Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; Tel.: +48 22 / 592 21 45; Fax: +48 22 / 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; http://www.ibb.waw.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Czołpińskiej pod tytułem „Reakcja kalafiora (Brassica oleracea var. botrytis) na stres termiczny. Wielopoziomowa charakterystyka ze szczególnym uwzględnieniem białek bogatych w glicynę wiążących RNA (GRPs)"

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Czołpińskiej poświęcona jest odpowiedzi kalafiora (*Brassica oleracea var. Botrytis* odmiany 'Oviedo') na stres termiczny. Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania – zbadania odpowiedzi rośliny na wysoką, jak również na niską temperaturę na kilku poziomach: fizjologicznym, transkryptomicznym, proteomicznym oraz metabolomicznym. Materiałem badawczym były liście siewek kalafiora poddanych działaniu stresu, jak również siewek, które po stresie zostały z powrotem przeniesione do temperatury optymalnej (rośliny de-aklimatyzowane). Część badań wykonana została nie tylko na liściach ale również na zawiązkach kwiatostanów kalafiora.
Wiedza na temat odpowiedzi roślin na stres termiczny, ich aklimatyzacji i de-aklimatyzacji, jest uboga, nawet dla roślin modelowych takich jak *Arabidopsis thaliana* czy *Oryza sativa*. W przypadku roślin uprawnych na ten temat wiadomo jeszcze mniej. Analiza mechanizmów aklimatyzacji roślin do wysokiej i niskiej temperatury wpisuje się w bardzo ważny kierunek badań biologii roślin i biotechnologii. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki mają istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie aplikacyjne. W przyszłości mogą być pomoce w opracowaniu nowych procedur do ochrony roślin użytkowych przed skutkami stresu termicznego oraz do uzyskania roślin uprawnych o zwiększonej tolerancji na drastyczne zmiany temperatury.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa ma klasyczny układ rozpraw doktorskich, liczy 162 strony i jest napisana w języku polskim. Rozprawa zawiera: Streszczenie napisane zarówno w języku polskim jak i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wyników i opis dalszych planów badawczych oraz Piśmiennictwo. Dodatkowo na początku rozprawy zamieszczono Wykaz skrótów, a na końcu Wykaz rycin i Tabel. Do rozprawy dołączono kopie trzech publikacji (jednej pracy przeglądowej i dwóch eksperymentalnych), których współautorką jest Pani mgr Magdalena Czołpińska.

Ocena poszczególnych części rozprawy

Wstęp zawiera podstawowe informacje dotyczące znaczenia kalafiora dla gospodarki oraz opracowane dane na temat odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. Jeden rozdział poświęcono bardzo ciekawemu zjawisku jakim jest „pamięć" stresu u roślin, pozwalająca roślinie na szybkie uruchomienie reakcji obronnych na pojawiający się wielokrotnie sygnał stresu. Najwięcej uwagi Doktorantka poświęciła odpowiedzi roślin na stres termiczny - stres niskiej i wysokiej temperatury,

co jest w pełni zrozumiałe biorąc pod uwagę tematykę rozprawy doktorskiej. Ponadto we Wstępie Doktorantka zawarła wprowadzenie do rodziny białek GRP (z ang. glycine rich proteins); przedstawiła ich klasyfikację i opisała rolę niektórych z nich.
Niestety wstęp rozprawy trochę mnie rozczarował. Nie znalazłam w nim zebranych i omówionych najnowszych danych na temat mechanizmów obrony roślin przed stresem termicznym ani opisu szlaków indukowanych pod wpływem badanych stresów, które warunkują reakcje obronne rośliny. Doktorantka podaje odnośniki literaturowe, ale ich nie omawia. Krótkie ich omówienie byłoby to bardzo pomocne do analizy uzyskanych przez doktorantkę wyników. Zamieszczono we wstępie rozdział 1.2. „Aklimatyzacja i de-aklimatyzacja do stresu temperaturowego u roślin" ale czytający pracę aby dowiedzieć się na temat molekularnych podstaw tych zjawisk musi przeczytać cytowane artykuły.
Pani mgr Magdalena Czołpińska zamieściła schematy przedstawiające „Molekularne mechanizmy zaangażowane w odpowiedź i tolerancję roślin na stres chłodu" (Rycina 1), „Schemat przedstawiający model odczuwania wysokiej temperatury przez rośliny" (Rycina 3) oraz mechanizm „pamięci" stresu ciepła (Rycina 4) . Ryciny te nie są na tyle jasne, aby nie wymagały omówienia w tekście pracy. Pod rycinami zostały zamieszczone jedynie ich tytuły, nie zostały nawet wyjaśnione stosowane na schematach skróty.

Bardzo proszę o skrótowe omówienie molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na stresy temperatury w trakcie publicznej obrony. Jeżeli to będzie możliwe to proszę o uwzględnienie na prezentacji wybranych swoich wyników.

Ostatni rozdział wstępu (1.5.) ma tytuł „Udział białek z rodziny GRP w odpowiedzi roślin na stres temperaturowy". Autorka rozprawy przedstawiła klasyfikację białek GRP, natomiast prawie nic nie napisała na temat ich udziału w odpowiedzi na stres, podobnie jak w poprzednich rozdziałach jest tutaj dużo odnośników literaturowych, ale opisu praktycznie nie ma. Udział GRP w odpowiedzi na stres temperaturowy opisany jest dopiero w Dyskusji. Jeden podrozdział Wstępu został poświęcony białkom GRP zawierającym motyw RRM odpowiedzialny za wiązanie RNA. Dlaczego omawiając we wstępie białka GRP klasy IV opisano ich potencjalny udział w redagowaniu RNA, choć dotychczas nic na ten temat nie wiadomo, natomiast nie wspomniano o udziale niektórych białek tej grupy w splicingu lub biogenezie miRNA. Ten temat jest szerzej omówiony dopiero w Dyskusji.

Cele pracy zostały jasno określone.
Badania wykonane w trakcie realizacji pracy doktorskiej miały na celu poszerzenie wiedzy na temat odpowiedzi kalafiora na stres wysokiej i niskiej temperatury (aklimatyzacji i de-aklimatyzacji) na poziomie tanskryptomicznym, proteomicznym i metabolomicznym oraz określenie roli wybranych białek GRP w odpowiedzi roślin kalafiora na stres temperaturowy.

Materiały i Metody zostały szczegółowo opisane pozwalając czytającemu, o ile posiada odpowiednia aparaturę i doświadczenie, na powtórzenie opisanych eksperymentów.

Bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Magdaleny Człopińskiej, szczególnie umiejętność wykorzystania wysokoprzepustowych technik badawczych: transkryptomiki, proteomiki i metabolomiki do realizacji zaplanowanych badań.

Wyniki stanowią najobszerniejszą część pracy. Badania odpowiedzi na stres temperaturowy prowadzono wykorzystując dwa układy doświadczalne: liście 30-dniowych siewek lub zawiązki kwiatostanów 3-miesięcznych roślin. Badano rośliny
(-) poddane działaniu wysokiej temperatury (42°C, 4 godziny),
(--) rośliny po stresie ciepła przeniesione na 48 godzin z powrotem do temperatury optymalnej dla wzrostu (22°C) (de-aklimatyzacja po stresie ciepła),
(---) rośliny przeniesione do niskiej temperatury (8°C) na 10 dni,
(----) rośliny poddane stresowi chłodu, a następnie przeniesione do 22°C na 48 godzin (de-aklimatyzacja po stresie chłodu)
oraz rośliny kontrolne rosnące w optymalnych warunkach.
W pierwszej części wyników zostały opisane rezultaty analiz fizjologicznych liści ww. roślin: wyciek elektrolitów, zawartość chlorofilu, flawonoidów, oraz parametry związane z fotosyntezą.
Dalsza cześć badań koncentrowała się na analizach porównawczych przy wykorzystaniu wysokoprzepustowych technik badawczych: analizie transkryptomicznej, proteomicznej i metabolomicznej.
Do porównawczej analizy transkryptomicznej (głębokie sekwencjonowanie RNA) zostały wybrane liście 30-dniowych siewek kalafiora rosnących w warunkach kontrolnych, poddanych działaniu wysokiej temperatury (42°C, 4 godziny) oraz liście siewek, które po stresie cieplnym przeniesiono na 48 godziny do warunków kontrolnych. Należy zaznaczyć, że nie znana jest jeszcze pełna sekwencja genomu jądrowego kalafiora, co było istotnym utrudnieniem w tych analizach. Anotację funkcjonalną przypisano do 95% unigenów ze znalezionymi ramkami odczytu i wykonano analizę Gene Ontology. Analiza różnicowej ekspresji genów wykazała specyficzne zmiany transkrypcji w przypadku licznych genów pod wpływem stresu ciepła, jak również po usunięciu stresu. W odpowiedzi na stres ciepła Doktorantka zaobserwowała zdecydowanie zwiększoną ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne, białka biorące udział w transdukcji sygnału, białka związane z transportem wewnątrzkomórkowym i białka opiekuńcze. Istotnym zmianom jak się można było spodziewać ulegała również ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm rośliny. Po powrocie do warunków kontrolnych widać wyraźne zmiany ekspresji szeregu genów, których produkty są konieczne do wzrostu i rozwoju rośliny. Doktorantka zwróciła szczególną uwagę na geny kodujące różne białka bogate w glicynę; dziewięć z nich wykazywało obniżoną ekspresję w odpowiedzi na stres ciepła, a dwa wręcz przeciwnie, ich ekspresja wzrastała w odpowiedzi na wysoką temperaturę. Ponadto analiza sekwencji sugerowała, że produkty wielu z nich mogą mieć lokalizację mitochondrialną. Za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym Pani Magdalena Czołpińska zbadała zmiany ekspresji wybranych genów *GRP* w liściach i zawiązkach kwiatostanów, w odpowiedzi na stres ciepła, zimna oraz po przeniesieniu roślin do warunków

kontrolnych. Analizowała również lokalizację subkomórkową jednego z białek GRP kalafiora (BoGRP2-like), które potencjalnie może mieć lokalizację mitochondrialną oraz może wiązać RNA (posiada motyw ORRM, z ang. organellar RNA recognition motif).
Do porównawczej analizy proteomicznej wykorzystany został taki sam materiał, jaki został użyty do analizy transktyptomicznej. Zastosowano technikę LC-MS/MS bez wprowadzania znacznika izotopowego (non-label LC-MS/MS). Badano zarówno proteom liści jak i zawiązków kwiatowych roślin rosnących w warunkach kontrolnych, poddanych działaniu stresu termicznego (ciepła albo zimna) oraz roślin de-klimatyzowanych. Doktorantka zidentyfikowała szereg białek, których poziom był uwarunkowany zmianami temperatury. W analizach proteomicznych oprócz wielu innych białek, których poziom był zmieniony, były także białka GRP.
Ostatnim elementem badań była analiza metabolomiczna liści, siewek oraz zawiązków kwiatostanów traktowanych tak jak opisano powyżej.

Mam kilka uwag dotyczących tej części rozprawy:
Mam problem ze śledzeniem opisów wyników analiz parametrów fizjologicznych badanych roślin. Na rycinie 8 i 9 przedstawione są wyniki zawartości chlorofilu i flawonoidów kolejno w trzech liściach kalafiora (liść 1, liść 2 i liść 3) w odpowiedzi na stres zimna oraz w fazie de-aklimatyzacji (Ryc. 8) oraz analogicznie dla stresu ciepła (Ryc. 9). Natomiast w opisie wyników trzy liście nie występują, choć wyniki dla różnych liści są często drastycznie różne.
Patrząc na Rycinę 8 widać znaczący spadek poziomu chlorofilu pod wpływem chłodu w liściu 2, natomiast ta tendencja nie była widoczna w pozostałych liściach. Niestety tego zjawiska zupełnie nie opisano. W tekście jest napisane jedynie: „Podczas aklimatyzacji do stresu chłodu w liściach kalafiora względny poziom chlorofilu nie ulegał zmianom (Rycina 8)." Zapewne jest to prawdą, lecz w opisie powinny być zawarte wszystkie wyniki.
Natomiast w przypadku stresu wysokiej temperatury na rycinie 9 widoczny jest znaczący spadek chlorofilu w liściu 1 i niewielki w liściu 2 i to dopiero po przeniesieniu roślin po stresie do temperatury optymalnej. Natomiast w liściu 3 zupełnie nie widać spadku, wręcz przeciwnie. W opisie tego wyniku napisano: „Jednakże aklimatyzacja do stresu ciepła pociągnęła za sobą występowanie znacznie poważniejszych zmian fizjologicznych, gdyż poziom chlorofilu w liściach kalafiora ulegał wyraźnemu obniżeniu (Rycina 9). Dziwi mnie dlaczego nie opisano dokładnie tych doświadczeń. Być może różna odpowiedź różnych liści sprawiła, że opis zmian poziomu chorofilu bardzo się różni w różnych częściach rozprawy.
Na stronie 118 Dyskusji jest napisane: „jednakże jeśli chodzi o zawartość chlorofilu nie była- co ciekawe- obniżona po aklimatyzacji do stresu ciepła." Dwa zdania dalej „Stres chłodu, podobnie jak stres ciepła, przyczynił się do spadku względnej zawartości chlorofilu w liściach kalafiora." „W liściach kalafiora, podobnie jak w przypadku stresu ciepła, nie zauważono istotnej zmiany w zawartości chlorofilu, jednakże już de-aklimatyzacja po stresie chłodu przyniosła spadek zawartości chlorofilu w porównaniu z samą fazą aklimatyzacji." Na następnej stronie „W liściach kalafiora podczas odpowiedzi

na stres chłodu poziom chlorofilu również spadał, co było szczególnie widoczne u młodych liści."

Natomiast w podsumowaniu (punkt 2) jest napisane: „W warunkach stresu chłodu względny poziom chlorofilu w liściach kalafiora nie ulega zmianie. Natomiast podczas aklimatyzacji do stresu ciepła zaobserwowano spadek poziomu chlorofilu, co świadczyło o uszkodzeniu chloroplastów. Spadek ten obserwowano również po de-aklimatyzacji, co świadczy o nieodwracalnych zmianach w funkcjonowaniu chloroplastów.

Podobnie opisując wyniki analiz parametrów związanych z fotosyntezą Pani mgr Magdalena Człopińska stwierdza, że parametr NPQ związany z niefotochemicznym wygaszaniem fluorescencji pozostawał niezmieniony we wszystkich wariantach doświadczalnych. Natomiast na Rycinie 10 w liściu 1 poziom NPQ wyraźnie wzrasta pod wpływem zimna.
Dlaczego w takim razie badano poszczególne liście?

Rycina 26. Zabrakło mi dokładnego opisu figury. Czy dobrze rozumiem, że mapa przedstawia wyniki z 3 niezależnych prób biologicznych dla każdego wariantu? Jak można wytłumaczyć tak duże różnice pomiędzy powtórzeniami?

Na stronie 99 jest napisane: „Aklimatyzacja do stresu ciepła powodowała również wzrost akumulacji jednego z białek GRP-GRP2A." Natomiast na Rycinach 35 i 37 widać obniżenie jego poziomu, co jest skomentowane na stronie 101 rozprawy: „Analiza porównawcza proteomu liści kalafiora pozwoliła również na identyfikację niektórych białek bogatych w glicynę, np. białka GRP2A, którego poziom był podwyższony w stresie chłodu, natomiast w stresie wysokiej temperatury poziom ten był niższy w porównaniu z warunkami kontrolnymi. (Rycina 37)."
Na rycinie 23 jest widoczne, że w liściach poddanych de-aklimatyzaji po stresie ciepła transkrypt *GRP2A* wyraźnie spada, natomiast na Rycinie 41 wzrasta. Jak wytłumaczyć tę rozbieżność?

W pracy używane jest sformułowanie „aklimatyzacja" i „de-aklimatyzacja" do stresu wysokiej lub niskiej temperatury. Mam wątpliwości czy słowo „aklimatyzacja" w przypadku gdy rośliny są przenoszone były do 42°C na 4 godziny jest uprawnione. Czy jest to badanie procesu aklimatyzacji, czy po prostu odpowiedzi rośliny na stres wysokiej temperatury? Według opisu wyników w rozdziale 5.1 dłuższy stres powodował nieodwracalne zmiany w roślinach.

Dlaczego do porównawczej analizy proteomów wybrano metodę bez znakowania. Czy mogłaby Pani podczas publicznej obrony bardzo krótko przedstawić zalety i wady obu metod.

W **Dyskusji** Pani mgr Magdalena Czołpińska szeroko omówiła uzyskane wyniki na tle danych opublikowanych dla innych roślin poddanych działaniu stresu termicznego (podwyższonej temperatury albo zimna). Dyskusja świadczy o wiedzy Doktorantki i dobrej znajomości literatury naukowej.
Mam jedną uwagę do tej części rozprawy. We wstępie została przedstawiona klasyfikacja białek GRP natomiast przy omawianiu wyników i ich dyskusji nie zaznaczono do jakiej grupy należą te, dla których ekspresja kodujących je genów bądź poziom białka ulegał istotnym zmianom pod wpływem stresu. Tylko w przypadku BoGRP2-like zaznaczono, że białko to ma motyw wiążący RNA, więc prawdopodobnie należy do grupy IV.

Moja końcowa uwaga, jednym z głównych celów prowadzonych badań było określenie roli wybranych białek GRP w odpowiedzi roślin kalafiora na stres temperaturowy.
Czy ten cel został zrealizowany? Nie uważam, że w ramach pracy doktorskiej zrobiono zbyt mało, wręcz przeciwnie. Jedynie sądzę, że postawione cele powinny odzwierciedlać wykonane zadania. Jeżeli realizacja pewnych zamierzeń się nie powidła to warto to też opisać.

Drobne błędy edytorskie:
Na stronie 42 w podrozdziale 4.1.2 napisano, że „Siewki te zostały poddane działaniu stresu temperaturowego (aklimatyzacja do stresu ciepła lub chłodu) zgodnie z procedurą zastosowaną w rozdziale 4.1.2." zamiast w rozdziale 4.1.2. powinno być 4.1.1.

W opisie wszystkich rycin, na których zaznaczono istotność statystyczną wyników pojawił się błąd. W legendzie każdej z tych rycin jest zdanie „Takie same litery przy słupkach odchyleń standardowych oznaczają istotne statystycznie zmiany w porównywanych względem siebie wariantach." Powinno być odwrotnie „Takie same litery przy słupkach odchyleń standardowych oznaczają brak istotnych statystycznie różnic w porównywanych względem siebie wariantach."

Nie rozumiem dlaczego pierwszy rozdział Wyników zatytułowano „Dobór warunków stresowych w pracach badawczych" skoro warunki zostały jak pisze Pani mgr Magdalena Człopińska ustalone na podstawie wcześniej prowadzonych badań.

W opisie wyników analizy porównawczej ekspresji genów rażą mnie niektóre zwroty/sformułowania takie jak np. „wycena akumulacji transkryptów".

Podsumowując
Rozprawa doktorska stanowi istotne rozszerzenie wiedzy na temat odpowiedzi na stresy termiczne ważnej rośliny uprawnej jaką jest kalafior. Doktorantka jest autorem korespondencyjnym pracy przeglądowej na temat białek GRP opublikowanej w Frontiers of Plant Science oraz współautorką dwóch prac eksperymentalnych opublikowanych w International Journal of Molecular Sciences.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Czołpińskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. Poz. 882) i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani Magdaleny Czołpińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Grażyna Dobrowolska