

Dr hab. Prof. UAM Magdalena Krzesłowska  
Zakład Botaniki Ogólnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Ul. Umultowska 89  
61-614 Poznań

Poznań, dn. 30.03. 2015r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Suwińskiej  
pt. „Udział kalretikuliny w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej”**

Łagiewka pyłkowa to charakteryzująca się wzrostem szczytowym, najszybciej rosnąca komórka roślinna. Ponadto jako pojedyncza komórka jest ona doskonałym obiektem do badań mikroskopowych. Dlatego od wielu lat stanowi model w badaniach mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost szczytowy komórek roślinnych.

Mechanizmy wzrostu szczytowego nie są do końca wyjaśnione. Wiadomo, że zachodzi on jedynie w obrębie kopułki wzrostowej, na szczycie komórki i jest ściśle związany z sekrecją substancji budujących błonę i ścianę komórkową.

Transport pęcherzykowy u wszystkich komórek roślinnych zależy przede wszystkim od cytoszkieletu aktynowego i związanych z nim miozyn, głównie miozyny XI. Jednak coraz więcej prac wskazuje też na rolę mikrotubul w tym procesie, szczególnie zlokalizowanych na wierzchołku.

Niewątpliwie jednym z najistotniejszych czynników prawidłowego wzrostu elongacyjnego łagiewki pyłkowej jest charakterystyczny gradient  $Ca^{2+}$  w cytozolu. Najwyższe stężenie tych jonów występuje na szczycie łagiewki pyłkowej i spada począwszy od strefy podwierzchołkowej. Jakie mechanizmy wewnątrzkomórkowe są odpowiedzialne za utrzymanie właściwego gradientu  $Ca^{2+}$  to problem nie w pełni wyjaśniony do dziś. Utrzymanie właściwego poziomu jonów Ca w cytozolu, a także ich uwalnianie, np. w przypadku uruchomienia szlaków sygnalizacyjnych, zależy m.in. od funkcjonowania kanałów wapniowych oraz białek, wiążących jony wapnia. Jednym z takich białek jest obecna w endoplazmatycznym retikulum (ER) kalretikulina (CRT), główny bohater ocenianej rozprawy doktorskiej. Udział CRT we wzroście łagiewki pyłkowej, problem którego rozwiązania podjęła się pani mgr Anna Suwińska w swojej rozprawie doktorskiej, to problem niezwykle ciekawy i nowy poznawczo.

**Ocena formalna**

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 124 strony oraz 18 tablic z mikrografiami ilustrującymi otrzymane wyniki. Posiada klasyczny układ obejmujący streszczenie, wstęp, wyodrębniony rozdział zatytułowany założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki,

dyskusja, wnioski końcowe oraz spis cytowanych pozycji literaturowych (ponad 200). Proporcja rozdziałów jest należycie zachowana.

Wstęp pracy stanowi przegląd literatury z uwzględnieniem najnowszych prac (również z 2015 roku) i podejmuje takie zagadnienia jak budowa i wzrost łagiewki pyłkowej ze szczególnym uwzględnieniem dwóch znanych, kluczowych dla tego procesu czynników jakimi jest funkcjonowanie cytoszkieletu aktynowego oraz gradient  $Ca^{2+}$ . Rozdział ten zawiera także charakterystykę kalretikuliny, jej strukturę, występowanie oraz znane funkcje, a także charakterystykę kodujących ją genów. Warto byłoby dodać w tym rozdziale więcej informacji na temat cytoszkieletu tubulinowego, gdyż jak wiadomo oba rodzaje cytoszkieletu współdziałają ze sobą. Dane literaturowe wskazują ponadto, że cytoszkielet tubulinowy jest odpowiedzialny za powolny transport organelli w łagiewce, podczas gdy filamenty aktynowe za transport szybki. Co więcej mikrotubule obecne na wierzchołku są najprawdopodobniej odpowiedzialne także za internalizację pęcherzyków transportujących na szczycie łagiewki i ich powolną egzocytozę (*ang.* slow-exocytosis).

Cele pracy i zadania badawcze zostały wyodrębnione jako osobny rozdział co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z nimi. W rozdziale tym przedstawiono też nadrzędną hipotezę badawczą, która brzmi: „kalretikulina jest istotnym elementem mechanizmu wewnątrzkomórkowego utrzymującym homeostazę  $Ca^{2+}$  rosnącej łagiewki pyłkowej”.

Rozdział „Materiał i Metody” zawiera przegląd metod i technik stosowanych w badaniach.

Rozdział „Wyniki” podzielono na 3 główne części: pierwsza dotyczy charakterystyki wzrostu łagiewek pyłkowych *Petunia* w warunkach *in vitro*, druga - wzrostu łagiewek z wyciszoną ekspresją genu kodującego kalretikulinę *PhCRT*, trzecia - to badania obecności *PhCRT* mRNA, *CRT* oraz wolnych jonów wapnia w łagiewkach rosnących *in planta*. Wyniki Doktorantka zilustrowała bardzo dobrej jakości dokumentacją zdjęciową obejmującą 18 tablic.

Rozdział dyskusja pokazuje łagiewkę pyłkową jako doskonały model do badania mechanizmów związanych ze wzrostem szczytowym komórki, jak również do badań mikroskopowych. Ponadto w rozdziale tym znajdujemy omówienie i interpretację uzyskanych wyników.

### **Ocena wartości merytorycznej pracy**

Na wstępie chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam koncepcję pracy, sposób weryfikacji założonej hipotezy badawczej, a także dobór stosowanych metod i technik badawczych.

Do szczególnie cennych wyników zaliczam pokazanie efektów wyciszenia ekspresji genu *PhCRT* (głównie *PhCRT1*), które obejmowały obniżenie poziomu i zmianę rozmieszczenia *PhCRT* mRNA, kalretikuliny, dezintegrację cytoszkieletu aktynowego, zaburzenia ultrastruktury i strefowości budowy łagiewki - składające się w efekcie na zaburzenia jej wzrostu. Wyniki tych badań są nowatorskie i w jasny sposób pokazują istotną rolę jaką pełni kalretikulina w procesie elongacji łagiewki pyłkowej.

Bardzo wartościowe w mojej ocenie jest także pokazanie kolokalizacji transkryptów *PhCRT* mRNA i *Ph18S* RNA oraz kalretikuliny dzięki czemu ustalono rejony, w których

przebiegała jej synteza. Były to: aktywna apertura kielkujących ziaren pyłkowych oraz strefa podwierzchołkowa wydłużających się łagiewek. Co bardzo ważne - nie wykazano obecności tych substancji na wierzchołku - gdzie poziom  $Ca^{2+}$  jest najwyższy.

Do cennych wyników pracy zaliczam także pokazanie lokalizacji *PhCRT* mRNA oraz CRT w łagiewkach pyłkowych *in planta*. Wiadomo bowiem, że wzrost łagiewki zależy nie tylko od mechanizmów wewnątrzkomórkowych, ale także od sygnałów pochodzących ze słupka. Badania wzrostu łagiewki *in vitro* są prowadzone powszechnie przez wiele zespołów. Trzeba pamiętać jednak, że jest to środowisko sztuczne dla wzrostu łagiewek. Niewątpliwym plusem prac Doktorantki było sprawdzenie prawidłowości wzrostu i organizacji cytoplazmy łagiewki w stosowanych warunkach *in vitro*.

Ponadto chciałabym wyróżnić rozdział „Dyskusja” interpretujący otrzymane wyniki w sposób właściwy, dojrzały i w oparciu o najnowszą literaturę przedmiotu (włączając prace z 2015r). Pokazano w tym rozdziale, m.in. rolę jaką najprawdopodobniej pełni kalretikulina w mechanizmie wzrostu łagiewki pyłkowej. Jak napisała Doktorantka funkcja kalretikuliny polega przede wszystkim na utrzymaniu odpowiedniego poziomu  $Ca^{2+}$ , który ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania cytoszkieletu aktynowego, a tym samym szlaku sekrecyjnego, od którego zależy wzrost komórki. W podsumowaniu w sposób jasny i czytelny przedstawiono wyniki i wnioski płynące z przeprowadzonych doświadczeń. Dodatkowo zilustrowano graficznie możliwy udział kalretikuliny w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej u *Petunia*.

Jak w każdej pracy tak i tutaj znalazły się też pewne uchybienia.

W rozdziale „Wstęp” s. 11. Doktorantka napisała: „u większości roślin okrytonasiennych pierwotna ściana komórkowa łagiewki pyłkowej jest zbudowana z pektyn i występuje na całej długości komórki od podstawy do ekstremalnego wierzchołka. W regionie podwierzchołkowym syntezowana jest warstwa ściany zbudowana głównie z celulozy i hemicelulozy oraz najbardziej wewnętrzna wtórna ściana kalozowa”.

Chciałabym zwrócić uwagę, że w szczytowym regionie łagiewki oprócz pektyn ściana komórkowa zawiera także celulozę, ale o niskim stopniu krystalizacji oraz białka arabinogalaktanowe, które pełnią funkcję receptorów sygnałów zewnątrzkomórkowych. W regionie podwierzchołkowym natomiast ściana komórki łagiewki oprócz celulozy i hemicelulozy, o których napisała Doktorantka, zawiera znaczną ilość substancji pektynowych. Niemniej są to odmienne epitopy niż na wierzchołku (na wierzchołku bowiem występują pektyny silnie zestryfikowane, nie usztywniające ściany i umożliwiające wzrost, podczas gdy w strefie podwierzchołkowej i trzonowej pojawiają się pektyny o niskim stopniu estryfikacji przyłączające jony wapnia i usztywniające ścianę).

Ponadto odłożenie się warstwy kalozy nie zmienia charakteru ściany komórkowej z pierwotnego na wtórny.

Pod koniec s. 11. „Wstępu” Doktorantka zmieniła zdanie i napisała, że „ściana podwierzchołkowych stref łagiewki pyłkowej jest wielowarstwowa, zbudowana z pektyn, celulozy, hemicelulozy i kalozy”. Takie sformułowanie sugeruje, że ściana ta zbudowana była z czterech warstw pektynowej, celulozowej, hemicelulozowej i kalozowej, co oczywiście nie ma miejsca i jak przypuszczam Doktorantka nie to miała na myśli.

W rozdziale „Materiał i Metody” nie znalazłam informacji na temat sposobu ilościowego oznaczenia intensywności fluorescencji sygnału hybrydyzacji *PhCRT* mRNA-sonda - przeciwciało. Nie znalazłam także informacji o tym skąd pochodziło przeciwciało identyfikujące kalretikulinę (było dostępne komercyjnie, czy było prezentem od prof. Napiera'a?).

W rozdziale „Wyniki” na fot. 5., która przedstawia strefową organizację protoplastu łagiewki pyłkowej zamiast schematu bardziej eleganckie byłoby zamieszczenie mikrografii w małym powiększeniu pokazującej całą komórkę lub znaczący jej fragment. Podobna uwaga dotyczy fot. 8, gdzie mamy pokazane bardzo ładne powiększenia ER i GA, ale brak małych powiększeń pokazujących ich lokalizację i miejsca nagromadzenia w łagiewce. Szkoda tym bardziej, że w innym miejscu Autorka, pokazując zaburzenia ultrastruktury łagiewek z wyciszoną ekspresją genu *PhCRT*, dla porównania, wprowadza do tablic mniejsze powiększenia komórki łagiewki kontrolnej. Również na fot. 5 C i E – mam wątpliwości co do charakteru struktur oznaczonych jako endoplazmatyczne retikulum (er).

Na str. 78 autorka napisała: „Obecność CRT w strefie jasnej łagiewek pyłkowych siRNA było najpoważniejszym obserwowanym artefaktem” - przyznaję, że nie rozumiem dlaczego CRT obecna w strefie wierzchołkowej łagiewki Doktorantka uznała za artefakt. Mam też kilka uwag terminologicznych, z których większość zaznaczyłam bezpośrednio w pracy. Dla przykładu:


- a. Autorka używa określenia „aparaty Golgiego” w odniesieniu do każdego diktiosomu, podczas gdy roślinny aparat Golgiego to wszystkie diktiosomy danej komórki. Zatem termin „aparaty golgiego” jest niepoprawny i w przyszłych pracach powinien zostać zastąpiony przez termin „diktiosomy”, ewentualnie „struktury Golgiego” – termin bardziej zbliżony do angielskiego Golgi Bodies.
- b. Enzym *ang. pectin methylesterase* (PME) ma polską nazwę metyloesteraza pektynianowa, a nie jak napisała Autorka pektyn metyl-estaraża, co jest kalką z j. angielskiego.

Na koniec chciałabym przedstawić pewną sugestię. Zdaję sobie sprawę z tego, że cykl doświadczeń składających się na rozprawę doktorską trzeba w pewnym momencie zakończyć, mimo iż pojawiają się nowe, ciekawe problemy do rozwiązania. Myślę, że jednym z takich zagadnień byłoby pokazanie gradientu  $Ca^{2+}$  z wykorzystaniem dostępnych fluorochromów, w łagiewkach z wyciszoną ekspresją *PhCRT*, aby przekonać się, m.in. czy i w jaki sposób gradient ten jest zaburzony. Ponieważ obiektem moich badań jest komórka apikalna splećka mchu tym bardziej jestem ciekawa, czy gradient  $Ca^{2+}$  w łagiewkach z wyciszoną ekspresją *PhCRT* będzie silnie zmieniony.

### Wniosek końcowy

Podsumowując, chcę podkreślić, że oceniam wysoko wartość naukową przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Anny Suwińskiej. Uważam, że jest bardzo interesującym i doskonale udokumentowanym opracowaniem, a wyniki badań stanowią kolejny i ważny krok w wyjaśnieniu mechanizmów odpowiedzialnych za elongację komórek

rosnących szczytowo. Potwierdzeniem wartości otrzymanych wyników jest niewątpliwie opublikowanie ich części w 2014 i 2015 r. w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej jakim jest *Planta*. Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Suwińskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami, w brzmieniu ustalonym Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. (Dz. U. nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie pani mgr Anny Suwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto ze względu na nowatorstwo badanego zagadnienia oraz wysoką wartość naukową otrzymanych wyników, a zwłaszcza za wykazanie efektów spowodowanych wyciszeniem genu *PhCRT* na wzrost łagiewki pyłkowej, wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

  
Magdalena Krzesłowska