

UNIwersytet Warszawski
WYDZIAŁ BIOLOGII



Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

Instytut Biologii Środowiskowej

ul. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 5543916, FAX: (+22) 5543910



Warszawa, 29.06.2023

Prof. dr hab. Elżbieta Romanowska
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Rola retroaktywnych sygnałów chloroplastowych w zależnej od miRNA odpowiedzi roślin na stress światlny „

wykonanej przez Panią mgr inż. Annę Barczak-Brzyzek w Instytucie Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Filipeckiego. Promotorem pomocniczym jest dr inż. Piotr Gawroński.

MikroRNA (miRNA) to grupa małych niekodujących cząsteczek RNA, powszechnie występujących w organizmach eukariotycznych, regulujących w postaci dojrzałej ekspresję wielu genów na poziomie potranskrypcyjnym. Za dojrzewanie roślinnych miRNA odpowiedzialna jest złożony układ białkowy tzw. kompleks mikroprocesora. Cząsteczki miRNA kodowane są przez geny MIR charakteryzujące się złożoną budową. Wykazano między innymi, że mogą one zawierać introny, których splicing stymuluje dojrzewanie miRNA. Geny dla miRNA mają różną lokalizację, mieszczą się w intronach i/lub egzonach genów strukturalnych lub w obszarach międzygenowych. Większość genów dla miRNA jest transkrybowana przez RNA polimerazę II (PolII), a produkt nazywany jest pri-miRNA, którego obróbka składa się z kilku etapów, przekształcany jest w pre-miRNA, który jest transportowany do cytoplazmy i poddawany procesom prowadzącym do powstania dojrzałej, funkcjonalnej cząsteczki miRNA. Aktywna postać miRNA wbudowywana jest w białkowy kompleks RISC, dzięki nim możliwa jest degradacja docelowego mRNA lub represja translacji (lub oba procesy). Te kluczowe cząsteczki wpływające na ekspresję genów są dynamicznie regulowane przez mechanizmy transkrypcyjne lub potranskrypcyjne wpływają na etapy obróbki lub stabilność pri i/lub dojrzałego miRNA. Cząsteczki mikroRNA biorą udział w regulacji wielu ważnych procesów metabolicznych oraz odgrywają kluczową rolę w sygnalizacji hormonalnej i rozwoju roślin; biorą

również udział w odpowiedzi komórek roślinnych na stres, zarówno biotyczny jak i abiotyczny zwiększając odporność roślin, a poziom ekspresji wybranych miRNA może być regulowany przez czynniki stresowe.

Chloroplasty są miejscem gdzie zachodzi fotosynteza i odbierane są sygnały rozwojowe i środowiskowe. Sygnały te przekazywane są do jądra komórkowego gdyż ok. 95% białek chloroplastowych kodowane jest przez jądro. Ponieważ kompleksy chloroplastowe kodowane są zarówno przez geny chloroplastowe jak i jądrowe, genetyczna informacja wymaga precyzyjnej koordynacji obu genomów. Zatem rozwój plastydów i ekspresja genów podlegają kontroli przez jądro. Jest również system sygnalizacji retroaktywnej pochodzący z chloroplastów. Są to sygnały rozwojowe pochodzące zarówno z proplastydów czy etioplastów jak też sygnały z dojrzałych chloroplastów w odpowiedzi na zmiany środowiskowe. Chloroplasty działają jako sensory środowiskowe i koordynują funkcje komórki uczestnicząc w odpowiedzi komórek na stres. Dotychczas opisano 4 główne ścieżki sygnałowe pochodzące od (1) reaktywnych form tlenu (ROS) i zmian w fotosyntetycznym transporcie elektronów (PET), (2) związane z syntezą tetrapiroli, (3) ekspresją genów chloroplastowych, (4) zaburzeniami metabolizmu chloroplastów (np. akumulacja β -CC).

Niewiele wiadomo o regulacji ekspresji, zawartości, stabilności, transporcie miRNA w warunkach stresu świetlnego. Lepsze zrozumienie udziału tych cząsteczek w odpowiedzi na stress jest bardzo ważne aby poznać mechanizmy odpowiedzialne za aklimatyzację i adaptację roślin do zmiennych warunków środowiska. Ponieważ wykazano w licznych pracach, że zarówno zawartość jak i stabilność miRNA zmienia się w warunkach stresu suszy, chłodu, obecności metali ciężkich, a ograniczone są informacje dotyczące stresu świetlnego, wskazuje to na konieczność wytyczenia nowego nurtu badań miRNA w regulacji genów zaangażowanych w stress świetlny.

Celem recenzowanej pracy była analiza zmian w ekspresji miRNA indukowanej krótkotrwałą ekspozycją na bardzo wysokie natężenia światła roślin *A. thaliana*. Jednocześnie poszukiwano, która z dróg sygnalizacji chloroplasty-jądro uczestniczy w przekazywaniu informacji w warunkach wysokiego natężenia światła.

Założenia pracy są poprawne, oparte na solidnej znajomości literatury przedmiotu, cel został precyzyjnie zdefiniowany, jest oryginalny i nowatorski. Podjęcie tego tematu przez doktorantkę można uznać więc za uzasadnione, zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i ewentualnej implikacji ich praktycznego wykorzystania w podniesieniu wydajności fotosyntetycznej roślin w warunkach wysokiego natężenia światła (HL). W opinii recenzentki temat rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek jest ważny, naukowo aktualny i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim. Napisana jest w języku angielskim, jest krótka, obejmuje 91 stron tekstu plus piśmiennictwo (18 stron) zawierające ponad 200 pozycji literatury oraz dokumentację wyników, na którą składa się 36 rycin oraz 3 dodatkowe tabele i rysunki.

Treść pracy podzielona została na 9 rozdziałów, dodatkowo dołączono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis dorobku naukowego oraz informację o finansowaniu badań. W cytowanych opublikowanych 2 pracach znajduje się część wyników niniejszej rozprawy.

We wstępie do rozprawy autorka przedstawia przegląd prac eksperymentalnych wprowadzających w badane zagadnienie i uzasadniających celowość podjętych badań. „Wstęp”, zamieszczony na 35 stronach stanowi zwięzły przegląd opublikowanych wyników badań dotyczących zagadnień poruszanych w pracy. Najwięcej miejsca Doktorantka poświęca biogenezie miRNA oraz przekazywaniu informacji o stresie na poziomie chloroplastu, komórki i całego organizmu. Bardzo mało miejsca natomiast poświęca roli badanego czynnika stresowego jakim jest zbyt wysokie natężenie światła. Uprzejmie proszę Doktorantkę by zechciała wyjaśnić jak rozumie proces fotoinhibicji i w jaki sposób można wyrażać warunki stresu świetlnego u roślin. Należy podkreślić, że zamieszczone we wstępie liczne schematy dobrze ilustrują omawiane zagadnienia i jest to dobrze napisana część pracy.

Większość wyników prezentowanych w rozprawie była już oceniana przez recenzentów w dwóch publikacjach. Niestety prace te nie zostały dołączone do rozprawy co by znacznie ułatwiło czytanie, gdyż autorka często odwołuje się do tych publikacji. Zwłaszcza dotyczy to części metodycznej pracy.

Rozdział „Materiał i metody”, przedstawiony został na dalszych 11 stronach i zawiera bardzo ograniczony opis stosowanych w pracy technik badawczych. Tego typu podejście nie jest słuszne w przypadku tradycyjnych rozpraw doktorskich gdzie oczekuje się szczegółowego opisu procedur np. różnorodne techniki hodowli roślin, natężenia światła, czas ekspozycji i inne wymagają precyzyjnych opisów. Schematy nieco ułatwiają czytanie rozprawy, ale do tej części pracy mam najwięcej uwag. Moje obawy budzi fakt, że mgr A. Barczak-Brzyżek do wykonywania różnorodnych eksperymentów wykorzystywała rośliny z różnych warunków wzrostu, nawet długość dnia ulegała zmianie. Istnieje niebezpieczeństwo, że rośliny z tych warunków mogły się różnić rozwojowo, a więc i metabolicznie i funkcjonalnie. Niestety w pracy brak informacji dlaczego stosowano rytm dobowy 8/16 godz., choć *A. thaliana* jest rośliną fakultatywną długiego dnia, ponadto moje obawy budzi stosowanie jako czynnika stresowego natężenia światła 1500 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) przez 2 godz. Takie natężenie światła powoduje nieodwracalne zmiany, nie ma szans na reaktywację zwłaszcza u *Arabidopsis*. Proszę o uzasadnienie wyboru takich warunków eksperymentu. Dodam, że pełne światło słoneczne to 2000 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. W pracy natężenie światła podawane jest w μE , jednostka jest nieprawidłowa, podajemy w μmol ach fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Uzyskana wartość Fv/Fm stosowana jako indikator stresu powinna być dużo niższa w HL niż przedstawiono na rys. 20B. Jeśli wartość Fv/Fm wynosi ok. 0.6 można oczekiwać, że następuje już zahamowanie pobierania CO₂ w więc fotosyntezy. Brak w M i M informacji jakie było natężenie impulsu światła wysycającego. Najlepiej identyfikować stan stresu świetlnego przez wykonanie równocześnie z Fo i Fm pomiarów składowych zmniejszania się fluorescencji, czyli: parametrów qP i NPQ. Wykonywanie cykli pomiarowych z zastosowaniem światła aktywnego o natężeniu: 60-1200 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ może dostarczyć informacji przy jakim natężeniu światła zaczyna się stres u *A. thaliana*. Zamiast oznaczeń transkryptów APX i CAT (dobre markery w innym kontekście badań) lepiej oznaczyć immunologicznie zawartość białka D1, najłatwiej uszkodzanego podczas nawet łagodnego stresu. Oczywiście powyższe informacje są dyskusyjne i są pewna sugestią recenzenta.

Konstrukcja rozdziału “Wyniki” bardzo dobra, umożliwia śledzenie kolejnych kroków badawczych i wskazuje na znakomite przygotowanie doktorantki. Podsumowania etapów badań ułatwiają śledzenie jak Autorka dochodziła do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania.

W początkowym etapie badano ekspresję miRNA w warunkach: LL → 2h HL → LL i uzyskano zmiany ekspresji 21 miRNA, kilka z nich przetestowano metodą TT-RTqPCR i do dalszych badań wybrano miR163 i miR840, których zawartość znacznie zwiększała się w HL. Następnym etapem badań było wyjaśnienie czy sygnał związany z HL jest przenoszony z liści do korzeni. W tym celu odcięto korzenie z rośliny z HL i uzyskany materiał poddano sekwencjonowaniu sRNA. Zidentyfikowano 22 miRNA regulowane przez HL, ale zmiany były niewielkie. Następnie zbadano ekspresję wybranych cząsteczek miRNA przy pomocy qRT-PCR. Potwierdzono wyniki dla 4 miRNA.

W celu wykazania czy sygnał indukujący zmiany w zawartości miRNA w korzeniach pochodzi z liści, odcięto korzenie z roślin z niskiego natężenia światła wzrostowego (LL) i umieszczono je w ciemności na 2 godz. i następnie korzenie te oświetlano 2 godz. HL. Analiza zawartości miRNA w korzeniach nie potwierdziła zmian obserwowanych dla liści. Opisany eksperyment moim zdaniem nie dostarczył oczekiwanej informacji gdyż odcięcie korzeni (stres silniejszy od zranienia) to kolejny stres poza HL. Ponadto jaki ma być efekt fizjologiczny oświetlania odciętych korzeni HL? Badania przeprowadzono 4 godz. po odcięciu korzeni. Uzyskany wynik i jego interpretacja nie jest dla mnie przekonująca. Proszę o wyjaśnienie.

Badania zawartości pri-mi163RNA i pri-mi840RNA wykazały, że nie korelują one z zawartością form dojrzałych co mogło wskazywać na inne niż transkrypcyjne mechanizmy regulacji. Pani mgr inż. A. Barczak-Brzyżek zastosowała przeciwciała na polimerazę II RNA i następnie badała ilość RNA PolII w obrębie genów Mir163 i Mir840 w LL i HL oraz po reaktywacji w LL. Nie stwierdzono różnic w testowanych genach miRNA w LL i HL. Doktorantce uzyskane wyniki zasugerowały badanie stabilności pri-miRNA. Badania przeprowadzono na 2 tygodniowych siewkach *Arabidopsis* z LL, które oświetlano 1 godz. HL (warunki te odbiegają od poprzednio opisanych eksperymentów). Zastosowanie kordycepiny, pozwoliło wykazać, że po HL wzrasta stabilność tylko pri-miRNA co wskazuje jednoznacznie na różną regulację biogenezy badanych cząstek. Badanie aktywności promotora MIR163 w fuzji z GUS potwierdziło efekt HL. Dlaczego w tym eksperymencie nie badano reaktywacji w LL?

W kolejnych badaniach Doktorantka wykazała, że białko HYL1, składnik kompleksu mikroprocesora roślinnego ma znaczenie tylko w biogenezie miR163, gdyż w mutancie *hyl1* zawartość pri-miR163 znacznie wzrasta, natomiast formy dojrzałej gwałtownie obniżała się. Zawartość pri-miR840 w mutancie nie zmieniała się w porównaniu z kontrolą, natomiast zawartość miR840 znacznie zwiększyła się. Wniosek, że powstawanie formy dojrzałej miR840 jest bardziej wydajne przy braku HYL1 wydaje się bardzo interesujący.

Innym aspektem prowadzonych badań było wykazanie że 3' - fosfoadenozyno 5'-fosforan (PAP) w warunkach HL moduluje zawartość pri-miRNA przez hamowanie egzorybonukleazy XRN. W tym celu wykorzystano mutanty *alx8* charakteryzujące się wysokim poziomem PAP. Oznaczono pri-miR163 i pri-miR840 oraz ekspresję form dojrzałych. Zmiany obserwowane dla badanych cząsteczek wskazują na różny udział PAP w ich procesowaniu.

Pomiary zawartości białka DCL1 wykonane techniką „Western blot” dla roślin z LL i HL, zdaniem Autorki wskazują na brak różnic. Pokazana na rys. 30 immunodetekcja nie jest najlepszej jakości i z tych danych trudno wyciągać konstruktywne wnioski. Nie znana jest aktywność mikroprocesora i jak słusznie stwierdza Doktorantka zawartość białka nie jest wyznacznikiem jego aktywności.

W ostatniej części opisanych w rozprawie doktorskiej badań Autorka poszukuje sygnału retrogradowego odpowiedzialnego za zawartość pri-i mikro RNA w warunkach działania silnego natężenia światła. Jednym z regulatorów sygnału sugerowanym przez innych badaczy może być stan redoks puli PQ. W celu weryfikacji hipotezy Doktorantka wykonała eksperymenty z użyciem dwóch inhibitorów transportu elektronów, DCMU odpowiedzialnego za utrzymanie puli PQ w stanie utlenionym poprzez zablokowanie transportu elektronów na poziomie Q_B w PSII oraz DBMIB hamującego kompleks cytochromowy w miejscu Q_o i utrzymującego zatem PQ w stanie zredukowanym. Uzyskane wyniki nie potwierdziły, że stan redoks puli PQ uczestniczy w sygnalingu retrogradowym. Wcześniej uważano, że stan redoks PQ wpływa na ekspresję genów chloroplastowych i jądrowych. Jednak eksperymenty ze zmianą natężenia/jakości światła i wykorzystaniem inhibitorów hamujących przepływ elektronów z PSII do PQ wykazały, że stan redoks puli PQ nie jest głównym źródłem informacji modulującym ekspresję genów jądrowych białek związanych z fotosyntezą i głównym sygnałem modyfikowanym przez zmienne oświetlenie. Wykazano natomiast, że stan redukcji PSI jest ważniejszy w regulacji ekspresji genów jądrowych przez światło niż stan redoks PQ.

Dlaczego inhibitory podawano przez spryskiwanie roślin? Istnieje niebezpieczeństwo, że penetracja obu inhibitorów do liścia różniła się. Podanie DCMU powoduje wzrost Fv/Fm.

Ponieważ nie stwierdzono zmian w zawartości pri-miRNA indukowanych przez stan redoks PQ, poszukiwano kolejne mediatory jakie uczestniczą w stresie HL związane z przekazywaniem informacji do jądra i powiązane z powstawaniem tlenu singletowego (1O_2). W tym eksperymencie rośliny rosły 2 tyg. na szalkach Petriego w ciągłym LL, następnie przenoszono je do ciemności na 12 godz. i ponownie oświetlano 2 godz. LL. Rośliny uzyskane były inne niż we wcześniejszych doświadczeniach. W eksperymentach tych wykorzystywano mutanty, w których kumuluje się tlen singletowy. Tlen singletowy ma czas życia 200 ns, jak rozumieć jego kumulację. Uprzejmie proszę o wyjaśnienie jakie inne formy ROS powstają w stresie świetlnym i gdzie są generowane. Wykorzystanie mutantów białek jądrowych EX1 związanych z tym sygnaliniem i badanie zawartości pri-miR163 i pri-miR840, nie potwierdziło sygnałów EX1- 1O_2 w regulacji miRNA indukowanej przez HL.

W warunkach stresowych β -karoten, który jest związany z fotoukładem II może ulegać oksydacyjnemu rozpadowi i wówczas powstaje m.i. β -ciklocitral (β -CC), który jest transportowany do jądra i indukuje geny jądrowe DRP i MBS1. W celu sprawdzenia hipotezy udziału β -CC w sygnałach retroaktywnych, do roślin podano β -CC (jakie stężenie?) i wykorzystując mutanty wymienionych genów badano ekspresję pri-miR163 i pri-miR840 oraz form dojrzałych. Stwierdzono akumulację badanych form pri-miRNA natomiast poziom form dojrzałych obniżał się. Wykazano ważną rolę tego szlaku sygnałowego w ekspresji miRNA w warunkach silnego natężenia światła; potwierdziły to również badania z wykorzystaniem mutantu *mbs1*. Eksperyment ten przeprowadzano na roślinach z długiego dnia rosnących przy natężeniu światła $250 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nasuwa się pytanie czy stężenie CO_2 w szczelnych pudłach z pleksi nie ograniczało fotosyntezy. Dlaczego stosowano rośliny z warunków innych niż większość prowadzonych hodowli. Proszę o komentarz.

Ten eksperyment wydaje się być przekonujący i biorąc pod uwagę fakt, że w warunkach stresu zawartość karotenoidów znacznie wzrasta (Chl/kar wynosi ok 10 w warunkach normalnych, w stresie ok. 4-5), ta ścieżka

sygnałowa wydaje się być bardzo realna, a karotenoidy przecież wygaszają zarówno tlen singletowy jak i chlorofil tripletowy i emitowane jest ciepło.

Ostatnia część pracy „Dyskusja” zawarta jest na 7 stronach i mimo małej objętości jest bardzo dobrze poprowadzona. Dyskusja została podzielona na części odpowiadające odpowiednim etapom pracy i podsumowuje osiągnięcia doktoranta w tle prowadzonych na świecie badań. Doktorantka doskonale poradziła sobie z interpretacją ogromnej ilości wyników. Rozdział ten jest dobrą analizą uzyskanych danych w kontekście prac innych badaczy pokazuje kolejne etapy dochodzenia do wytyczonych celów. Należy podkreślić, że doktorantka wykazała się znakomitymi umiejętnościami wykorzystywania różnych technik badawczych w swoich eksperymentach, przeprowadziła pracochłonne i czasochłonne badania wykonując ogromną pracę doświadczalną. Dyskusja w świetle danych często pośrednich i trudnych interpretacyjnie stanowiła dla Doktorantki duże wyzwanie. Zawiera ona ponadto propozycję prawdopodobnych funkcji miR163 w negatywnej regulacji proteazy DEG2 i udział w degradacji białka D1. Ta funkcja jest spekulatywna, wiadomo bowiem, że serynowa proteaza DEG2 zlokalizowana peryferycznie na błonach tylakoidowych od strony stromy uczestniczy w degradacji anteny Lhcb6 (CP24) fotoukładu II, nie oznacza to jednak, że jej funkcja może dotyczyć innych białek PSII i niewątpliwie jest to interesująca sugestia.

Wymienione powyżej uwagi mają głównie charakter redakcyjny i dyskusyjny, pozostają bez wpływu na merytoryczne walory pracy, którą oceniam wysoko.

Spośród wielu interesujących i naukowo ważnych wyników uzyskanych przez Panią mgr Barczak-Brzyżek na szczególne podkreślenie zdaniem recenzenta zasługują:

- Wykazanie, że HL powoduje zmiany w ekspresji miRNA oraz, że brak korelacji pomiędzy pri-miRNA a formą dojrzałą wynika z potranskrypcyjnej regulacji biogenezy miRNA związanej np. ze stabilnością pri-miRNAs.
- Wykazanie, że tlen singletowy powoduje akumulację pri-miRNA i że w ścieżce sygnałowej chloroplast-jądro bierze udział β -CC/MBS1.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek są wartościowe i nowatorskie, zastosowano w nich szerokie spektrum nowoczesnych technik doświadczalnych, są one zinterpretowane w oparciu o dobrą znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie biogenezy miRNA i jego udziału w ścieżkach retroaktywnych w warunkach stresu świetlnego. Rozprawa świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek do samodzielnej pracy badawczej. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668, z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Elżbieta Romanowska