

Łódź, dnia 15.01.2025 r.

Dr hab. Dorota Rybaczek, prof. UŁ  
Katedra Cytofizjologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Dawida Kubiaka  
pt.: Powstawanie i funkcje granul stresowych w stresie niedotlenienia u roślin  
ze szczególnym uwzględnieniem roli m6A (N6-metyloadenozyny)**

wykonanej pod kierunkiem dra hab. Janusza Niedojadło, prof. UMK

w Katedrze Biologii Komórkowej i Molekularnej

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Reakcje roślin związane z odpowiedzią na stres, w tym mechanizmy adaptacji, są dynamiczne i mają kluczowe znaczenie dla przetrwania organizmu roślinnego we wciąż zmieniającym się środowisku. Adaptacja do warunków stresowych jest możliwa m.in. poprzez cytoplazmatyczną akumulację granul stresowych. W recenzowanej rozprawie doktorskiej Pan mgr Dawid Kubiak postawił sobie za zadanie scharakteryzowanie funkcji granul stresowych i etapów ich powstawania w warunkach stresu niedotlenienia, a także ustalenie roli N6-metyloadenozyny w odpowiedzi na ten rodzaj stresu abiotycznego. Tematyka rozprawy doktorskiej jest nowatorska i szalenie interesująca, a uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju nauk biologicznych.

### 1/ Ogólna ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest pracą o typowym układzie monografii napisanej w języku polskim. Dysertacja napisana jest poprawną polszczyzną, z dbałością o klarowność przekazu naukowego. Wstęp w sposób logiczny prowadzi do przedstawienia zasadniczych celów badawczych stawianych przez Doktoranta. W kolejnym rozdziale w przejrzysty sposób opisane zostały metody hodowli roślin i techniki wykorzystane podczas prowadzonych badań. Doktorant pracował na modelu stresu niedotlenienia (przez 1, 6, 9 i 15 godzin) oraz ponownego natlenienia komórek korzeni siewek łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*), jak również na roślinach typu dzikiego i mutantach rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*) o wysoce obniżonym poziomie N6-metyloadenozyny. Wyniki zostały opisane w sposób jasny, a ich krytyczna dyskusja została poprowadzona w kontekście najnowszych danych literaturowych. O szerokiej wiedzy i bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta świadczy również liczba 215 pozycji literaturowych, stanowiących przykład trafnie wyselekcjonowanego piśmiennictwa. Szata graficzna manuskryptu jest na wysokim poziomie. Ryciny i tabele umieszczone w rozdziale „Wyniki”, w jasny sposób ilustrują otrzymane przez Doktoranta dane eksperymentane.

Dysertacja poprzedzona jest: (i) spisem treści, (ii) zestawieniem osiągnięć naukowych Doktoranta (cztery publikacje: w tym trzy opublikowane, a jedna posiadająca status „w recenzji”), (iii) wskazaniem źródła finansowania badań (grant PRELUDIUM 21 o numerze 2022/45/N/NZ9/04015), (iv) streszczeniem w języku polskim i (v) abstraktem w języku angielskim, a także (vi) wykazem skrótów. Struktura manuskryptu jest czytelna, a podział na poszczególne części prawidłowy i logiczny.

### 2/ Szczegółowa ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp. Teoretyczne tło badań prezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej przedstawione zostało w liczącym 18 stron wstępie. Ten rozdział pracy, podobnie zresztą jak pozostałe części rozprawy, został starannie przemyślany przez Doktoranta i stanowi wystarczająco dobre wprowadzenie do zagadnień prezentowanych w dalszej części dysertacji. We wstępie Pan mgr Dawid Kubiak opisuje zjawisko stresu niedotlenienia u roślin, przedstawia dane literaturowe dotyczące formowania granul stresowych, wprowadza

czytelnika w zagadnienia związane z epitranskryptomem w taki sposób, aby finalnie zaprezentować molekularne mechanizmy działania N6-metyloadenozyny. Informacje zawarte we wstępie są przedstawione w sposób klarowny, a kolejne podrozdziały stanowią swoje logiczne następstwo.

Cel pracy. Głównym celem pracy było badanie etapów powstawania, struktury, natury i funkcji granul stresowych podczas stresu niedotlenienia, a także towarzyszących (zarówno hipoksji, jak i regeneracji) zmian transkryptomu. Szczególny nacisk położono na określenie roli N6-metyloadenozyny w badanych procesach. Postawione przez Pana mgr Dawida Kubiaka cele pracy są bardzo ambitne, zostały jasno sformułowane, a ich realizacja może znacząco przyczynić się do pogłębienia wiedzy dotyczącej funkcjonowania u roślin szlaków odpowiedzi na stres abiotyczny.

Materiał i metody. Badania prowadzono w prawidłowych komórkach korzeni tubinu wąskolistnego, (*L. angustifolius*) oraz mutantach i komórkach typu dzikiego *Arabidopsis thaliana*. W rozdziale metodycznym Doktorant szczegółowo i jasno charakteryzuje wykorzystywane w pracy techniki eksperymentalne. Na uznanie zasługuje szeroka gama metod i technik wykorzystanych przez Doktoranta do przeprowadzenia zaplanowanych badań, m.in. barwień immunocytochemicznych, immunolokalizacji na poziomie ultrastrukturalnym, hybrydyzacji *in situ*, mikroskopii konfokalnej, super-rozdzielczej, technik związanych z analizą transkryptomu i wreszcie: analiz bioinformatycznych oraz ilościowej i jakościowej oceny kwasów nukleinowych przeprowadzonej z wykorzystaniem spektrofotometrii, fluorymetrii i metod elektroforetycznych. Oceniając stronę metodyczną pracy należy podkreślić znakomite przygotowanie Pana mgr Kubiaka pod względem umiejętności praktycznego zastosowania różnorodnych, skomplikowanych i czasochłonnych narzędzi badawczych.

Wyniki. Uzyskane wyniki zostały opisane w sposób jasny i syntetyczny, zilustrowano je dwudziestoma siedmioma rycinami, znacząco ułatwiającymi odbiór wielowątkowych danych. Na uwagę zasługuje fakt, iż kolejne podrozdziały tej części dysertacji przeprowadzają czytelnika przez realizację jej kolejnych celów cząstkowych w sposób absolutnie pozbawiony

chaosu. Na uznanie zasługują także podpisy pod rycinami, które rozbudowano w taki sposób, aby każdorazowo były pomocne w analizie wyników prezentowanych na danej rycinie i w towarzyszącym rycinie adekwatnym fragmencie tekstu rozprawy doktorskiej.

Doktorant wykazał, że w komórkach łubinu wąskolistnego poddanych działaniu stresu hipoksji powstają dwustrefowe granule stresowe. Pierścień granul stresowych stanowi źródło poli(a) RNA oraz białek PAB2, a w strefie centralnej granul stresowych zlokalizowane są rybosomy. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń nad reoksygenacją wykazano, że granule stresowe zanikają po ustąpieniu stresu. W dalszej części pracy Doktorant wykazał, że modyfikacja m6A wpływa na powstawanie i zawartość mRNA w granulach stresowych, na co wskazuje (1) obecność m6A w granulach stresowych w pierwszych etapach ich powstawania; (2) występowanie w granulach stresowych transkryptów o zwiększonym poziomie m6A podczas stresu hipoksji; (3) generowanie mniejszej ilości granul stresowych (które, dodatkowo, zawierały niższy poziom poli (A) RNA) w tych mutantach *A. thaliana*, które charakteryzował obniżony poziom m6A.

Kolejne wyniki wykazały, związane z hipoksją, wzrost ekspresji tych genów, które kodują enzymy fermentacji alkoholowej, syntetazę sacharozy i kinazy serynowo-treoninowe. W tym kontekście kieruję do Doktoranta pytanie o to jakie konkretnie kinazy serynowo-treoninowe są produkowane w warunkach niedotlenienia i - kolejne pytanie - czy Doktorant może wskazać takie prace badawcze, które traktowałyby o szlakach biochemicznych angażujących konkretne kinazy serynowo-treoninowe, aktywowane podczas stresu hipoksji lub innych rodzajów stresów wywołanych czynnikiem/czynnikami abiotycznymi.

Podsumowując – stwierdzam, że przedstawione w dysertacji wyniki wskazują na pełną realizację założonych wcześniej cząstkowych i głównych celów badawczych.

Dyskusja. Wyniki uzyskane w pracy zostały prawidłowo omówione i zestawione z najnowszymi danymi literaturowymi w części dyskusyjnej rozprawy doktorskiej. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i dużą dojrzałość naukową Doktoranta.

### 3/ Uwagi i komentarze

Recenzowaną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, jednak z obowiązku recenzenta pragnę podzielić się z Doktorantem pewnymi drobnymi uwagami i pytaniami, które nasunęły mi się podczas czytania, podkreślam, bardzo dobrze napisanej pracy:

- 1/ W rozdziale „Wstęp” trochę brakuje schematu ilustrującego złożony mechanizm regulacji ekspresji genów (epitranskryptom) oraz ryciny ilustrującej funkcje N6-metyloadenozyny w warunkach prawidłowych i podczas stresu hipoksji. Cenne byłoby także – w mojej ocenie – wzbogacenie dyskusji o schemat podsumowujący poruszane w rozprawie doktorskiej treści (szczególnie te nowatorskie).
- 2/ W początkowych fragmentach rozdziału opisującego wyniki odczuwam brak fotografii przedstawiającej morfologię korzeni łubinu poddanych stresowi niedotlenienia - proszę o zestawienie opisu (podczas publicznej obrony) morfologii korzeni łubinu, szczególnie w 15 godzinie stresu hipoksji, z korzeniami poddanymi regeneracji – czy obserwowano jakiegokolwiek różnice w morfologii korzeni *L. angustifolius* między seriami eksperymentalnymi, jak również w zestawieniu z korzeniami serii kontrolnej?

### 4/ Pozostały dorobek naukowy doktoranta

Na dorobek naukowy Pana mgr Dawida Kubiaka składają się trzy artykuły opublikowane i jeden artykuł wysłany do recenzji w *Journal of Experimental Botany*. W aktualnie recenzowanym artykule Doktorant jest pierwszym autorem. W pracach już opublikowanych Pan mgr Dawid Kubiak jest odpowiednio: piątym, trzecim i drugim autorem. Doktorant jest także beneficjentem grantu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki. Całość dorobku naukowego Pana mgr Dawida Kubiaka oceniam wysoko, uważam że jest on - na tym etapie kariery naukowej - adekwatny.

### 5/ Podsumowanie

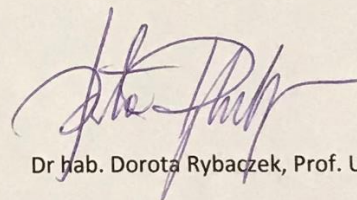
Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Dawida Kubiaka dowodzi, że Doktorant jest bardzo dobrze przygotowany, zarówno pod względem merytorycznym jak i praktycznym,

do pracy naukowej. Dysertacja stanowi przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną - pod względem zastosowanych technik i analiz - oraz jasno i zwięźle opisaną, i przedyskutowaną całość. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są nowatorskie oraz niezwykle istotne dla zrozumienia reakcji roślin na stres niedotlenienia, i ważne - szczególnie w aspekcie postępujących zmian klimatu. Przedstawione w tekście recenzji nieliczne pytania, nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej, stanowią raczej punkt wyjścia i inspirację do dyskusji.

#### **6/ Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Dawida Kubiaka spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Dawida Kubiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracając uwagę na ponadprzeciętne przygotowanie merytoryczne, znakomity warsztat naukowy Pana mgr Dawida Kubiaka, mnogość zastosowanych nowoczesnych narzędzi badawczych, a także nowatorstwo uzyskanych przez Doktoranta wyników, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Dr hab. Dorota Rybaczek, Prof. UŁ