jedna z nielicznych prac analizujących remobilizację węgla i azotu w różnych aspektach w korzeniach chłonnych *Populus trichocarpa*, co dodatkowo zwiększa wartość naukową prezentowanych badań.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Wojciechowskiej ma istotne znaczenie dla poszerzenia naszej wiedzy dotyczącej procesu starzenia w różnych organach *Populus trichocarpa*. Różnorodne techniki badawcze zastosowane przez Doktorantkę pozwoliły na uzyskanie nowych informacji na temat roli autofagii, hormonów roślinnych oraz remobilizacji makroelementów w procesie starzenia. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż w swoich badaniach Doktorantka bardzo celnie wykorzystała techniki badawcze, które zrekompensowały w tym wypadku brak roślin transgenicznych *Populus trichocarpa*. W odróżnieniu od *Arabidopsis thaliana*, jest to niełatwy model eksperymentalny, w przypadku którego uzyskanie roślin z nadekspresją określonych genów (np. *ATG8*) jest z reguły bardzo praco- i czasochłonne. Niniejsza rozprawa doktorska dobitnie wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki, potwierdzoną umiejętnością sprawnego generowania i przedstawienia wyników oraz ich interpretacji, co zaowocowało czterema publikacjami w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka uczestniczyła w realizacji grantów badawczych, w tym była kierownikiem grantu Preludium NCN. Z dostępnych mi źródeł (*Pubmed*) wynika, iż Doktorantka jest także współautorką co najmniej pięciu innych prac w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, co dodatkowo potwierdza jej bardzo dobre przygotowanie naukowe i merytoryczne.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, w związku z czym wnoszę do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie Pani mgr. Natalii Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę jakość, oryginalność i wartość tych badań dla społeczności naukowej pracującej na *Populus trichocarpa*, z całym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.


Agnieszka Zienkiewicz