UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii
INSTYTUT Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Zakład Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali u Roślin
prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz
d.antosiewicz@uw.edu.pl
tel: 22-5542105

Warszawa, 28.12.2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Wiktorii Koniecznej**
pt: **„Rola metalotionein owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe"**

praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Grażyny Dąbrowskiej i dr Agnieszki Mierek-Adamskiej

w Katedrze Genetyki Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

1. Znaczenie podjętego tematu

Pomimo prowadzonych od dekad badań nad poznaniem mechanizmów umożliwiających wzrost i rozwój roślin w zmieniających się warunkach środowiska, nagromadzona wiedza nie jest wystarczająca dla ich zrozumienia. Pani mgr Wiktoria Konieczna w swojej pracy doktorskiej prowadziła badania nad rolą metalotionein w regulacji odpowiedzi owsa (*Avena sativa* L.) na stresy abiotyczne i biotyczne. Metalotioneiny (MT) to białka o ogromnym znaczeniu w regulacji tych procesów, wynikającym z uniwersalności ich działania w komórkach (m.in. własności antyoksydacyjne oraz zdolność do kompleksowania jonów metali). Celem badań była identyfikacja genów metalotionein owsa i poznanie ich udziału w odpowiedzi rośliny na stresy abiotyczne (osmotyczny, suszy, ekspozycja na nadmiar cynku i kadmu) i biotyczny (obecność grzybów z rodzaju *Trichoderma*). Przedstawione wyniki badań mają bardzo duże znaczenie dla rozwoju podstawowej wiedzy, a także wskazują na możliwości ich zastosowania dla celów praktycznych.

2. Strona formalna

Praca doktorska stanowi zbiór czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2023-2024. Te bardzo dobre prace ukazały się w czasopismach o wysokiej wartości Impact Factor (IF) w zakresie 4.0-6.0 (w okresie 5-letnim), liczba punktów MNiSW 100 (dwa czasopisma) i 140 (dwa czasopisma). Kopie tych prac spięto w formie książki, w której zamieszczono dodatkowo Stronę tytułową, Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, Wstęp (liczący 11 stron), Cel pracy, Wyniki i dyskusja (17 stron), Podsumowanie (2 strony), Spis literatury (242 pozycje), Wykaz dorobku naukowego niebędącego podstawą rozprawy doktorskiej oraz Wykaz innych osiągnięć naukowych. Rozdziały stanowiące uzupełnienie informacji zawartych w kopiach publikacji zostały napisane poprawnym językiem, bez stosowania żargonu laboratoryjnego.

Doktorantka otrzymała na realizację badań trzy Minigranty AST w latach 2021-2023, dwa Granty 4NCU Students I i VI edycja, grant wyjazdowy (staż) oraz grant na pokrycie kosztów publikacji. Była także wykonawcą w trzech grantach. Swoje wyniki prezentowała na siedniu konferencjach naukowych. Odbyła dwa staże naukowe. Jest współautorem dwóch publikacji nie wchodzących w skład pracy doktorskiej.

3. Charakterystyka pracy i uzyskanych wyników

3.1 Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki

WSTĘP dołączony do kopii publikacji to bardzo wartościowy merytorycznie rozdział, który znakomicie porządkuje wiedzę teoretyczną będącą tłem prowadzonych badań (zatem także punktem wyjścia podjętej pracy naukowej). Stanowi oparte o literaturę zbiorcze przedstawienie całości problematyki rozprawy, niezbędne dla uzasadnienia podejmowanych wielu różnorodnych ścieżek eksperymentalnych.

W trzech podrozdziałach kolejno przedstawiono procesy indukowane u roślin w odpowiedzi na stresy abiotyczne, opisano budowę i funkcję metalotionein, uzasadniono wybór owsa jako obiektu badań. Dobrym wyborem struktury opisu mechanizmów odpowiedzi na stresy było rozdzielenie informacji: (i) na czynniki uniwersalne w tym procesy sygnałowe (oparte o jony Ca^{2+}, tlenek azotu - NO, czy reaktywne formy tlenu -RFT), regulacja osmolarności, udział hormonów roślinnych; (ii) na specyfikę odpowiedzi na stres suszy i na stres generowany obecnością metali w środowisku. Zabrakło w tym opisie odniesienia do planowanych eksperymentów z zastosowaniem stresu biotycznego, przedstawionych w rozdziale CEL BADAŃ (zagadnienie to poruszone jest tylko we WSTĘPIE publikacji 4). W poprawny merytorycznie, dobrze zaplanowany sposób przedstawiono uniwersalność udziału metalotionein (MT) w odpowiedzi na badane stresy i uzasadniono ich wybór do badań. Wskazano na powiązanie pomiędzy budową tych białek, a pełnioną funkcją w roślinie podczas rozwoju i w odpowiedzi na zmieniające się czynniki środowiska (w tym utrzymanie homeostazy metali, detoksykacja jonów metali, neutralizacja RFT). Podkreślono zróżnicowanie funkcji MT zależne od składu aminokwasowego i specyficznie w różnych częściach roślin i gatunkach. Nie ma także wątpliwości, iż wybór owsa zwyczajnego jako materiału badawczego był w pełni zasadny. Poznanie roli uniwersalnych białek MT w odpowiedzi na stresy środowiskowe w tym gatunku uprawnym ważnym w żywieniu jest konieczne dla zwiększania plonowania w obliczu nadchodzących zmian klimatycznych.

Dla porównania, dane literaturowe podawane we WSTĘPIE do każdej publikacji, są starannie wybrane pod kątem specyfiki opisywanych eksperymentów i dostarczają szczegółowej wiedzy, kluczowej dla zrozumienia sensu otrzymanych wyników.

Podsumowując moje uwagi zamieszczone powyżej, oceniam bardzo wysoko ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Wiktorii Koniecznej. Na podkreślenie zasługuje zarówno przyjęta struktura przedstawienia zagadnień w pracy doktorskiej, jak też umiejętność wyboru kluczowych informacji spośród wielu dostępnych. Oceniana rozprawa spełnia to kryterium.

3.2 Ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę

Pani mgr Wiktoria Konieczna jest pierwszym autorem dwóch publikacji wchodzących w zakres pracy doktorskiej (nr 3, 4), w publikacji nr 1 i nr 2 jest na pierwszej pozycji z równorzędnym z drugim autorem wkładem w badania. Po przeczytaniu rozdziałów wprowadzających (Wstęp, Cel, Wyniki i dyskusja) oraz kopii publikacji widać, iż na całokształt wykonanej pracy naukowej składa się szereg logicznie ze sobą powiązanych doświadczeń, których celem jest dostarczenie odpowiedzi na generowane kolejno pytania/hipotezy. Inaczej mówiąc, praca badawcza oparta jest o model hipoteza – weryfikacja – hipoteza – weryfikacja itd. Uważam, że postępowanie według takiego schematu jest kluczowe dla rozwoju wiedzy w każdej dziedzinie, gdyż oparte jest o umiejętność oceny stanu aktualnego i jego krytycznej oceny umożliwiającej identyfikację zależności o niepoznanej do tej pory naturze. Warunek ten spełniają badania zaplanowane w kolejnych etapach i przeprowadzone przez Doktorantkę. Wskazuje to na dojrzałość naukową, dociekliwość i umiejętność samodzielnego myślenia młodego pracownika naukowego.

Punktem wyjścia było oparte o literaturę założenie, że u owsa, gatunku odpornego na wiele stresów abiotycznych, MT powinny być ważnym elementem regulacyjnym stojącym za takim fenotypem. Po zidentyfikowaniu po raz pierwszy u owsa wszystkich genów kodujących MT, poznaniu ich sekwencji nukleotydowej oraz sekwencji promotorów, wskazano na obecność *cis*-elementów promotorowych ważnych dla reakcji rośliny na stres suszy, stres osmotyczny, obecność

metali a także na fitohormowy jak np. kwas abscysynowy (ABA). Ten wynik stanowił podstawę do podjęcia kolejnych badań weryfikujących sugerowany udział MT w regulacji odpowiedzi owsa na wskazane czynniki. Zgodnie z tym, dalsze badania zostały poprowadzone wielokierunkowo.

Dodatkowo, obecność w promotorach genów *MT* elementów odpowiedzi na stres biotyczny (np. grzybów) stanowiła podstawę dla podjęcia uzupełniających prac nad udziałem tych białek w oddziaływaniu grzyba mykoryzowego *Trichoderma viride* z owsem. Wiedząc z literatury, że obecność *T. viride* może modyfikować pobieranie i tolerancję na Cd, badania powiązano z analizą roli MT specyficznie w odpowiedzi na ten metal balastowy.

Na duże uznanie zasługuje nie tylko szeroki zakres ścieżek eksperymentalnych, ale też wybór przez Doktorantkę odpowiedniego podejścia metodologicznego oraz umiejętność interpretacji wyników. W efekcie w pracy zastosowano bardzo wiele różnorodnych metod molekularnych i fizjologicznych, w tym analizy *in silico* genomu, struktury białek czy sekwencji promotorowych, klonowanie, ekspresja heterologiczna genów *MT* w *Escherichia* coli, analizy ekspresji w czasie rzeczywistym genów *MT* w owsie, ICP-MS dla określania stężenia metali, liczne metody biochemiczne (w tym ocena poziomu barwników fotosyntetycznych, cukrów, fenoli, antyoksydantów, aktywności enzymów antyoksydacyjnych, względnej zawartości wody w tkankach) i inne. Zakres posługiwania się tak zróżnicowaną metodologią uważam za imponujący, wskazujący na dojrzałość naukową młodej Badaczki, bardzo cenny dla uformowania się jej samodzielności naukowej.

Wobec powyższego, oceniam bardzo wysoko umiejętność prowadzenia samodzielnego badań przez mgr Wiktorię Konieczną, doceniam przyjęty schemat, metodologię i planowanie kolejnych etapów w oparciu o otrzymane wyniki. Na podkreślenie zasługuje zarówno przyjęta struktura przedstawienia zagadnień w pracy doktorskiej, jak też umiejętność wyboru kluczowych informacji spośród wielu dostępnych. Uważam, że w tym zakresie praca spełnia z nadmiarem wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

3.3 Ocena stopnia oryginalności rozwiązania problemu naukowego przez Doktorantkę

Problem naukowy w ocenianej pracy doktorskiej można zdefiniować jako określenie roli metalotionein w odpowiedzi owsa na stresy abiotyczne (suszy/osmotyczny, metali Zn i Cd) i biotyczne. Początkiem prowadzonych badań było oparte o literaturę założenie, że metalotioneiny mają istotny udział w generowaniu odpowiedzi owsa na oba rodzaje stresów. Zatem w pierwszym etapie w oparciu o metody bioinformatyczne zidentyfikowano u owsa 21 genów, określono ich lokalizację chromosomową, sekwencje nukleotydowe i strukturę, wskazano na sekwencje aminokwasowe i wyodrębniono typowe dla metalotionein cztery grupy MT1, MT2, MT3 i MT4, różniące się między innymi obecnością reszt cysteiny i histydyny.

Identyfikacja szeregu *cis*-elementów w sekwencjach promotorowych genów *AsMT1, AsMT2, AsMT3* i *AsMT4* była podstawą do wyznaczenia głównych kierunków dalszych badań, zgodnie z przypisaną im rolą w roślinie: (1) w regulacji procesów podczas rozwoju rośliny (CAT-box, NON-box, RY-element); (2) w odpowiedzi na stres suszy i osmotyczny (DRE, MBS, MYB); (3) na obecność metali - Zn i Cd (MRE, CuRE); (4) na fitohormony (ABRE); (5) na stres biotyczny (W-box, AT-rich sequences, TC-rich repeats).

Określenie w kolejnych badaniach zakresu modyfikacji ekspresji genów *AsMT1-4* w owsie w wyniku ekspozycji na zdefiniowane czynniki pozwoliło na wstępne zróżnicowanie funkcji badanych białek. Rośliny rosły w uprawach hydroponicznych lub w wazonach z ziemią. Poddawano je ekspozycji na stres suszy i stres osmotyczny (generowany w hydroponice obecnością PEG i D-mannitolu, a w doświadczeniach wazonowych ograniczonym podlewaniem) oraz na wysokie stężenia Zn i Cd.

Równolegle wykonano szeroko zakrojone analizy biochemiczne, w tym poziomu ABA, barwników fotosyntetycznych, enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy), fenoli, cukrów rozpuszczalnych, zawartości antyoksydantów (dwie metody ABTS i FRAP różniące się czułością/efektywnością), parametrów statusu wodnego (jak RWC-relative water content; WL-water loss, EL-electrolyte leakage, WUE-photosynthetic water use

efficiency), czy poziomu Zn i Cd w roślinach. Wiedząc, że reaktywne formy tlenu (RFT) są generowane przez wszystkie analizowane stresy oraz, że metalotioneiny to białka wielozadaniowe zdolne i do neutralizowania RFT i do wiązania jonów metali, dla zweryfikowania hipotezy o udziale MT w szlakach metabolicznych towarzyszących badanym stresom, wykonano analizy korelacji Pearsona tych czynników z ekspresją genów *AsMT1-4*. Dla pełniejszego obrazu udziału metalotionein w odpowiedzi owsa na stresy abiotyczne wykonano testy wzrostu *Escherichia coli* z ekspresją badanych genów w obecności PEG i D-mannitolu oraz nadmiaru Zn i Cd. Mogą one określić, które białka MT redukują generowany stres.

Do kilku najciekawszych ustaleń ocenianej pracy doktorskiej zaliczam wskazanie na różnice pomiędzy AsMT1, AsMT2, AsMT3 i AsMT4 w regulacji kiełkowania nasion i w odpowiedzi na stresy, zaznaczając jednocześnie, że funkcje badanych białek w znacznym stopniu się uzupełniają:

- podczas kiełkowania nasion owsa, najbardziej wyraźny udział ma AsMT4. To białko ma nieco odmienną strukturę wynikającą z posiadania największej liczby (17) reszt cysteiny (Cys) i dodatkowo histydynę (His) ważną w wiązaniu Zn. Przypisuje mu się ważną rolę w regulacji homeostazy Zn w rozwoju, ale także w kompleksowaniu Cd poprzez reszty Cys.
- w odpowiedzi na stres suszy i osmotyczny najbardziej wyraźną odpowiedź wykazuje AsMT2 (w promotorze genu znajduje się najwięcej motywów ABRE – siedem). Co ciekawe, zaobserwowano zróżnicowany udział białek MT w pędach (głównie AsMT1-2, zawierające odpowiednio po 12 i 14 Cys) i w korzeniach (AsMT4).
- organowo-specyficzny udział białek MT w odpowiedzi na nadmiar Zn i Cd: rolę w homeostazie Zn w korzeniach przypisuje się AsMT2 i AsMT3, natomiast AsMT1 udział w detoksykacji Cd w pędzie;
- ekspresja *AsMT1-3* jest regulowana ścieżką zależną od ABA, najsilniej *AsMT2*;

W rozprawie poddano badaniu jeszcze jeden wątek – rola MT w odpowiedzi na stres biotyczny. Zagadnienie to analizowano w powiązaniu dwóch czynników – odpowiedzi owsa na inokulację grzyba mykoryzowego *Trichoderma viride* i konsekwencji tej inokulacji dla pobierania i tolerancji na Cd. Inokulacja indukowała w liściach ekspresję genów *AsMT1-3* w obecności 1 mg Cd/kg gleby, zaś *AsMT4* w obecności 10 mg Cd/kg. Podnosiła także tolerancję na Cd prawdopodobnie poprzez kompleksowanie metalu i neutralizację RFT, nie wpływając jednak na pobieranie i akumulację.

W pracy nie znalazłam żadnych poważnych niedociągnięć. Z obowiązku recenzenta, zwracam jedynie uwagę na kilka aspektów.

(1) w badaniach roli MT w odpowiedzi na Zn i Cd zastosowano metodę ekspresji heterologicznej genów *AsMT1-4* w *E. coli* i wykazano iż ekspresja *AsMT3* i *AsMT4* zwiększała tolerancję bakterii na Zn i Cd sugerując redukcję poziomu stresu albo poprzez neutralizację RFT i/lub w wyniku kompleksowania nadmiaru metali w komórce. Uzupełnienie tego eksperymentu o pomiar stężenia metali w komórkach uczyniłoby wnioskowanie bardziej pełne.

(2) W publikacji nr 2, Figura 8C pokazuje aktywność peroksydazy (PX) w pędzie i korzeniu. Wartości dla pędu są istotnie wyższe po zastosowaniu stresu suszy, jednak średnie nie różnią się znacznie (a istotność statystyczna wynika z bardzo małych odchyleń). Taka różnica może zatem nie być istotna biologicznie.

(3) W publikacji nr 2, w 4-5 linii tekstu zamieszczonego pod legendą do Figury 9, znajduje się stwierdzenie: „In our study we also observed a slight but insignificant, increase in phenolic compounds in both roots and shoots of drought-treated plants." Wynik, do którego odnosi się to stwierdzenie pokazuje Figura 7B – uważam, że w przypadku pędu nie można mówić o „małym, nieistotnym statystycznie wzroście zawartości tych związków".

(4) W publikacji nr 4, w Tabeli 7 i 8 wartości nie wskazują zawartości Cd (content), tylko stężenie Cd w glebie.
W Tabeli 8 – podawane są także stężenia Cd, Cu i Zn, a nie zawartość (content – oznacza ilość metalu np. w [g] w przeliczeniu na masę danego organu).

(5) W podsumowaniu (rozdział VI rozprawy) znalazło się wiele szczegółowych wyników, ważnych dla całości dorobku merytorycznego ocenianej pracy doktorskiej. Zabrakło mi jednak wskazania

kolejno dla każdej metalotioneiny (AsMT1, AsMT2, AsMT3, AsMT4) na jej rolę w badanych procesach, w tym powiązania pomiędzy ekspresją genu, strukturą białka, a funkcją wskazywaną przez wyniki wielu doświadczeń (w sposób bardziej lub mniej jednoznaczny).
Proszę Doktorantkę o przygotowanie i przedstawienie takiego podsumowania podczas obrony i wskazanie w jaki sposób chciałaby badania kontynuować (gdyby była taka możliwość).

Podsumowując, dzięki bardzo szeroko zakrojonym, kompleksowym badaniom, znakomicie zaplanowanym i przeprowadzonym, otrzymano oryginalne, bardzo ciekawe wyniki charakteryzujące po raz pierwszy metalotioneiny owsa pod kątem ich roli w odpowiedzi na stresy abiotyczne i biotyczne. Oryginalność prowadzonych badań polega na wykonaniu uzupełniających się merytorycznie różnorodnych doświadczeń i pomiarów, których wyniki są na tyle powiązane, że porównanie ich i przeprowadzenie analizy korelacji umożliwia wskazanie na zróżnicowane/odmienne funkcje AsMT1, AsMT2, AsMT3 i AsMT4 w szlakach metabolicznych odpowiedzi na badane stresy. Oceniam zatem, iż kryterium oryginalności rozwiązania problemu jest całkowicie wypełnione.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r., art. 190 ust.2, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r., poz. 742 ze zm.). Pozytywna opinia o treściach zawartych w trzech elementach wskazanych w ustawie została wyrażona powyżej z podaniem uzasadnienia.

Doktorantka prezentuje obszerną wiedzę teoretyczną, umiejętność stawiania hipotez i dobierania odpowiednich metod dla weryfikacji. Biorąc pod uwagę zaprezentowany oryginalny dorobek naukowy stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w wyżej wymienionej ustawie i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Wiktorii Koniecznej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

D.M. Antosiewicz

Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz