



# **INSTITUTE OF PLANT GENETICS POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: +48 616550200 or 616550255 E-mail: [rmal@igr.poznan.pl](mailto:rmal@igr.poznan.pl)

[[www.igr.poznan.pl](http://www.igr.poznan.pl)] VAT: PL 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Poznań 29\_12\_2023

**Recenzja osiągnięcia naukowego Pana Dr Piotra Gawrońskiego sporządzona w ramach postępowania w sprawie wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych**

## **1. Podstawowe dane o kandydacie**

Dr Piotr Gawroński uzyskał stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Praca pod tytułem „Molecular, physiological and bioinformatic analysis of the cellular signalling for regulation of biotic and abiotic stress responses in higher plants” została obroniona z wyróżnieniem 24 czerwca 2014 roku, a jej promotorem był Prof. Stanisław Karpiński.

Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

## **2. Podstawa prawna**

Ocena postępowania habilitacyjnego jest przeprowadzana w oparciu o wymagania określone w artykule 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (z późn. zmianami) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

## **3. Ocena osiągnięcia naukowego**

Jako uzasadnienie przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego złożono dokumentację, w której przedstawiono osiągnięcie naukowe zatytułowane: „Określenie roli translacji w chloroplastach i komunikacji chloroplast-jądro w odpowiedzi na stresy abiotyczne”.

Na osiągnięcie składa się cykl 4 publikacji wynikowych i jednej przeglądowej. Zasadniczo prace ujęte w osiągnięciu stanowią pewną spójną całość, chociaż analizując załączone prace odniosłem wrażenie pewnej (być może naturalnej) ewolucji, która nastąpiła w rozwoju naukowym aplikanta. Wyraźne jest przejście od prac związanych ze stresami abiotycznymi do prac o charakterze bardziej strukturalnym i molekularnym niż fizjologicznym. To oczywiście

nie stanowi większego problemu, a jedynie obrazuje pewien proces nabywania samodzielności i niezależności naukowej.

Wszystkie załączone prace cechują się wysoką jakością a potwierdzony oświadczeniami współautorów wiodący wkład Dr Piotra Gawrońskiego jest wyraźny. Prace są multidyscyplinarne, są wynikiem bardzo dobrze ułożonej współpracy naukowej, a opisywane eksperymenty były wykonane z największą starannością i dbałością o liczbę powtórzeń czy wykorzystane kombinacje kontrolne. Dwie z załączonych prac ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych, których lektura jest przysłowiowym chlebem powszednim dla biologów roślin na całym świecie. Samo zagadnienie, nad którym pracuje Dr Gawroński dotyczy podstawowego procesu molekularnego, który znajduje odzwierciedlenie w całym spektrum reakcji roślin, dlatego uzyskane wyniki mogą i zapewne będą podstawą wielu innych prac naukowych.

W pracy pod tytułem „CIA2 and CIA2-LIKE are required for optimal photosynthesis and stress responses in *Arabidopsis thaliana*” autorzy podjęli się próby identyfikacji czynników transkrypcyjnych o podwójnej lokalizacji chloroplastowo-jądrowej biorących udział w komunikacji między tymi organellami. W autoreferacie napisano, iż była to pierwsza tego typu próba. Niestety nie mogę zgodzić się z powyższym stwierdzeniem; przykładowo praca Sun i wsp. (Nature Communications 2011; DOI: 10.1038/ncomms1486) opisuje działanie czynnika transkrypcyjnego PTM, biorącego udział w przekazie sygnału pomiędzy chloroplastem a jądrem (ang. retrograde signalling). Wykazano wówczas, że dojrzałe białko PTM jest związane z błoną chloroplastu, podczas gdy dalej procesowane białko jest w stanie aktywować transkrypcję genu *ABI4*. Co typowe dla badania sygnalizacji wstecznej (ang. retrograde signalling), wspomniana praca zawiera również badanie odpowiedzi na wysokie natężenie światła. Ukazały się również prace wskazujące na udział PTM w regulacji kwitnienia poprzez mediowanie represji genu *FLC* (Feng i wsp., PNAS 2016). W późniejszych pracach kwestionowano rolę białka *ABI4* w sygnalizacji wstecznej (Kacprzak i wsp., Plant Physiol.; 2019) ale to nie zmienia faktu, że PTM jest czynnikiem transkrypcyjnym występującym w podwójnej lokalizacji subcelularnej i uczestniczącym w tym procesie przekazu sygnału. Zatem stwierdzenie jakoby praca P1 była pierwszą próbą identyfikacji czynników transkrypcyjnych o podwójnej (chloroplastowo-jądrowej) lokalizacji jest nieuprawnione. Wracając do pracy Dr. Gawrońskiego; autorzy korzystając z dostępnych baz danych, prac dotyczących proteomu

chloroplastowego, oraz narzędzi bioinformatycznych pozwalających na przewidywanie subcelularnej lokalizacji białka wytypowali grupę genów *Arabidopsis thaliana*, kodujących białka mogące lokować się zarówno w chloroplastach, jak i jądrze komórkowym. Podejście to wynikało z postawionej hipotezy odnośnie do tego, że białka posiadające tego typu podwójną lokalizację mogą uczestniczyć w przekazie sygnału pomiędzy chloroplastami a jądrem komórkowym. W następnym etapie pracy prowadzono eksperymenty na mutantach T-DNA typu knock-out pozyskanych z dostępnych kolekcji. Tu również pewną nieścisłość stanowi stwierdzenie zamieszczone w autoreferacie „uzyskano 67 mutantów”, w moim mniemaniu należałoby napisać „pozyskano” ponieważ mutanty pochodzą z ogólnodostępnych kolekcji mutantów T-DNA. Wykonana tu praca polegała na typowo w tym przypadku prowadzonej selekcji homozygotycznych mutantów (często bywa tak, że mutanty z kolekcji nadal segregują daną cechę). W celu wytypowania genów, których produkty mogą pełnić rolę w przekazie sygnału pomiędzy chloroplastami a jądrem, rośliny poddano czynnikom wywołującym stres fotooksydacyjny (silne naświetlenie lub UV-AB). W ten sposób do dalszych badań wytypowano 8 genów, jednak próba potwierdzenia podwójnej lokalizacji wykazała, że 7 z wytypowanych białek lokuje się jedynie w jądrze komórkowym. Zatem podwójną lokalizację stwierdzono jedynie dla jednego białka. Gen *CIA2* kodujący to białko (czynnik transkrypcyjny) był wcześniej analizowany funkcjonalnie i stwierdzono jego udział w regulacji procesów transportu białek do chloroplastów oraz w procesie translacji w chloroplastach (Sun i wsp. Plant Cell 2001; Sun i wsp. Plant Phys 2009). Pan Dr Piotr Gawroński wraz ze współpracownikami postanowił przeprowadzić badania dotyczące potencjalnego udziału białka *CIN2* w regulacji odpowiedzi na stres fotooksydacyjny. Badania poszerzono o analizę homologicznego genu *CIL*. Wykazano, że mutanty obu genów charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na czynniki abiotyczne prowadzące do stresu fotooksydacyjnego i mają obniżone tempo asymilacji CO<sub>2</sub>. Brak skutecznej ochrony fotosystemów u badanych mutantów skutkowało ograniczeniem wzrostu roślin. W pracy Sun i wsp. (2009) wykazano, że gen *CIN2* reguluje ekspresję genów jądrowych kodujących chloroplastowe białka rybosomalne. Badania Dr Gawrońskiego na mutancie *cin2* oraz *cin2cil* wykazały zaburzenia translacji w chloroplastach. W ostatniej części pracy wykazano również, że analizowane mutanty charakteryzowały się zwiększoną tolerancją na stres wysokiej temperatury, co było powiązane z podniesionym poziomem transkryptów niektórych genów kodujących białka szoku cieplnego. W pracy nie podjęto się dalszego wytłumaczenia niniejszego zjawiska. Rozumiem, że może to być przedmiotem dalszych badań.

Wkrótce po opublikowaniu pracy Dr. Gawrońskiego ukazała się również podobna publikacja dotycząca udziału białek CIN2 i CIL w komunikacji pomiędzy chloroplastami a jądrem i niektóre aspekty dotyczące wpływu poszczególnych mutacji na funkcjonowanie fotosystemów opisane w tej pracy różnią się od wyników uzyskanych przez Dr. Gawrońskiego. Trudno powiedzieć do jakiego stopnia różnice w technicznych szczegółach dotyczących prowadzonych eksperymentów mogą wpłynąć na wyniki, jednak w moim mniemaniu kwestie związane z aktywacją poszczególnych mechanizmów chroniących fotosystemy mogą być stosunkowo plastyczne. Praca Dr. Gawrońskiego i współpracowników stanowi ważny wkład do zrozumienia wstecznego przekazu sygnału pomiędzy chloroplastami a jądrem komórkowym. Jest to dość złożona praca o charakterze multidyscyplinarnym. Autorzy prezentują oryginalne odkrycie i w jasny sposób prezentują do jakiego stopnia białko CIN2 jest ważne dla możliwości dostosowywania się rośliny do czynników wywołujących stres fotooksydacyjny. Badanie te oczywiście nie wyczerpują tematu i nie przedstawiają mechanistycznego modelu działania białka CIN2. W pracy Yang i wsp (2022) wykazano, że białko CIA2 bierze udział w biogenezie chloroplastów. Czy zatem możemy jednoznacznie powiedzieć, że białko CIA2 jest bezpośrednio zaangażowane w mediowanie odpowiedzi na stres fotooksydacyjny? Czy może jest tak, że brak białka CIN2 prowadzi do zaburzenia biogenezy chloroplastów oraz zaburzenia procesów translacyjnych w chloroplastach, co w sposób naturalny prowadzi do zaburzenia funkcjonowania chloroplastów, w tym także ich zdolności dostosowania się do odpowiedzi na czynniki stresowe badane przez Dr. Gawrońskiego?

Kolejne publikacje składające się na osiągnięcie naukowe wytypowane przez aplikanta obejmują głównie zagadnienia związane z procesami translacji zachodzącymi w chloroplastach i są one wynikiem współpracy Dr. Gawrońskiego z Prof. Scharff'em. Oczywiście procesy te mają znaczenie dla odpowiedzi na stresy abiotyczne, ale należy tu podkreślić, że mają one zasadniczo znaczenie dla całego funkcjonowania rośliny. W pracy oznaczonej jako P2 „Pausing of chloroplast ribosomes is induced by multiple features and is linked to the assembly of photosynthetic complexes” przy użyciu techniki profilowania rybosomów wykazano, że w 95% miejsca pauzowania translacji zależne są od interakcji rRNA podjednostki rybosomu z sekwencją Shine-Dalgarno w sekwencji kodującej, drugorzędową strukturą mRNA oraz obecnością w nowo zsyntetyzowanym łańcuchu peptydowym aminokwasów posiadających ładunek dodatni. Praca ta jest bardzo ciekawym przykładem połączenia badań *in silico* z

zaawansowanymi i technicznie trudnymi eksperymentami pozwalającymi na badanie procesów translacji na poziomie molekularnym. Autorzy wykazali, że mechanizmy regulujące występowanie miejsc pauzowania są ewolucyjnie zakonserwowane pomiędzy odległymi gatunkami roślin. Wykazali również, że stopień konserwacji może mieć związek ze zdolnością do autotroficznego trybu życia ponieważ podobieństwa np. u gatunków roślin pasożytniczych takich jak Kianianka są mniejsze. Kolejnym ciekawym aspektem pracy jest wykazanie, że pauzowanie w chloroplastach może pełnić ważną rolę przy wiązaniu białek z błonami chloroplastowymi czy też wiązaniu kofaktorów wchodzących w skład fotosystemów. Ogólnie praca jest bardzo interesująca i inspirująca; zwłaszcza ciekawy jest tu aspekt ewolucyjny i to zarówno dotyczący kwestii roli pauzowania w wiązaniu białek opisanej wcześniej u bakterii, od których przecież (w dużym uproszczeniu) w toku ewolucji pozyskane zostały chloroplasty; jak i spraw związanych z zależnością konserwacji domeny Shine-Dalgarno z autotroficznym trybem życia roślin. Ciekaw jestem, jak ta ostatnia kwestia prezentuje się u innych roślin pasożytniczych; np. Strzyga czy Jemioła, które w przeciwieństwie do Kianianki nie są roślinami bezzieleniowymi i zachowały zdolność do prowadzenia fotosyntezy?

W pracy nr 3 (Gawroński, P., Pałac, A., Scharff, L.B.; 2020. Secondary structure of chloroplast mRNAs in vivo and in vitro. *Plants* 9: 323. ) badano możliwości wykorzystania metody oceny stabilności drugorzędowej struktury RNA bazującej na traktowaniu siarczanem dimetylu i sekwencjonowaniu (DMS-MaPseq). W ten sposób wykazano, że struktura RNA w warunkach in vivo jest stosunkowo mało stabilna i może mieć to wpływ na procesy inicjacji translacji. Ten aspekt został dodatkowo zgłębiany w pracy nr 4 (Gawroński, P., Enroth, C., Kindgren, P., Marquardt, S., Karpiński, S., Leister, D., Jensen, P., Vinther, J., Scharff, L. (2021). Light-dependent translation change of *Arabidopsis psbA* correlates with RNA structure alterations at the translation initiation region. *Cells* 10: 322 ), gdzie badano zależność pomiędzy zmianą drugorzędowej struktury mRNA a inicjacją translacji. W eksperymentach bazowano na zjawisku wzrostu wydajności translacji następującego pod wpływem natężenia światła, które obserwuje się dla białka D1 kodowanego przez gen *psbA*. Postanowiono zbadać czy białka wiążące się w rejonie inicjacji translacji mogą wpływać na strukturę drugorzędową mRNA. Podobnie jak w poprzedniej pracy do oceny struktury II-rzędowej mRNA in vivo wykorzystano metodę DMS-MaPseq. Stwierdzono, że w warunkach wysokiego natężenia światła dochodziło do destabilizacji drugorzędowej struktury mRNA genu *psbA*. Stwierdzono również, że

zwiększona stabilność w rejonie startu translacji oraz rejonie Shine-Dalgarno powoduje spadek intensywności procesu translacji. W warunkach silnego naświetlenia stabilność mRNA w tych rejonach spadała. To zjawisko potwierdzono również niezależnie drugą metodą (SHAPE-seq). W dalszej części badań wykazano wiązanie się do rejonu 5' UTR genu *psbA* wcześniej opisanego białka HCF173 odpowiedzialnego za translację tego mRNA. Dodatkowo wykazano, że w warunkach wysokiego naświetlenia dostępność rejonu Shine-Dalgarno oraz startu translacji zwiększa się ze względu na destabilizację struktury drugorzędowej prowadzącą do tego, że te rejony znajdują się w formie niesfałdowanej nici. Odkrycie opisane w niniejszej pracy jest bardzo ciekawe ponieważ łączy aspekty biofizyczne z molekularną regulacją procesu translacji w chloroplastach. Praca daje podwaliny do badań mających na celu dokładne zrozumienie mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź roślin na natężenie światła. Wyniki uzyskane przez Dr Gawrońskiego wyraźnie pokazują, że proces translacji jest bardzo ważnym czynnikiem zaangażowanym w tę reakcję roślin. Osobiście jestem pod bardzo dużym wrażeniem niniejszej pracy i mam nadzieję, że dalsza funkcjonalna kontynuacja eksperymentów pozwoli wskazać konkretne czynniki mające wpływ na zmiany struktury drugorzędowej mRNA i powiązanie ich działania z różnymi bodźcami wewnętrznymi (kwestie biogenezy i dalszych przemian chloroplastów) oraz zewnętrznymi (wpływ stresów zarówno biotycznych jak i abiotycznych).

Ostatnią pracą wchodzącą w skład zgłoszonego osiągnięcia naukowego jest publikacja przeglądowa dotycząca roli  $H_2O_2$  w reakcjach adaptacyjnych u roślin. Po zapoznaniu się z niniejszą pracą wnioskuję, że częścią w pewnym sensie łączącą tę pracę z pozostałymi czterema jest aspekt udziału  $H_2O_2$  w procesie translacji. Zasadniczo trudno jest oceniać pracę przeglądową po kątem osiągnięcia naukowego. Potrzeba napisania tego typu pracy wynika albo z chęci przybliżenia aktualnego stanu wiedzy w danej tematyce, albo z chęci zaprezentowania nowej perspektywy rozumienia jakiegoś zagadnienia. Zwykle prace przeglądowe zawierające ten drugi aspekt są bardziej wartościowe i wskazują na dojrzałość naukową autora i łatwość z jaką porusza się on w tematyce. Niniejsza praca przeglądowa w sposób bardzo kompleksowy opisuje zagadnienie, znalazły się tam między innymi kwestie odpowiedzi obronnych, adaptacyjnych oraz regulacji procesów na poziomie subcelularnym. Praca nie jest jedynie prostym zebraniem i przedstawieniem stanu wiedzy w tematyce. Z drugiej jednak strony praca ta ogranicza się mocno do poziomu komórki i podstawowych

mechanizmów związanych z transkrypcją czy translacją a kwestie globalne takie jak np. pośredniczenie w długodystansowym przekazie stresu są nieco zaniedbane. Praca jest na dobrym poziomie jednakże brak w niej również jakiś mocniejszych akcentów w postaci nowatorskiego spojrzenia na zagadnienie czy np. stawiania nowych hipotez czy też wskazywania kierunków do dalszych prac.

Podsumowując, po zapoznaniu się z treścią publikacji wskazanych jako podstawa do ubiegania się o stopień Dr. habilitowanego stwierdzam, że ze względu na nowatorski charakter odkryć oraz wysoką jakość pracy prezentowane osiągnięcia spełniają wszelkie kryteria związane z merytoryczną wartością kwalifikującą do pozytywnego rozpatrzenia postępowania habilitacyjnego.

#### **4. Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej oraz dotychczasowego dorobku naukowego**

Pomimo tego, że zgodnie z aktualnymi przepisami ocena pozostałych aktywności aplikanta formalnie nie stanowi podstawy do rozpatrywania wniosku habilitacyjnego postanowiłem jednak poświęcić kilka słów dotychczasowemu opisowi przebiegu kariery naukowej Dr Piotra Gawrońskiego. Pan Dr Piotr Gawroński od roku 2014 jest członkiem The Society for Experimental Biology. Wykonuje pracę naukową i dydaktyczną na SGGW. Odbił staże naukowe (5 miesięcy w Holandii, 3 m-ce w Wielkiej Brytanii, 11 miesięcy w Danii), podczas których prowadził badania naukowe, które zakończyły się publikacjami w renomowanych czasopismach. Prezentował swoje prace w formie wykładów na polskich i międzynarodowych konferencjach oraz w instytucjach naukowych, w których pracował. Był wykonawcą w projektach naukowych oraz kierownikiem dwóch projektów NCN (w tym Sonata Bis – projekt, którego celem jest stworzenie zespołu badawczego. Aktualnie kieruje własnym zespołem badawczym. Jego dorobek naukowy jest bardzo dobry, oprócz prac zawartych w ocenianym osiągnięciu naukowym może pochwalić się on autorstwem wielu innych bardzo ciekawych publikacji w czasopismach takich jak chociażby J. Exp. Bot; Plant Physiology czy PNAS.

Na szczególną uwagę zasługuje praca pt. „Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in Arabidopsis” opublikowana w czasopiśmie Molecular Plant, w której Dr Gawroński jest pierwszym autorem. W pracy opisano wiele poziomów regulacji funkcjonowania rośliny, w których uczestniczy białko MAPK4 i wyjaśniono zależności jakie występują w mediowanych przez to białko

odpowiedziach obronnych oraz rozwojowych rośliny. Oczywiście bardzo dobrych prac w dorobku Dr. Gawrońskiego jest wiele więcej, ale pozwoliłem sobie przytoczyć tę właśnie ze względu na bardzo kompleksowy i głęboko funkcjonalny charakter przedstawionych badań. Świadomie nie chcę tu przytaczać żadnych parametrów naukometrycznych ponieważ ostatnio ich znaczenie jest słusznie kwestionowane.

Wartość merytoryczna prac, olbrzymia aktywność naukowa jak również obraz przebiegu kariery naukowej (w tym mobilność, samodzielność i kreatywność) jednoznacznie wskazują na to, że Dr Piotr Gawroński jest pełnowymiarowym naukowcem i zasługuje na stopień doktora habilitowanego. Pozwolę sobie również napisać, że bardzo mnie cieszy prowadzenie przez niego własnego zespołu badawczego. W moim mniemaniu Dr Piotr Gawroński ma dużą szansę stać się w przyszłości jedną z wiodących osobistości w naukach biologicznych w naszym kraju.

## **5. Wniosek końcowy**

Po zapoznaniu się z osiągnięciami naukowymi przedstawionymi przez Dr. Piotra Gawrońskiego, z przebiegiem jego kariery naukowej, oraz całokształtem jego dotychczasowej aktywności dydaktycznej i organizacyjnej, jak również dorobkiem naukowym, uważam, że w pełni spełniają one wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

Badania prowadzone przez Dr Gawrońskiego cechują się wysokim stopniem oryginalności i jakości. Prace są multidyscyplinarne i prowadzą do kompletnych wniosków, dzięki czemu ich wyniki stanowią duży wkład dla dyscypliny nauk biologicznych i stanowią stabilny fundament do dalszych badań i rozważań. Wysoko oceniam również aktywność, zdolność do współpracy naukowej oraz mobilność naukową kandydata. W związku z powyższym stwierdzam, że Habilitant spełnia kryteria stawiane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o nadanie kandydatowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

Prof. dr hab. Robert Malinowski

Kierownik Zakładu Zintegrowanej Biologii Roślin

Instytut Genetyki Roślin PAN