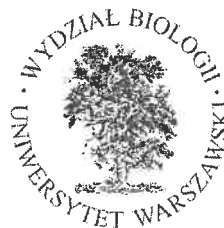




UNIwersytet
Warszawski



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, 12.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Małas
pt: „Molekularna charakterystyka roślinnych mitoferryn”

promotor: dr hab. Katarzyna Kabala

Praca doktorska mgr Karoliny Małas została wykonana w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

1. Znaczenie podjętego tematu

Ważnym czynnikiem warunkującym prawidłowy wzrost i rozwój roślin jest dostępność żelaza. Wchodzi w skład wielu enzymów kluczowych dla metabolizmu, w tym zaangażowanych w procesy fotosyntezy i oddychania. Utrzymanie prawidłowego poziomu tego mikroelementu w komórkach i organellach zależy od wielu białek. Należą do nich także białka transbłonowe, katalizujące pobieranie żelaza zarówno do komórki jak też do wnętrza organelli. Reakcje biochemiczne zachodzące w mitochondriach i chloroplastach zależą od obecności żelaza, jednak wiedza o białkach zaangażowanych w jego pobieranie nie jest duża. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska prowadzi do zmniejszenia tej luki w wiedzy. Duże znaczenie poznawcze pracy wynika z identyfikacji i funkcjonalnej charakterystyki u rzodkiewnika i ogórka mitoferryn, białek z rodziny MCF (ang. *mitochondrial carrier family*), zaangażowanych w transport żelaza do mitochondriów i chloroplastów.

2. Ocena formalna

Praca doktorska wraz ze spisem treści, wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, piśmiennictwem oraz informacją o finansowaniu badań liczy 220 stron. Część zasadniczą podzielono na pięć rozdziałów głównych (Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja). Układ pracy jest zgodny z ogólnie przyjętym schematem dla tego typu prac, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Literatura cytowana w pracy dobrana prawidłowo, z odniesieniem zarówno do kluczowych prac opublikowanych wcześniej jak też do najnowszych pozycji.

Praca napisana poprawnym językiem, bez stosowania żargonu laboratoryjnego. Zawiera nieliczne błędy literowe. Figury i Tabele wykonane poprawnie, legenda dobrze opracowana, pozwalająca na rozumienie treści grafiki zasadniczo bez sięgania do tekstu.

Doktorantka otrzymała na realizację pracy doktorskiej grant NCN PRELUDIUM 15 (2018/29/N/NZ1/01432) oraz dotację celowaną MNiSW (0420/2572/18IBE).

2. Charakterystyka pracy i uzyskanych wyników

Obszerny WSTĘP (liczący 50 stron) prezentuje, zgodnie z wymogami stawianymi pracom doktorskim, wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie prowadzonych badań. Podstawy merytoryczne ich podjęcia zostały przedstawione w logicznie uporządkowany sposób. Dobrze przemyślany schemat opisu obejmuje zamieszczone na początku informacje ogólne o znaczeniu mikroelementów dla wzrostu i rozwoju roślin, które w dalszej części były stopniowo rozbudowywane o dane szczegółowe na temat roli żelaza dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych oraz

mechanizmów regulujących zachowanie homeostazy tego mikroelementu. Włączono w tę część informacje o mechanizmach pobierania żelaza z podłoża, transportu w roślinie (dalekiego i krótkodystansowego, transbłonowego) z ich bardziej szczegółową charakterystyką w mitochondriach i plastydach, a także główne czynniki transkrypcyjne zaangażowane w regulację homeostazy żelaza. W ostatnim podrozdziale WSTĘPU przedstawiono szczegółowo aktualną wiedzę na temat transporterów z rodziny MCF, będących przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej. Tematyka jest bardzo obszerna, na uznanie zasługuje trafny dobór zagadnień, kluczowych dla uzasadnienia prowadzenia badań właśnie w tym zakresie. Taka sekwencja podanych we WSTĘPIE informacji stanowi znakomite przygotowanie czytelnika do przedstawienia celu pracy w kolejnym rozdziale (CEL PRACY). Cel badań, logicznie powiązany z nakreśloną wcześniej tematyką, został precyzyjnie określony. Jest nim identyfikacja i charakterystyka molekularna i funkcjonalna mitoferryn MIT1 i MIT2 oraz MFL1 u rzodkiewnika i ogórka siewnego.

Badania prowadzono w oparciu o szeroki zakres metod, trafnie dobranych do postawionego problemu, w tym bioinformatycznych, biologii molekularnej, biochemii, mikroskopii. Ich opis w oddzielnym rozdziale MATERIAŁY I METODY (36 stron) jest logiczny, zwięzły, uporządkowany według systemów uprawy roślin i stosowanych analiz. Przedstawia wystarczająco dokładnie sposób przeprowadzenia eksperymentów oraz prowadzenia analiz, poza kilkoma niejasnościami. Po pierwsze, nie mam pewności co do sposobu prowadzenia uprawy hydroponicznej: (i) nie podano liczby roślin przypadającej na każdy pojemnik – określenie „.. zachowując taką samą gęstość roślin..” (str. 68) jest mało precyzyjne, wiadomo, że zmienna liczba roślin przypadających na pojemnik na kolejnych etapach doświadczenia i w powtórzeniach biologicznych generuje zmiany w odpowiedzi; (ii) czy rośliny kielkujące w probówkach na pożywce zestalonej agarem były przenoszone do pojemników z pożywką płynną razem z agarem? Czy to nie generowało zakażeń? Dalej, zabrakło mi odnośnika literaturowego do transformacji roślin metodą floral dip – podanie tylko nazwy metody i tego, że wykonano tę procedurę poza Uniwersytetem Wrocławskim to za mało. Nie znalazłam także w pracy nazwy laboratorium wykonującego sekwencjonowanie (podano tylko, że było to laboratorium komercyjne). Co do terminologii – zamiast określenia „transformacja stała” (str. 101) powinien zostać użyty termin „transformacja stabilna”. Nie znalazłam także informacji o stężeniu antybiotyku stosowanego do selekcji roślin transgenicznych *A. thaliana*. Poza tym, otrzymanie 75% siewek odpornych na antybiotyk świadczy o pojedynczym insercie, a nie jak napisano na str. 102 rozprawy - o obecności pojedynczej kopii (w pojedynczym insercie może być kilka kopii ułożonych tandemowo).

Dobrze dobrana przez mgr Karolinę Małas metodyka i sposób zaplanowania serii ciekawych eksperymentów pozwoliły na uzyskanie nowych, oryginalnych wyników ważnych dla rozwoju wiedzy w zakresie regulacji homeostazy żelaza. Badania można podzielić na trzy powiązane ze sobą kierunki, w których stosowano odmienne metody, a które w całości prowadziły do charakterystyki mitoferryn MIT1 i MIT2 oraz MFL1 u rzodkiewnika i ogórka siewnego. Są to: (i) analizy bioinformatyczne; (ii) badania z zastosowaniem drożdży jako organizmu modelowego do określenia podstawowych funkcji badanych białek; (iii) testy prowadzone na roślinach uprawianych w warunkach hydroponicznych.

Stosując metody bioinformatyczne, Doktorantka prawidłowo zidentyfikowała sekwencje genów *MIT1*, *MIT2* i *MFL1* u rzodkiewnika i u ogórka, określiła strukturę genów oraz strukturę i topologię białek, wykonała analizy filogenetyczne i nadała odpowiednie nazwy.

W kolejnym etapie przygotowała kilka rodzajów konstruktów, używanych następnie do analiz lokalizacji białek w protoplastach *Arabidopsis* oraz w komórkach wybranych szczepów drożdży, do określenia specyficzności substratowej (metodą komplementacji) przy zastosowaniu kilku rodzajów mutantów drożdży z upośledzonym transportem Fe, Zn, Co, Cd (*Δmrs3mrs4*, *Δzrc1*, *Δcot1*, *Δycf1*, *Δccc1*). Wysoko oceniam poszerzenie charakterystyki białek MIT1 i MIT2 o określenie potencjalnej roli wybranych reszt aminokwasowych dla zachowania funkcji przenoszenia żelaza poprzez zastosowanie ukierunkowanej mutagenезy i testów opartych o heterologiczną ekspresję mutantów w szczepie *Δmrs3mrs4*.

W trzecim rodzaju badań, prowadzonych już na roślinach rzodkiewnika i ogórka uprawianych na pożywkach płynnych, dostarczono ważnych informacji charakteryzujących badane geny mitoferryn. Ekspresja genów *MIT* zachodziła we wszystkich organach i niezależnie od dostępności żelaza, jednak na różnym poziomie zależnie od genu i organizmu. Na str. 167 napisano, że taki wynik wskazuje „... na brak prawidłowości pomiędzy poziomem ekspresji genów *MIT* w korzeniach i organach nadziemnych u tych roślin”. Co Doktorantka ma na myśli pisząc o „braku prawidłowości”, czy o oczekiwaniu, że poziom ekspresji powinien u wszystkich genów *MIT* być wyższy w jednym organie a np. niższy w drugim? Moim zdaniem, otrzymany wynik wskazuje na zróżnicowanie funkcji badanych genów w analizowanych organach, co może np. wynikać z wielu czynników, także z odmiennej struktury promotorów. Proszę doktorantkę o komentarz.

Dodatkowo, jako badania wstępne, wyprowadzono transgeniczne rośliny rzodkiewnika z nadekspresją *AtMIT1*, *AtMIT2* i *AtMFL1* wykazując niewielki wpływ na odpowiedź roślin na deficyt Fe, a z drugiej strony zwiększenie wrażliwości na nadmiar żelaza. Dane te, ze wstępną oceną wzoru ekspresji wybranych genów endogennych zaangażowanych w gospodarkę żelazem w roślinie (*FER1*, *FER3*, *FER4*, *PIC1*, *NRAMP3*, *NRAMP4*, *AtAHA2*, *FRO8*) są znakomitą wstępem do dalszych badań nad funkcję fizjologiczną mitoferryn.

Do najciekawszych wyników zaliczam:

- (i) Uzupełnienie wyników badań nad określeniem lokalizacji subkomórkowej badanych białek dodatkowymi metodami. Doktorantka wykazała, że białka MIT1 i MIT2 u obu gatunków są zlokalizowane w mitochondriach a MFL1 w chloroplastach. Dla uwiarygodnienia wniosków, dodatkowo wykonała ekspresję przejściową w protoplastach rzodkiewnika konstruktów fuzyjnych *AtMFL1-92-pA7* i *CsMFL1-79-pA7* z GFP, w których wycięto sekwencje wskazane jako kierujące do chloroplastów. W tych doświadczeniach obecność białek fuzyjnych stwierdzono na terenie cytoplazmy.
- (ii) Testy komplementacji oparte o szczepy drożdży wykazały, że badane białka przenoszą żelazo. Tutaj dodatkowo na uwagę zasługuje dodatkowe, kompleksowe podejście doświadczalne (dwa rodzaje eksperymentów), użyte w celu weryfikacji kierunku transportu żelaza prowadzonego przez białka MIT1/2 z rzodkiewnika i ogórka, ustalonego w oparciu o wcześniejsze testy komplementacji. Są to: (a) porównanie stężenia żelaza w mitochondriach drożdży szczepu *Δmrs3mrs4* oraz z ekspresją genów kodujących badane białka; (b) test określający stężenie żelaza w cytoplazmie drożdży – oparty o heterologiczną ekspresję genu *GDO* (kodującego 1,2-dioksygenazę gentyzynianu katalizującą w cytoplazmie reakcję zależną od Fe²⁺, zastosowanego jako wskaźnik poziomu Fe w cytoplazmie) w mutancie *Δmrs3mrs4*. Potwierdzono, iż badane białka katalizują pobieranie Fe do mitochondriów.
- (iii) Identyfikacja w sekwencji białka reszt aminokwasowych kluczowych dla transportu żelaza dwóch histydyn (H53 i H110 dla *AtMIT1* oraz H51 i H108 dla *AtMIT2*).

Rozprawę kończy bardzo dobrze poprowadzona dyskusja (rozdział DYSKUSJA liczy 20 stron). Doktorantka kolejno porządkuje otrzymane wyniki od identyfikacji genów *MIT1*, *MIT2* oraz *MFL1* u rzodkiewnika i ogórka, poprzez regulację ekspresji, identyfikację kluczowych dla transportu reszt aminokwasowych do charakterystyki linii *A. thaliana* z nadekspresją *AtMIT1*, *AtMIT2* i *AtMFL1*. Dane literaturowe zostały właściwie dobrane, poprawnie merytorycznie, co czyni opis poruszanych w pracy zagadnień pełny, zrozumiały, jasno pokazujący co nowego wnoszą badania wykonywane w ramach pracy doktorskiej. Jednocześnie Autorka pokazuje problemy, które powinny zostać rozwiązane w kolejnych badaniach w przyszłości. Co ważne, przedstawiając swoje osiągnięcia na tle literatury, zachowała ostrożność w formułowaniu sądów, a rzetelne omówienie danych wskazuje na jej dużą wiedzę i umiejętność krytycznego spojrzenia na własne wyniki.

W pracy nie znalazłam żadnych poważnych niedociągnięć. Z obowiązku recenzenta, muszę zwrócić uwagę także na pewne niejasności.

- (1) Brakuje uzasadnienia dla stosowania różnych stężeń nadmiaru Fe w analizie wpływu stężenia metalu na wzór ekspresji badanych genów u dwóch gatunków roślin (0,2 mM i 0,5 mM dla

rzodkiewnika i 1 mM dla ogórka). Czy wykonywane były wstępne doświadczenia dla oceny różnic pomiędzy gatunkami doświadczalnymi we wrażliwości na nadmiar Fe? Brak informacji jak rosły i wyglądały rośliny rzodkiewnika i ogórka po 2-tygodniowej ekspozycji na deficyt i nadmiar żelaza.

- (2) Szkoda, że uzasadnienie dla wyboru reszt aminokwasowych testowanych pod kątem ich znaczenia dla transportu żelaza pojawia się dopiero w DYSKUSJI. W takiej kolejności podawania informacji odbiór wyników podczas czytania jest niepełny.

Szkoda też, że omawiając wyniki mutagenезы ukierunkowanej w DYSKUSJI Doktorantka nie przygotowała graficznych modeli porównawczych struktury transporterów AtMIT1 i AtMIT2 ze wskazaniem na podobieństwa / różnice w lokalizacji zidentyfikowanych kluczowych determinant funkcji transportowej. Jest to jeden z ciekawszych wątków rozprawy doktorskiej. Badań w tym zakresie na świecie nie jest wiele.

- (3) Transformacja została przeprowadzona w Institut de Biologie Intégrative de la Cellule w Gif-sur-Yvette we Francji skąd nasiona pokolenia T1 dostarczono doktorantce dla dalszych analiz. Brakuje jednak w pracy wyników z kolejnych etapów wyprowadzania roślin transgeniczných, co jest standardem w przypadku takich badań, w tym nie wiadomo: (i) ile linii T1 Doktorantka otrzymała; (ii) czy we wszystkich dostarczonych liniach określała obecność konstruktu i poziom ekspresji czy od razy wyprowadzała kolejne pokolenia; (iii) ile linii zostało poddanych analizie i w ilu liniach otrzymano wzór segregacji 3:1 (wskazujący na pojedyncze miejsce integracji) – powinno zostać załączona Tabela z danymi dla każdej linii.

- (4) Opis wzoru ekspresji genów *MIT1*, *MIT2* i *MFL1* u rzodkiewnika i ogórka w warunkach kontrolnych, w niedoborze i w nadmiarze żelaza, polega na słownym przedstawieniu tego co na widać na wykresie (wyżej, niżej, bez zmian). Doktorantka nie jest tu „merytorycznym przewodnikiem” - zabrakło (tylko w tych rozdziałach) krótkiego podsumowania, wskazującego na biologiczny sens wyników. Poza tym, komentarz w DYSKUSJI jest sprzeczny z opisem zamieszczonym w WYNIKACH – gdyż włącza do oceny istotności różnic czynnik 2-krotnej różnicy w poziomie ekspresji (a nie tylko istotność statystyczną). W efekcie – są to dwa znacznie różne opisy.

Wymienione powyżej niejasności nie umniejszają jednak ogromnej merytorycznej wartości poznawczej pracy. Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Karoliny Małas dostarcza nowych, oryginalnych, bardzo ciekawych danych o funkcji zidentyfikowanych i sklonowanych genów mitoferryn, kodujących transportery zaangażowane w pobieranie żelaza do mitochondriów i plastydów, jednocześnie wyznaczając kolejne, ciekawe kierunki badań. Przyczyniają się one do istotnego poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów molekularnych warunkujących zaopatrywanie w żelazo organelli kluczowych dla zachowania funkcji życiowych rośliny takich jak mitochondria i chloroplasty. W mojej opinii, cała praca wskazuje, iż Doktorantkę cechuje rzetelność naukowa i dociekliwość w odkrywaniu przebiegu procesów molekularnych w roślinach.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska prezentuje nowe, oryginalne, bardzo ciekawe dane, otrzymane w wyniku dobrze zaplanowanego podejścia eksperymentalnego. Doktorantka wykazała się bardzo szeroką wiedzą teoretyczną i umiejętnością jej wykorzystania dla celów badawczych, stawiania kolejnych pytań i poszukiwania odpowiedzi w oparciu o kolejne doświadczenia. W efekcie otrzymała wyniki, które są oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu, poszerzają nasze rozumienia procesów warunkujących homeostazę żelaza w roślinie.

Biorąc pod uwagę zaprezentowany oryginalny dorobek naukowy stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.; przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 ze zm.), wnioskuję do Rady Dyscypliny

Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Małas do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę dużą wartość naukową wyników (opisaną powyżej w mojej recenzji), otrzymanych dzięki identyfikacji ważnego problemu naukowego, trafnego doboru metod i starannego wykonania doświadczeń oraz krytycznej ocenie danych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz