



prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna
Zakład Botaniki Ogólnej
Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Dawida Kubiaka,
p.t. „Powstawanie i funkcje granul stresowych w stresie niedotlenienia u roślin
ze szczególnym uwzględnieniem roli m6A (N6 - metyloadenozyny)”

Podstawę formalną do wykonania recenzji stanowi pismo Dziekan Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, prof. dr hab. Justyny Rogalskiej wraz z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UMK w Toruniu z dnia 3 grudnia 2024 roku, powierzające mi obowiązki recenzentki na podstawie uchwały nr 88.

Oświadczam o braku zależności, która wpłynęłaby na obiektywizm mojej opinii.

Informacje formalne

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biologii Komórkowej i Molekularnej na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem prof. UMK dr hab. Janusza Niedojadło.

Recenzowana rozprawa ma charakter obszernej monografii, obejmującej 141 stron i zawiera typowy dla prac eksperymentalnych układ dysertacji doktorskiej. Składa się z siedmiu głównych rozdziałów, a także wykazu literatury obejmującego 217 pozycji. Monografia wzbogacona jest także dodatkami w postaci wykazu skrótów oraz danymi dotyczącymi finansowania badań. Dodatkowo całość pracy opatrzone streszczeniem w języku polskim i angielskim. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe, podobnie kompletność treści i zastosowane narzędzia badawcze. Wszystkie prace zostały wykonane przez Autora rozprawy, oczywisty jest zatem indywidualny i wyodrębniony wkład kandydata do stopnia doktora przy opracowywaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej oraz interpretacji wyników, co jest zgodne z zapisami w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Prace badawcze były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki: „Udział mechanizmów epitranskryptomicznych w funkcjonowaniu granul stresowych (SG) u roślin uprawnych poddanych stresowi abiotycznemu”, w ramach konkursu PRELUDIUM 21 (nr 2022/45/N/NZ9/04015), którego kierownikiem był Doktorant.

Układ rozprawy doktorskiej Pana mgr. Dawida Kubiaka jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, zaś na podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność przygotowania rozprawy, szczególnie dokumentacji fotograficznej. Tytuł rozprawy jest trafnie dobrany i w pełni odzwierciedla jej treść. Cel pracy został jasno, zwięźle i precyzyjnie sformułowany, a następnie szczegółowo rozwinięty i przedstawiony w toku badań. Wyniki zostały zaprezentowane wnikliwie i z dużą starannością. Prawidłowe zastosowanie cytowań oraz dobór literatury, która doskonale odzwierciedla aktualny stan wiedzy, zasługują na uznanie – zarówno pod względem jakości, jak i liczby (choć nie wszystkie zostały ujęte w porządku alfabetycznym, np. Kwon i in., 2007; Tong i in., 2022 czy Yan i in., 2014). Praca spełnia wszystkie formalne wymagania dotyczące struktury i prezentacji wyników



badania własnych, nie budząc żadnych zastrzeżeń. Styl pracy jest klarowny, a zastosowana terminologia naukowa w większości przypadków właściwa i precyzyjna.

Ocena merytoryczna

Przedstawiona do recenzji praca doktorska podejmuje dość trudny, w mojej ocenie, temat poznania natury i funkcji granul stresowych (SG) w komórkach korzeni *L. angustifolius* (łubinu wąskolistnego) i *A. thaliana* (rzodkiewnika pospolitego) podczas stresu hipoksji. Przeprowadzone przez Doktoranta badania wykazały, że podczas niedotlenienia w komórkach korzeni łubinu dochodzi do powstawania granul stresowych, bogatych w poli(A) RNA i białka PAB2. Te analizy obejmowały kilka stadiów, począwszy od identyfikacji i charakterystyki poszczególnych etapów ich powstawania oraz poznania struktury i dystrybucji molekuł na ich terenie, określenie zmian w obrębie transkryptomu łubinu w odpowiedzi na stres hipoksji oraz podczas powrotu do warunków fizjologicznych, poznanie zmian w ilości N⁶-metyloadenozyny (m⁶A) na poziomie epitranskryptomu łubinu, wraz z określeniem roli m⁶A w powstawaniu granul stresowych. Poznanie mechanizmów powstawania i funkcjonowania granul stresowych jest kluczowe dla rozpoznania fizjologii roślin w warunkach stresu i odpowiedzi roślin na czynnik stresowy, w tym konkretnym przypadku niedobór tlenu i związany z tym stres hipoksji. Sformułowanie problemu badawczego wymagało z pewnością zastanowienia się nad wyjaśnianym zagadnieniem, kontekstem, aktualnym stanem wiedzy i oryginalnością. Nie bez znaczenia był też odpowiedni model doświadczalny i plan badań. Jako model doświadczalny Autor wybrał komórki merystematyczne korzeni łubinu wąskolistnego, a niektóre analizy, ze względu na brak odpowiednich mutantów, przeprowadzono w oparciu o mutanty i mieszańce rzodkiewnika pospolitego. Dzięki takiemu podejściu i zastosowaniu mutantów (o wysoce obniżonym poziomie m⁶A) określono rolę modyfikacji N-6 metyloadenozyny w formowaniu i funkcjonowaniu granul stresowych. W wyniku braku zajścia procesu metylacji adenozyny zaobserwowano spadek liczby granul stresowych oraz zawartości poli(A) RNA na ich terenie, co stanowiło jednoznaczne potwierdzenie przyjętych założeń. Zastosowany w badaniach układ eksperymentalny został zaprojektowany z dbałością o szczegółowe etapy podejmowanych zadań badawczych, umożliwiające poznanie kolejnych mechanizmów regulujących powstanie, rozwój i funkcjonowanie granul stresowych w stresie hipoksji. Tok rozumowania zaprezentowany w dysertacji jest prawidłowy, zrozumiały i w przejrzysty sposób prowadzi czytelnika przez wyniki uzyskanych analiz oraz ich dyskusję.

Takie podejście tematu i zaprezentowana koncepcja badań wydaje się jak najbardziej słuszna. Interesujące i intrygujące zarazem jest to, że po ustąpieniu stresu granule stresowe również zanikają oraz, że podczas hipoksji w granulach stresowych przechowywane są transkrypty, które stanowią wystarczające źródło cytoplazmatycznego RNA w pierwszych godzinach po ponownym natlenieniu roślin. Przedstawione wyniki są w dużej mierze nowatorskie, uzyskane właśnie dzięki unikalnemu systemowi eksperymentalnemu i możliwości wykorzystania linii transgenicznych rzodkiewnika.

W głównej części dysertacji Autor przedstawił wstęp z przeglądem literatury, cel pracy, wykorzystane materiały, zastosowane metody badawcze, wyniki oraz ich dyskusję. W tak obszernym opracowaniu nie brakuje drobnych błędów edytorskich, w tym interpunkcyjnych i tzw. literówek. Wymienione drobne uchybienia nie wpływają jednak negatywnie na moją ocenę merytoryczną pracy.

Autor przytoczył też na str. 5 publikację - jako część wchodzącą w skład pracy doktorskiej, jednak aby tak było musiałaby być załączona do dysertacji wraz z wymaganymi oświadczeniami



współautorów i jasno wydzieloną częścią autorstwa Doktoranta. Rozumiem, że w tym konkretnym przypadku zapis powinien raczej brzmieć: Publikacje obejmujące wybrane wyniki rozprawy.

Ocena poszczególnych części rozprawy

Wstęp z przeglądem literatury został zaprezentowany jako dość obszerne omówienie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy z przedmiotu badań. Rozdział ten wprowadza w tematykę pracy, w którym Autor wiedzie czytelnika rozmyślnie przez poszczególne etapy rozważań i omawia szczegółowo stan wiedzy, jednak czyni to w sposób przemyślany i konsekwentnie zmierzający do przedstawienia zamierzonego konceptu pracy. Zasadniczym dążeniem Autora było bowiem nakreślenie wyłaniającego się celu pracy, czyli poznania natury i funkcjonowania granul stresowych w stresie hipoksji. Mam jednak pytanie, czy rzeczywiście wszystkie, jak Autor stwierdza „rośliny są organizmami osiadłymi”? Czy tylko większość, w tym ta większość odnosi się przede wszystkim do roślin lądowych?

W rozdziale *Cel pracy* pan mgr Dawid Kubiak postawił także pytania badawcze, które miały pomóc zrealizować główny cel badań i na które starał się odpowiedzieć po przeprowadzeniu kolejnych zadań badawczych.

W rozdziale *Materiały, a także w rozdziale Metody* krótko omówiono materiał badawczy, wszystkie użyte materiały i odczynniki oraz opracowany układ eksperymentalny. Do realizacji głównych założeń pracy wykorzystano w pełni odpowiednie, nowoczesne techniki i metody z zakresu biologii komórki oraz biologii molekularnej. Poza uprawą i przygotowaniem materiału roślinnego do badań, stosowano takie techniki jak analizy mikroskopowe w mikroskopie konfokalnym (w tym hybrydyzacje *in situ* i reakcje immunohistochemiczne) oraz transmisyjnym mikroskopie elektronowym (w tym reakcje immunocytochemiczne z wykorzystaniem cząstek złota do detekcji), analizy transkryptomyczne (w tym immunoprecypitacja, reakcje qRT-PCR, sekwencjonowanie), analizy bioinformatyczne i statystyczne. Zastosowane metody badawcze zostały opisane zgodnie ze standardami przyjętymi dla prac doktorskich, jasno przedstawiając sposób i zakres przeprowadzonych analiz. Przy okazji lektury tego rozdziału nasunęło mi się kilka pytań lub wątpliwości, które z obowiązku recenzenta chciałabym wyjaśnić:

- 1) Jaka była wielkość 3-dniowych siewek i długość korzeni łubinu, użytych do badań?
- 2) W rozdziale dotyczącym opisów zastosowanej metodyki Autor używa terminu „hodowla”. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii w kontekście powszechnie przyjętej definicji hodowli roślin, zgodnie z którą jest to „nauka zajmująca się polepszaniem cech dziedzicznych u roślin uprawnych, obejmująca również praktyczne działania zmierzające do stworzenia odmian lepszych jakościowo i plenniejszych”. Czy w świetle tej definicji, układ eksperymentalny zastosowany w pracy doktorskiej należy określić jako hodowlę, czy raczej uprawę roślin?
- 3) W przypadku materiału roślinnego, takiego jak nasiona łubinu wąskolistnego czy rzodkiewnika pospolitego, właściwszym terminem jest „dezynfekcja powierzchniowa” niż „sterylizacja”. Określenie „sterylizacja” w języku polskim, zwłaszcza w kontekście biologicznym, odnosi się bowiem do procesu prowadzącego do ubezplodnienia.
- 4) Autor podaje, że materiał roślinny utrwalano w 4% paraformaldehydzie. Czy rzeczywiście możemy uznać, że nadal był to paraformaldehyd? Paraformaldehyd jest spolimeryzowanym formaldehydem, zwykle otrzymywanym jako biały proszek. Zmieszany z wodą i podgrzany ulega całkowitej depolimeryzacji i rozpuszcza się w wodzie tworząc roztwór formaldehydu. Paraformaldehyd jest zatem krystalicznym polimerem formaldehydu, który w warunkach laboratoryjnych zwykle jest odważany i rozpuszczany w roztworze do eksperymentów lub utrwalania komórek i tkanek.



- 5) Dlaczego podczas normalizacji wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano tylko jeden gen referencyjny UBC5, należący do rodziny genów kodujących ubikwitynę – białko, które odgrywa kluczową rolę w degradacji białek w komórce? Normalizacja względem pojedynczego genu referencyjnego nie jest już obecnie akceptowalna, chyba że badacze przedstawią dla recenzentów jasne dowody potwierdzające jego niezmienną ekspresję w opisanych warunkach eksperymentalnych (szczegóły w pracy: Bustin i in. 2009, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments). Każdy gen referencyjny może potencjalnie ulegać zmiennej ekspresji w zależności od warunków eksperymentalnych (np. stres), rodzaju tkanki, fazy cyklu komórkowego. Jeżeli jedyny gen referencyjny ulega zmienności, wyniki normalizacji mogą być błędne. Optymalną liczbę i wybór genów referencyjnych należy określić doświadczalnie, podając szczegółowo zastosowaną metodykę. Obecnie zaleca się, aby zawsze używać co najmniej dwóch genów referencyjnych, ponieważ użycie tylko jednego może prowadzić do stosunkowo dużych błędów. Wszelkie nawet niewielkie zmiany w ekspresji genu normalizatora zaciemniają rzeczywiste różnice i powodują zmiany artefaktyczne. Proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.
- 6) Nie odnalazłam także opisu liczby powtórzeń (biologicznych/technicznych) dla poszczególnych typów analiz.

Rozdział Wyniki został przedstawiony na 50 stronach. Na uwagę zasługuje ogrom analizowanych rezultatów i jednocześnie z reguły klarowna ich prezentacja, rzeczowa analiza oraz trafne spostrzeżenia w każdym z przedstawionych podrozdziałów. Każdy rozdział rozpoczyna się sformułowaniem celu cząstkowego a jednocześnie kończy się podsumowaniem, pozwalającym na zestawienie detalicznych wyników w nim opisywanych i odniesieniem do nakreślonego celu. Wyniki są oryginalne i bez wątplenia zawierają element nowatorski. W mojej ocenie sam sposób prezentacji i eksponowania dość licznej dokumentacji fotograficznej nie budzi zastrzeżeń a nawet jest tak klarowny, że umożliwia łatwe śledzenie kolejnych opisywanych wyników.

Brakuje jednak wielu wyników reakcji kontrolnych (kontrole negatywne), np. z pominięciem pierwotnego przeciwciała, zarówno w mikroskopii konfokalnej jak i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Należałoby je przedstawić w krótkim chociażby zestawieniu jako suplement do pracy.

Wskazany byłby też schemat/diagram podsumowujący najważniejsze z uzyskanych wyników. Tego rodzaju schemat może jednak zostać zaprezentowany podczas obrony pracy doktorskiej. Zwłaszcza, że wśród uzyskanych wyników za niezwykle cenne należy uznać zaprezentowany, po raz pierwszy dla komórek roślinnych, wpływ modyfikacji N6-metyloadenozyny na powstawanie i zawartość mRNA w granulach stresowych. Wskazuje na to przede wszystkim obecność m6A w SG w pierwszych etapach ich powstawania, występowanie w granulach stresowych transkryptów, w których poziom m6A istotnie wzrasta podczas hipoksji, zmniejszona liczba granul stresowych w mutantach rzodkiewnika o obniżonym poziomie m6A oraz obniżenie poziomu poli(A) RNA w granulach stresowych u mutantów rzodkiewnika z zredukowaną ilością m6A.

Należy jednak zdawać sobie sprawę z faktu, że tak detaliczny sposób dowiedzenia zawartych w dysertacji wyników wymagał jednak wielu czasochłonnych analiz mikroskopowych, z wykorzystaniem materiału badawczego głównego – korzeni łubinu jak i wielu różnych linii, w tym mieszańcowych, transgenicznych roślin i zastosowania różnorodnych metod immunohistochemicznych, immunocytochemicznych i molekularnych, a także szeregu godzin spędzonych nad interpretacją uzyskanych obrazów, co należy szczególnie docenić przy ocenie wyników badań. Badania obejmowały także kilka wariantów hipoksji oraz reoksygenację.



Dodatkowo, jak już odnotowano, wybrane wyniki badań zostały już wysłane do redakcji czasopisma o zasięgu międzynarodowym. Pozostałe z pewnością stanowią dobry materiał publikacyjny, a drobne uwagi tylko pomogą przygotować manuskrypty kolejnych publikacji.

Na nie mniejszą uwagę zasługuje umiejętność *Dyskusji* uzyskanych wyników badań i zestawienia ich z danymi literaturowymi. Nie było to zadanie proste, biorąc pod uwagę mnogość badanych czynników i zastosowany model eksperymentalny, który obejmował liczne doświadczenia z wykorzystaniem szerokiego wachlarza odpowiednio dobranego materiału roślinnego. Nieco ułatwia fakt podziału dyskusji na podrozdziały. Dyskusje w poszczególnych podrozdziałach dowodzą, że pan mgr Dawid Kubiak posiadał umiejętność właściwej, krytycznej interpretacji otrzymanych wyników badań własnych oraz wyciągnięcia z nich trafnych wniosków. Autor prawidłowo konfrontuje bowiem wyniki badań własnych z dostępnymi danymi literaturowymi, niejednokrotnie wskazując lub odnosząc je nie tylko do świata roślin, ale i organizmów/komórek zwierzęcych, dla których prowadzono takie analizy. Wszystkie cytowane w dyskusji prace zostały dobrane właściwie i wskazują na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Z niezwykłą łatwością dochodzi Doktorant do kluczowych, jasno sprecyzowanych wniosków, interpretując uzyskane wyniki dotyczące formowania i funkcjonowania granul stresowych w stresie hipoksji, jak i podczas reoksygenacji. Niezwykle ciekawe jest, że po ustąpieniu stresu również i granul stresowe stopniowo zanikają. Doktorant pisze (str. 112) o dwóch strategiach odpowiedzi roślin na działający czynnik stresowy, strategii „ucieczki” i „spoczynku”. Czy ów spoczynek można jednak w pewnym stopniu rozpatrywać w kategoriach adaptacyjnych do warunków stresowych?

Lektura tak obszernej i starannie opracowanej pracy doktorskiej skłania również do refleksji nad możliwymi dalszymi kierunkami badań, które ta praca otwiera w ramach dyscypliny. Czy uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do alternatywnej konceptualizacji lub sformułowania nowych hipotez, które warto byłoby zweryfikować w przyszłych badaniach? Byłoby niezwykle interesujące poznać stanowisko Doktoranta w tej sprawie, dlatego uprzejmie proszę o odniesienie się do tych kwestii podczas obrony.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wartość merytoryczną rozprawy, znaczenie uzyskanych wyników oraz kompetencje Doktoranta oceniam bardzo wysoko. Praca jest dojrzałym studium i znakomitym wkładem w dziedzinę biologii rozwoju roślin, także w warunkach hipoksji. Przedstawione nieliczne zapytania są podyktowane chęcią pobudzenia dyskusji i poznania opinii Doktoranta, zaś w niczym nie umniejszają wartości prezentowanej dysertacji. Uważam, że Doktorant w pełni rozwiązał problem, jaki nakreślił w celu badawczym. Dysertacja jest bardzo dobrym opracowaniem naukowym i wnosi nowe, istotne odkrycia, pozwalające lepiej poznać proces formowania i funkcjonowania granul stresowych u roślin w odpowiedzi na czynnik stresowy, jakim jest niedobór tlenu oraz wskazać jego główne mechanizmy. Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, jako że uzyskana wiedza w zakresie czynników determinujących prawidłową reakcję roślin na czynnik stresowy może przyczynić się do potencjalnego jej wykorzystania do ewentualnej modulacji wzrostu i rozwoju roślin w niekorzystnych warunkach. Przedstawiona do oceny praca doktorska dowodzi, że Pan mgr Dawid Kubiak posiadał umiejętność stawiania problemów badawczych, planowania badań i formułowania celu pracy wraz z jego konsekwentną realizacją, jak również także konfrontowania wyników badań własnych z tymi uzyskanymi przez inne zespoły badaczy.



Przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim zgodnie z przepisami Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Uwzględniając również przepisy wydane na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy, przedkładam Wysockiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne w Toruniu wniosek o dopuszczenie mgr. Dawida Kubiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, celem nadania mu stopnia doktora w dziedzinie i dyscyplinie określonej w tych przepisach.

Jednocześnie, mając na uwadze niezwykle wysoki poziom recenzowanej rozprawy, jej znaczącą wartość naukową, wysoką jakość i oryginalność przeprowadzonych badań, wnioskuję o uhonorowanie pracy doktorskiej mgr. Dawida Kubiaka stosownym wyróżnieniem. Uważam, że rozprawa ta stanowi dojrzałe i kompleksowe studium, wnoszące istotny wkład w naukę poprzez odkrycia, które w znaczący sposób pogłębiają naszą wiedzę na temat natury i funkcjonowania granul stresowych u roślin wyższych.

Poznań, 07.01.2025