

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Dawida Kubiaka

pt.” Powstawanie i funkcje granul stresowych w stresie niedotlenienia u roślin ze szczególnym uwzględnieniem roli m6A (N6 - metyloadenozny)”

Opis ogólny

Rozprawa doktorska Pana mgra **Dawida Kubiaka** ma postać monografii, składa się z: Wykazu opublikowanych i nieopublikowanych prac doktoranta, Finansowania, Wykazu skrótów, Streszczeń w j. polskim i angielskim, Wstępu, Celu pracy, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Literatury. Według zamieszczonej informacji artykuł „*Interplay between m6A modification and overall transcripts quantity: Impacts on mRNA composition in plant stress granules*” wchodzi w skład rozprawy doktorskiej, jednak brak tego manuskryptu w przesłanej dokumentacji, brak również oświadczeń współautorów tego manuskryptu. W wspomnianym manuskrypcie doktorant jest pierwszym autorem.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt „*Udział mechanizmów epi-transkryptomycznych w funkcjonowaniu granul stresowych (SG) u roślin uprawnych poddanych stresowi abiotycznemu*”, którego kierownikiem jest Doktorant, co świadczy, że Pan Kubiak z sukcesem potrafi zdobywać zewnętrzne środki na badania naukowe.

Rozprawa liczy 141 strony oraz 25 rycin i fotografii. Została napisana klarownym, poprawnym językiem polskim.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich typu monografii.

Mam drobne zastrzeżenie co do szaty graficznej. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego są bardzo dobrej jakości ale powinny być większe.

Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

W części wstępnej rozprawy Doktorant jasno sformułował problem badawczy. Szczegółowo nakreślił obecny stan wiedzy oraz wskazał „białe plamy”, które powinny być uzupełnione. Sam wstęp mógłby być publikowany jako samodzielny artykuł przeglądowy o strukturze, funkcji i dynamice granul stresowych.

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy dotyczącej natury i

funkcji granul stresowych w komórkach korzeni podczas stresu hipoksji. Należy podkreślić iż tematyka rozprawy jest niezwykle interesująca. Pomimo że granule stresowe zostały odkryte w latach osiemdziesiątych to badania nad nimi skupiały się głównie na komórkach ssaczy, owadach czy drożdży. U roślin analizowano przede wszystkim granule stresowe u rzodkiewnika, tytoniu oraz u zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. Badania wskazują na cechy wspólne granul stresowych u różnych organizmów co sugeruje, że są to struktury stare ewolucyjnie i bardzo konserwatywne. Granule stresowe budzą żywotne zainteresowanie, ponieważ stwierdzono ich powiązaniem m.in. z stwardnieniem zanikowym bocznym oraz chorobą Alzheimera u ludzi.

Jako model badawczy wybrano *Lupinus angustifolius* i *Arabidopsis thaliana* (rośliny transgeniczne, mutanty i mieszańce). Doktorant miał do wykonania cztery szczegółowe zadania badawcze: - identyfikację i badanie etapów powstawania granul stresowych oraz poznanie struktury i dystrybucji molekuł na ich terenie; - badanie zmian transkryptomu łubinu w odpowiedzi na stres hipoksji oraz podczas powrotu do warunków fizjologicznych; - poznanie zmian ilości m6A na poziomie epitranskryptomu łubinu, oraz określenie roli m6A w powstawaniu granul stresowych. Dla rozwiązania powyższych problemów badawczych Doktorant zastosował różnorodny i zawansowany, molekularny warsztat badawczy (min. inhibicje translacji i transportu jądrocytoplazmatycznego, hybrydyzacje *in situ* i immunolokalizację, a także analizy transkryptomiczne). Zastosowano mikroskopie konfokalną i mikroskopie wysokorozdzielczą. Ponadto Pan Kubiak przeanalizował ultrastrukturę komórek korzeni dla udokumentowania struktury i dynamiki granul stresowych oraz przeprowadził lokalizację *PAB2* techniką immunozłotową. Ponadto przeprowadził izolacje granul stresowych, dla pokazania ich struktury. Warto podkreślić, że Doktorant jako pierwszy zastosował przeciwciała do m6A w technikach *in situ*, co świadczy o nowatorstwie i umiejętnościach Pana Kubiaka.

Doktorant wykazał, że podczas hipoksji w komórkach korzeni łubinu dochodzi do powstawania granul stresowych bogatych w poli(A) RNA i białka PAB2. Pokazał dynamikę tych struktur oraz udowodnił, że podczas hipoksji transkrypty z cytoplazmy przemieszczają się do granul stresowych. Natomiast granule stresowe zanikają po ustąpieniu stresu. Pan Kubiak analizował ultrastrukturę granul stresowych oraz wykazał, że granule składają się z pierścienia bogatego w poli(A) RNA i PAB2 oraz centralnej strefy z rybosomami, która jest wolna od poli(A) RNA i PAB2. Doktorant m.in. udowodnił, że granule stresowe są głównym źródłem zwiększającej się ilości mRNA w cytoplazmie po ustaniu hipoksji dzięki czemu komórka może wrócić do prawidłowego funkcjonowania. Doktorant zidentyfikował 21 036 genów różnicowo eksprymowanych w czasie niedotlenienia u łubinu. Najważniejszym osiągnięciem Pana Kubiaka, potwierdzonym eksperymentalnie, jest udowodnienie, że m6A ma istotny udział w odpowiedzi na stres niedotlenienia, zarówno związanej z regulacją ilości mRNA, ale także z przechowywaniem

transkryptów na okres po zakończeniu stresu w granulach stresowych.

Na szczególną uwagę zasługuje stwierdzenie przez Doktoranta, że znaczna liczba genów indukowanych w odpowiedzi na stres niedotlenienia jest związana z biogenezą ściany komórkowej. Aktywacja genów związanych z metabolizmem hemiceluloz, ekspansyn i enzymów XTH powoduje przebudowę ścian komórkowych oraz syntezę ściany komórkowej. Umożliwia to aktywację mechanizmu obronnego – „ucieczki” korzeni ze środowiska z obniżoną ilością tlenu.

Rolą recenzenta jest także wskazanie uchybień w rozprawie. Doktorant często nie stosuje kursywy w zapisie nazw gatunkowych czy rodzajowych, szczególnie w literaturze. Nie znalazłem kontroli znakowania złotem. Te drobne błędy nie mają wpływu na wysoką wartość merytoryczną dysertacji. Pan Kubiak wykonał olbrzymią pracę laboratoryjną. Czytając dysertację mam pewność, że autor dysertacji jest świadomym, w pełni rozwiniętym naukowcem.

Podsumowując uważam, że Doktorant w pełni rozwiązał oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawił. Ponadto wykazał się dojrzałością naukową, umiejętnością pracy w zespole, świetnie opanował warsztat biologa molekularnego, oraz potrafił zdobyć środki finansowe na prowadzenie badań. Należy podkreślić, że dysertacja Pana Kubiaka jak i prace naukowe zespołu dr hab. Janusza Niedojadło, prof. UMKa stanowią ważny krok w zrozumieniu granul stresowych i ciał jądrowych roślin.

Podczas czytania rozprawy nasunęły mi się następujące pytania i sugestie:

Czy są doniesienia o obecności granul stresowych u roślin odpornych na zalanie i okresowe braki tlenu?

Czy u rzodkiewnika są różnice pomiędzy granulami stresowymi występującymi w czasie szoku cieplnego a tymi które powstają w wyniku hipoksji?

Warto sprawdzić dynamikę granul stresowych w starszych częściach korzenia u starszych roślin w wyspecjalizowanych i całkowicie wyróżnicowanych już komórkach różnych tkanek.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja doktorska Pana mgra Dawida Kubiaka spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki merytoryczny poziom przedstawionej dysertacji wnioskuję do szanownej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o nagrodzenie Pana Dawida Kubiaka.