

Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska  
Katedra Biologii Komórki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski  
ul. Jagiellońska 28  
40-032 Katowice

Katowice, 10.10.2015

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Łukasza Baranowskiego**

**pt.: „Wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy w syncytiach roślin porażonych  
nicieniami”**

Praca doktorska mgr Łukasza Baranowskiego została wykonana w Katedrze Botaniki Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod promotorstwem prof. dr hab. Władysława Golinowskiego. Wymienione jest również nazwisko dr Mirosława Sobczaka, ale nie wskazano w jakim charakterze występuje dr Sobczak w niniejszym przewodzie doktorskim.

Badania, których wyniki zamieszczono w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej dotyczą analizy zmian na poziomie ultrastrukturalnym i molekularnym komórek gospodarza towarzyszących powstawaniu i funkcjonowaniu syncytium rozwijającego się w wyniku ataku pasożytniczych nicieni.

Podjmując te badania Doktorant znalazł się w głównym nurcie badań nad procesami kontrolującymi rozwój i funkcjonowanie syncytium w wyniku porażenia roślin nicieniami. Równocześnie, jako że analiza wspomnianych zjawisk dotyczy badań na modelowej roślinie jaką jest *A. thaliana* w związku z funkcjonowaniem syncytiów, rozprawa doktorska jest logiczną kontynuacją badań nad tymi problemami, które prowadzone są od wielu lat przez zespół Katedry Botaniki SGGW, kierowanego przez wiele lat przez prof. dr hab. Władysława Golinowskiego.

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Baranowskiego składa się z 2 części. W I części, liczącej 98 stron wydruku komputerowego, autor zamieścił streszczenie w języku polskim i angielskim, krótki wstęp, przegląd literatury, cel pracy, opis metodyki, opis uzyskanych wyników, dyskusję, podsumowanie wyników i wnioski oraz spis literatury. W drugiej części zamieszczono dokumentację fotograficzną wyników, na którą składa się 49 tablic.

Praca napisana jest poprawnie, a układ jest typowy dla prac eksperymentalnych. Treść pracy odpowiada tytułowi rozprawy.

Przegląd literatury obejmuje 45 stron wydruku komputerowego. Omówiono w nim takie zagadnienia jak: pozycja systematyczna rzodkiewnika pospolitego, cechy jakie



zdecydowały o wyborze tej rośliny jako modelowej w badaniach, nie tylko eksperymentalnych. Przedstawiono opis cyklu życiowego nicieni cystowych, indukcję i rozwój syncytium oraz opis wydzielanych przez nicienie substancji wpływających na związek gospodarz-pasożyt. W przeglądzie literatury zamieszczono także informacje o odpowiedzi rośliny na atak nicieni na poziomie fizjologicznym i molekularnym. Przedstawiono również obszernie problematykę związaną z transportem pęcherzykowym zachodzącym w komórce roślinnej opisując ER, AG, system wakuol, wczesny i późny szlak wydzielniczy oraz endo- i egzocytozę. Tak przygotowany przegląd literatury jest poprawny chociaż zabrakło mi w nim opisu stanu wiedzy na temat genów, które były analizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej, takich jak *VAB1*, *VAB2*, *VAB3*,  $\gamma$ -*TIP* czy *Sec21p*.

Cel pracy liczy 1 stronę wydruku komputerowego i Doktorant pisze w nim, że „Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza interakcji pomiędzy mechanizmami indukcji i rozwoju syncytium, a elementami transportu pęcherzykowego w korzeniach rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) porażonego przez mątwika burakowego (*Heterodera schachtii*).” Moja uwaga do tak sformułowanego celu pracy odnosi się do określenia „mechanizmy indukcji syncytium” gdyż takie określenie sugeruje, że mechanizmy są różne. Chyba nie taki był w istocie cel badań. Postanowiono przeanalizować zmiany w systemie błon wewnętrznych ze szczególnym uwzględnieniem tonoplastu w trakcie tworzenia syncytium, czyli zmian jakie dokonują się w komórce gospodarza pod wpływem pasożyta na poziomie ultrastrukturalnym i molekularnym. Na podkreślenie zasługuje fakt sformułowania jasno zadań badawczych, których realizacja pozwoliła na uzyskanie odpowiedzi na stawiane w rozprawie pytania.

W rozdziale „Materiał i metody” (liczącym 14 stron wydruku komputerowego) Doktorant w pierwszym rzędzie opisał materiał badawczy, procedury prowadzące do uzyskania roślin i warunki ich wzrostu oraz warunki otrzymywania larw stadium inwazyjnego mątwika burakowego i proces inokulacji. Przedstawiono również metodykę przygotowania materiału do badań strukturalnych i ultrastrukturalnych oraz immunohistochemicznych na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego. Wyczerpująco zostały przedstawione wszystkie analizy histochemiczne i biochemiczne oraz molekularne, które wykonano w ramach niniejszej rozprawy. Należy podkreślić, że zastosowana metodyka była różnorodna jako że obejmowała analizę histologiczną, ultrastrukturalną, immunohistochemiczną i badania molekularne. Zabrakło jednak kilku istotnych informacji przede wszystkim dotyczących czasu traktowania na przykład BFA; kryteria określania toksycznego efektu BFA na komórkę; liczbę dokonanych analiz mikroskopowych (zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego jak



i elektronowego) i wskazania czy prezentowane w rozdziale „Wyniki” zdjęcia są na przykład reprezentatywne dla uzyskanych wyników, czy też zostały dobrane w inny sposób.

Wyniki badań przedstawiono w kolejnym rozdziale obejmującym 8 stron maszynopisu i 49 plansz (II Część Rozprawy) w sposób bardzo zwięzły, a czasami nawet zbyt lakonicznie. W celu uzyskania odpowiedzi na stawiane w pracy badawczej pytania wykorzystano mikroskopię świetlną (jasne pole i fluorescencja oraz mikroskopia konfokalna), transmisyjną mikroskopię elektronową, techniki histologiczne i immunohistologiczne oraz metody molekularne.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantowi na uzyskanie szeregu interesujących i nowatorskich wyników. Przeanalizowano zmiany histologiczne i ultrastrukturalne komórek syncytium w różnym czasie od zakażenia. Wykazano, że rozwój syncytium zasadza się na zmianach apoplastu i symplastu rośliny gospodarza, co prowadzi do powiększania syncytium. Opisano również zmiany ultrastrukturalne dotyczące zmian wakuomu komórek, organizacji ER, liczby mitochondriów czy morfologii jąder komórkowych.

W celu sprawdzenia czy i w jaki sposób dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących białka związane z transportem pęcherzykowym, takich jak *VAB1*, *VAB2*, *VAB3*, *γ-TIP* czy *Sec21p* wykonano analizy molekularne i pokazano, że istnieją zmiany czasowo-przestrzenne w ekspresji analizowanych genów. Kolejny, badany w rozprawie aspekt dotyczył lokalizacji białek, produktów wspomnianych wyżej genów, na poziomie tkankowym i komórkowym, w tym ultrastrukturalnym. Przeprowadzone analizy pokazały, że zarówno w korzeniach nieporażonych jak i zainfekowanych występowanie tych białek skorelowane jest z przedziałami błonowymi. W dalszej kolejności Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczące czasowo-przestrzennej lokalizacji przedziałów komórkowych o wysokim pH, w celu zweryfikowania hipotezy o występowaniu przedziału litycznego w syncytium. Kolejna grupa wyników dotyczy analizy ultrastruktury komórek syncytium w warunkach zaburzonego transportu pęcherzykowego poprzez zastosowanie BFA, i badania te wykazały zmiany jakościowo-ilościowe organelli komórkowych pod wpływem zastosowanego inhibitora. Ostatni problem opisany w wynikach dotyczył analizy wzajemnej lokalizacji białka tonoplastowego i cytoszkieletu aktynowego w celu odpowiedzi na pytanie czy istnieje zależność transportu pęcherzykowego od cytoszkieletu.

Podsumowując przedstawione wyniki, za ważne ustalenia pracy uważam:

- szczegółowy opis ultrastruktury komórek syncytium w aspekcie czasowym,
- czasowe prześledzenie ekspresji genów zaangażowanych w syntezę białek wakuolarnych,



- wskazanie na udział pęcherzyków typu COPI w transporcie pęcherzykowym zachodzącym w syncytiach.

Dyskusja liczy 14 stron wydruku komputerowego. Rozdział ten, podobnie jak poprzednie, podzielono na czytelne podrozdziały, co porządkuje rozległy materiał i systematyzuje dyskutowane aspekty naukowe. Uzyskane przez Doktoranta wyniki dotyczące ultrastruktury, indukcji i rozwoju syncytium przedyskutowano obszernie, głównie w oparciu o prace opublikowane przez pracowników Katedry Botaniki (zabrakło mi cytowania prac opublikowanych po 2011 roku, a jest ich sporo i dotyczą podobnych zagadnień). Obszernie zostały przedyskutowane aspekty wakuolarnego pochodzenia pęcherzyków w syncytium ze szczególnym uwzględnieniem białek charakterystycznych dla przedziału wakuolarnego a obecnych w pęcherzykach syncytium. W sposób poprawny przedyskutowano również udział transportu pęcherzykowego i cytoszkieletu aktynowego w funkcjonowaniu syncytium na różnych etapach jego rozwoju.

Doktorant musi jeszcze kształcić umiejętność pisania tego typu rozdziałów, jako że czasami trudno zorientować się czy pisze o swoich wynikach, czy też wynikach znanych z literatury. Uważam za zbędne przypominanie budowy anatomicznej korzenia w rozdziale „Dyskusja”, szczególnie rzodkiewnika pospolitego, tak dobrze opisanego w literaturze i podręcznikach.

„Podsumowanie i wnioski” to rozdział, w którym moim zdaniem powinno być rozróżnienie na: podsumowanie wyników i wnioski, czego jednak nie znalazłam. W rozdziale tym przedstawiono 9 punktów, które ponieważ nie są nazwane, wydają się być podsumowaniem uzyskanych wyników, a jeśli tak to zabrakło wniosków. Niemniej jednak punkty są poprawnie sformułowane, chociaż punkt 3 i 7 są prawie identyczne jeśli chodzi o udział pęcherzyków COPI w analizowanych procesach. Mimo niedociągnięć formalnych tego rozdziału mogę stwierdzić, że rozdział zawiera zebrane w zwartej formie uzyskane wyniki, które są uzasadnione i jasno sformułowane. Zabrakło mi w podsumowaniu informacji odnośnie 1 i 4 szczegółowego zadania badawczego sformułowanych w rozdziale „Cele pracy”, a odnoszących się do - cytuję: „1. Analiza rozwoju syncytium oraz szlaków transportu pęcherzykowego w elementach syncytium; 4. Opis anatomii i ultrastruktury syncytiów rozwijających się w korzeniach poddanych działaniu inhibitora transportu pęcherzykowego (brefeldyny A)”. Czasami zaprezentowane uogólnienia są moim zdaniem zbyt daleko idące, co w niczym nie umniejsza wartości tego rozdziału rozprawy doktorskiej.



Wykaz cytowanej literatury obejmuje 158 pozycji, które Autor nazywa „publikacjami tradycyjnymi” i 5 adresów stron internetowych. Wśród pozycji literaturowych 12 razy stwierdziłam błędy polegające, albo na umieszczeniu publikacji w spisie, ale jej braku w tekście, albo braku wpisania roku publikacji, albo rozbieżnościach w roku danej publikacji w spisie literatury i tekście (wszystkie błędy zaznaczyłam w wersji elektronicznej pracy). Literatura w znakomitej większości jest anglojęzyczna i dobrana poprawnie. Zalecałabym jednak, szczególnie w odniesieniu do problemów związanych z transportem pęcherzykowym retrogradowym i anterogradowym, bardziej aktualne pozycje – dostępne nawet w języku polskim (Basińska A. Krzesłowska M., Woźny A., 2012, Kosmos, tom 61: 363-370). Wykaz piśmiennictwa świadczy o tym, że Autor orientuje się w zakresie problematyki badawczej będącej obiektem jego zainteresowań i potrafi dobrze je wykorzystać do interpretacji własnych wyników.

W trakcie czytania pracy nasunęło mi się kilka problemów do dyskusji i proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do nich:

- co oznacza określenie „proliferaacja i kondensacja cytoplazmy”?
- proszę wyjaśnić zdanie: „Pojedyncze, rozproszone włókna cytoszkieletu, zlokalizowane w elementach syncytium, mogą świadczyć o depolimeryzacji cytoszkieletu aktywnego w czasie indukcji i rozwoju syncytium”;
- objaśnić ze szczegółami proces endo- i egzocytozy oraz transport retrogradowy i anterogradowy;
- objaśnić zdanie „Białka na drodze endocytozy, transportowane są przez przedziały endosomalne charakteryzujące się dużą dynamiką”; proszę wymienić białka wprowadzane do komórek roślinnych na drodze endocytozy; co oznacza „duża dynamika”;
- przedstawić różnicę między endosomami wczesnymi i późnymi;
- omówić różnicę między aparatem Golgiego komórek zwierzęcych i roślinnych;
- podać definicję gradientu i wskazać czy uprawnione w pracy było określenie, że „pompy protonowe zapewniają tonoplastowi gradient pH”;
- podać szczegóły stwierdzenia dotyczącego roli BFA: „Bierze ona także udział w modyfikacjach szlaków syntezy lipidów, O- i N-glikanów”;
- jakie były wykonywane kontrole dla reakcji immunohistologicznych; czy były wykonywane zarówno kontrole negatywne jak i pozytywne? Czy skrawki kontrolne pochodziły z materiału z najbliższego sąsiedztwa skrawków nie będących kontrolą?
- jakie kryterium zastosowano do odróżniania pęcherzyków i drobnych wakuol?
- tablica 23, fot. B – jaka jest średnica złota koloidalnego?
- jaką liczbę korzeni przebadano w poszczególnych eksperymentach?



-proszę podać szczegóły inkubacji materiału z BFA i detekcji cytoszkieletu aktywnego;

-proszę podać sposoby powiększania się liczby organelli komórkowych,

-proszę objaśnić poniższe stwierdzenie, szczególnie fragment napisany kursywą; proszę uwzględnić poziom molekularny; „We wczesnych etapach rozwoju syncytium ściana komórkowa pomiędzy komórką inicjalną, a otaczającymi ją komórkami zostaje *rozpuszczona poprzez poszerzenie plasmodesm*”.

-proszę o informacje na temat genów *VAB1*, *VAB2* i *VAB3*, których ekspresję analizowano w niniejszej rozprawie doktorskiej, ale nic o nich nie napisano na przykład we wstępie rozprawy; poproszę również o informacje o stosowanej od 2002 roku nomenklaturze genów kodujących poszczególne podjednostki V-ATPazy; przy okazji proszę o ustosunkowanie się do znanego faktu, że poziom ekspresji poszczególnych izoform w obrębie podjednostek różni się, wskazując na specyfikę regulacji na poziomie organowym czy tkankowym; wiadomo na przykład, że VHA-E1 jest dominująca w pędach, VHA-E2 – w ziarnach pyłku i kwiatach, zaś VHA-E3 w korzeniach – w kontekście uzyskanych w niniejszej pracy wyników.

Znalazłam pewne braki w informacjach podanych w metodyce oraz drobne błędy stylistyczne, interpunkcyjne i edytorskie, z których niektóre wymieniam poniżej:

-uchylenia interpunkcyjne, zaznaczyłam w wersji elektronicznej dostarczonej rozprawy doktorskiej

-zalecam ponowny przegląd pozycji literaturowych, gdyż w kilku przypadkach znalazłam nieścisłości, które również zaznaczyłam w tekście rozprawy

-w rozdziale Materiał i metody, Doktorant często wskazuje rozdział „3.1.1...” co jest pomyłką – nie ma takiego rozdziału.

-wydaje mi się, że ciągle obowiązująca zasada opisu linii transgenicznych zakłada użycie kursywy przy pisaniu ich nazw;

-opis tablicy 1 brzmi: „Hodowla larw stadium J2 w sterylnych warunkach in vitro” – tymczasem Fot. 1 z tej tablicy pokazuje hodowaną w warunkach in vitro *A. thaliana*, zaś fot. B pokazuje larwy *H. schachtii*;

-brak wyjaśnienia skrótu „Ne” w tablicach

-przy przygotowywaniu wyników do druku należy wykonać większe powiększenia elektronogramów, gdyż w tej chwili na przykład ciała paramuralne (Tablica 3) nie są widoczne;

-tablica 6 – na fot. A widoczne są czarne „kropki” z białymi punkcikami w środku – co to takiego?



-na fotografiach często stosowano gwiazdkę dla zaznaczenia jakiegoś elementu ultrastruktury – zwracam uwagę, że właściwie na każdej fotografii gwiazdka jest niepełna;

-tablica 7, fot. A-co wskazuje strzałka?

-tab.7, fot. B – co wskazują małe białe gwiazdki

-tablica 11 – objaśnić „korzeń nieporażony 1 i 2”; *18S RNA*, dlaczego w wynikach nie napisano nic na ten temat; a w materiałach i metodach nie wspomniano, że próbki pobierano również z liści; jeśli tak to jakich - rozeta?

Pragnę zwrócić uwagę Doktorantowi, że w komórce roślinnej jest jeden aparat Golgiego, składający się z określonej liczby diktiosomów (zależnie od gatunku, tkanki czy stanu rozwojowego lub funkcjonalnego komórki), dlatego używanie liczby mnogiej w opisie tej organelli nie jest właściwe, a poprawne określenie to „diktiosomy AG”.

Zwracam również uwagę na stosowaną terminologię: na przykład „protoplast” – zgodnie z definicją jest to komórka roślinna pozbawiona ściany; czy na pewno doktorant w takim kontekście użył tego określenia?

Myślę, że „pod” mikroskopem czy binokulem nie można obserwować preparatów.

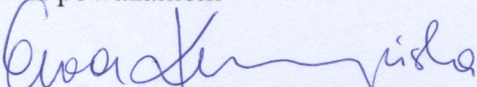
Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają znaczenia rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Baranowskiego. Pragnę podkreślić, że należy je traktować jako podstawę do dyskusji oraz jako wyraz troski o jeszcze lepszą formę opracowania wyników do przyszłych publikacji.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że wysoko oceniam przedstawioną mi do oceny pracę oraz, że spełnia ona warunki wymagane dla rozpraw doktorskich zawarte w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz.U. 2003r. Nr 65, poz.595 z późn. zmi.).

W związku z tym stawiam wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Łukasza Baranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorską problematykę prowadzonych badań oraz zastosowanie nowoczesnych metod **wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.**

Z poważaniem

  
Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska