



Prof. dr hab. Grażyna Kłobus
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. Kanonia 6/8,
53-203 Wrocław

O C E N A

Osiągnięcia naukowego pt. „Ekspresja i funkcja kalretikuliny podczas kluczowych wydarzeń procesu rozmnażania generatywnego *Petunia hybrida*”

oraz

aktywności naukowej, dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego i współpracy międzynarodowej doktora Roberta Lenartowskiego

Dr Robert Lenartowski ukończył studia w 1995 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Na tym samym Wydziale, w roku 2001, uzyskał stopień doktora nauk biologicznych i został zatrudniony najpierw na stanowisku asystenta (2001-2005), a następnie adiunkta w Zakładzie Genetyki. Od roku 2011 dr Lenartowski pracuje na stanowisku adiunkta w Pracowni Izotopowej i Analizy Instrumentalnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK, pełniąc jednocześnie funkcję kierownika pracowni.

Ocenę osiągnięć Kandydata przygotowałam w oparciu o dostarczoną pełną dokumentację zawierającą: odpis dyplomu doktora nauk biologicznych, autoreferat w j. polskim i angielskim obejmujący informacje o dyplomach i stopniach naukowych Kandydata oraz dotychczasowym zatrudnieniu, omówienie celu i wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, kopie prac składających się na osiągnięcie naukowe, wykaz wszystkich opublikowanych prac wraz z informacjami o wskaźnikach dokonań naukowych i oświadczeniami Habilitanta i współautorów o wkładzie w powstanie prac składających się na osiągnięcie naukowe, wykaz osiągnięć organizacyjnych i dorobku dydaktycznego.

1. OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.

Jako główne osiągnięcie naukowe dr Robert Lenartowski wskazał pięć publikacji wyjaśniających funkcje kalretikuliny w interakcjach komórkowych podczas kluczowych etapów procesu rozmnażania generatywnego u *Petunia hybrida*. Jakkolwiek wszystkie publikacje są współautorskie, a Habilitant jest autorem korespondencyjnym tylko w trzech spośród nich, to Jego udział we wszystkich pracach był dominujący i obejmował czytelnie sprecyzowane zadania, w tym opracowanie koncepcji badawczej, wiodącą rolę w wykonaniu doświadczeń i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów do druku. Jedną spośród prac cyklu habilitacyjnego, chronologicznie najstarszą, ma charakter przeglądowy i nie prezentuje nowych danych. Pokazuje jednak bardzo szeroko kontekst późniejszych badań Autora uzasadniając ich ważkość i zasadność. Jest to też jedyna praca cyklu napisana w j. polskim i opublikowana w czasopiśmie nieindeksowanym. Pozostałe oryginalne prace ukazały się w czasopiśmie z listy

filadelfijskiej o dobrych współczynnikach oddziaływania (od 3,088 do 3,376) i sumarycznym IF 12,942. Wg bazy Web of Science prace cyklu habilitacyjnego były cytowane tylko 14 raz. Nie jest to wynik zadowolający, ale trzeba pamiętać, że cytowania dotyczą tylko trzech prac cyklu opublikowanych w latach 2014-2015. Czwarta oryginalna publikacja ukazała się w maju 2017 i dopiero od miesiąca jest wykazywana w bazie Web of Science. Wszystkie prace składające się na cykl habilitacyjny zostały przygotowane wg zasad określonych przez redakcje czasopism naukowych, w których zostały opublikowane. We wszystkich pracach oryginalnych jasno przedstawiono hipotezy badawcze, które zweryfikowano we właściwym cyklu doświadczeń wykonanych przy użyciu dobrze dobranych metod. Dyskusja oryginalnych wyników własnych pokazuje dobrą znajomość tematyki badawczej, dojrzałość Autora i swobodę w konfrontacji poglądów własnych z tezami innych badaczy. Wszystkie prace cyklu habilitacyjnego przeszły wcześniej procedurę weryfikacyjną zyskując akceptację recenzentów i edytorów renomowanych czasopism naukowych. Tak więc, pod względem formalnym przedstawiony przez Kandydata cykl publikacji spełnia wymogi jakie stawia ustawa osiągnięciu naukowemu stanowiącemu podstawę uzyskania stopnia doktora habilitacyjnego.

Badania przedstawione w publikacjach naukowych wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego dr Roberta Lenartowskiego są merytorycznie spójne. Ich głównym celem było wyjaśnienie biologicznej funkcji kalretikuliny (CRT) w interakcjach komórkowych podczas kluczowych etapów rozmnażania generatywnego *Petunia hybrida*, takich jak dojrzewanie szlaku transmisyjnego słupka poprzedzające antezę, kielkowanie pyłku i wzrost łagiewek pyłkowych, depozycja komórek plemnikowych w docelowej synergidzie i fuzja gamet oraz podczas wczesnych faz embriogenezy (aktywacja genomu zygotycznego, rozwój zarodka i bielma). Powyższa tematyka jest ważna i aktualna, bowiem złożone mechanizmy regulujące interakcje komórkowe podczas głównych etapów cyklu reprodukcyjnego okrytozależnych, pomimo intensywnych badań, nie są do końca wyjaśnione. Także wybór kalretikuliny jako przedmiotu badań jest dobrze uzasadniony. Wiadomo bowiem, że wiele etapów rozmnażania generatywnego okrytozależnych wymaga precyzyjnej regulacji stężenia jonów wapnia w komunikujących się komórkach, a CRT jest jednym z białek odpowiadających za ich buforowanie. Poza rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowej, to ewolucyjnie zakonserwowane, wiążące Ca^{2+} białko opiekuńcze zlokalizowane w przestrzeni wewnętrznej retikulum endoplazmatycznego kontroluje także jakość szerokiej grupy białek dojrzewających w kompartmentach. Krytyczna rola kalretikuliny klasy CRT1/2 w regulacji rozwoju embrionalnego modelowych organizmów zwierzęcych jest dobrze udokumentowana, a doświadczenia przeprowadzone na *Arabidopsis* ale także na *Petunia hybrida* w macierzystej jednostce Kandydata sugerowały jej istotne funkcje w kontroli procesów rozrodczych u roślin. Jakkolwiek więc tematyka osiągnięcia nie jest nowa, to dopiero kompleksowe badania przeprowadzone przez Kandydata, pokazujące korelacje profili ekspresyjnych genu *PhCRT* ze zmianami poziomu wymiennego Ca^{2+} na kluczowych etapach reprodukcyjnych, w połączeniu z analizą fenotypowych i fizjologicznych efektów wyciszonej ekspresji *PhCRT* podczas wzrostu łagiewki pyłkowej udowodniły, że regulatorowa funkcja *PhCRT* z dużym prawdopodobieństwem wynika z udziału w regulacji mobilizacji jonów wapnia podczas głównych etapów rozmnażania generatywnego *Petunia hybrida*.

Doświadczenia prowadzące do tej konkluzji dr Lenartowski rozpoczął od sklonowania swoistej gatunkowo, pełnej sekwencji *PhCRT* cDNA. Charakterystyka bioinformatyczna kodowanej sekwencji aminokwasowej, w połączeniu z analizą filogenetyczną dowiodły przynależność białka do podgrupy CRT1/2 skupiającej izoformy, które funkcjonują jako wiążące Ca^{2+} białka opiekuńcze ER. Na bazie sklonowanej matrycy *PhCRT* cDNA dr Lenartowski przygotował także specyficzną, antysensowną sondę RNA, którą użył do określenia profili ekspresyjnych genu w słupkach izolowanych na różnych etapach rozwojowych kwiatów petunii. I tak, w analizach Northern blot Kandydat ujawnił nagromadzenie transkryptu w górnym fragmencie słupka (znamień/szyjka) izolowanego z pąków kwiatowych przed antezą

i na wczesnych etapach fazy progamicznej, kiedy na znamieniu, po zapyleniu, dochodzi do kiełkowania pyłku. Pokazał też, że poziom transkrypty był relatywnie wysoki w zalążni niezapylonego słupek, ale wzrastał wyraźnie po zapyleniu, osiągając maksimum w późniejszej progamicznej, kiedy następuje depozycja komórek plemnikowych w woreczku zalążkowym. Stosując metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* ujawnił wysoki poziom transkrypty w komórkach wydzielniczych znamion dojrzewającego słupek przed antezą i w dniu antezy oraz podczas kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewki pyłkowej w szlaku transmisyjnym słupek. Pokazał też, że w zalążni poziom transkrypty był wysoki w regionie mikropylarnym przed i po zapyleniu, i dramatycznie wzrastał w późniejszej progamicznej, podczas fuzji gamet i wczesnej embriogenezy. Akumulacja transkryptów była szczególnie wysoka w docelowej synergidzie zawierającej pyłek, w zygocie i w rozwijającym się bielmie. W ten sposób dr Lenartowski udowodnił, że podczas kluczowych etapów reprodukcyjnych w słupek (dojrzewanie słupek przed antezą, kiełkowanie pyłku i wzrost łagiewki pyłkowej, depozycja komórek plemnikowych w synergidzie, zapłodnienie i wczesna embriogeneza) indukowana jest ekspresja *PhCRT*. Powyższe wyniki opublikował w pierwszej oryginalnej pracy osiągnięcia habilitacyjnego (Planta, 2014). W kolejnej publikacji, stosując poliklonalne przeciwciała anty-CRT PAb specyficzne wobec *PhCRT*, w analizach Western blot i w badaniach immunocytochemicznych, Habilitant potwierdził na tych samych etapach reprodukcyjnych i w tych samych komórkach słupek także obecność białka kalretikuliny. Pokazał ponadto, że w wyspecjalizowanych komórkach uczestniczących w interakcji pyłku i słupek białko lokalizowało głównie w strukturach retikulum endoplazmatycznego i diktiosomach. Jednocześnie, w tych samych komórkach ujawnił dynamiczne zmiany wymiennego Ca^{2+} . Powyższe obserwacje stanowiły podstawę tezy o roli CRT w regulacji gromadzenia i mobilizacji jonów wapnia w komunikujących się komórkach pyłku i słupek podczas kluczowych etapów reprodukcyjnych. Tezę tę dr Lenartowski zweryfikował w doświadczeniach zaprezentowanych w kolejnej pracy osiągnięcia habilitacyjnego (Plant Cell Rep., 2015) wykorzystując do badań kultury *in vitro* łagiewek pyłkowych *Petunia hybrida*. Wybór łagiewki pyłkowej był uzasadniony, bowiem kiełkowanie pyłku i szczytowy wzrost łagiewki jest zależny od gradientu Ca^{2+} , a ukierunkowany wzrost łagiewki pyłkowej jest jednym z podstawowych zdarzeń gwarantujących sukces reprodukcyjny okrytonasiennych. Wykorzystując ponownie metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* i bioobrazowanie immunocytochemiczne dr Lenartowski wykazał współwystępowanie transkrypty i białka *PhCRT*, 18S rRNA i szorstkiego retikulum w aperturze kiełkujących ziaren pyłku oraz w łagiewkach pyłkowych. Takie wyniki pośrednio wskazują, że podczas kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewki translacja *PhCRT* odbywa się na rybosomach związanych z ER. Są także zgodne z wcześniejszymi wynikami Habilitanta o lokalizacji białka w lumen retikulum. Szczególna obfitość wszystkich czterech komponentów w subapikalnym regionie rosnącej łagiewki pyłkowej bogatym w ER i diktiosomy stanowiące magazyny mobilnej puli jonów wapniowych sugerowała ponadto, że *PhCRT* może regulować wzrost łagiewki pyłkowej przez modulację lokalnej puli wymiennego Ca^{2+} i podtrzymywanie wysokiego stężenia jonów w części szczytowej łagiewki. Są to więc kolejne pośrednie dowody potwierdzające główną tezę dr Lenartowskiego postulującą, że regulatorowa funkcja *PhCRT* podczas kluczowych etapów reprodukcji wynika z udziału w regulacji mobilizacji jonów wapnia. Ostatecznie tezę tę udowodniły eksperymenty przeprowadzone na łagiewkach pyłkowych z postranskrypcyjnie wyciszoną ekspresją *PhCRT* rosnące w kulturach *in vitro*, których wyniki opublikowano w ostatniej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego ((Planta, 2017). Jest to obszerna praca, w której najpierw w sposób bardzo staranny Habilitant udokumentował wybór właściwego, gatunkowo swoistego *siRNA* komplementarnego do transkrypty *PhCRT* efektywnego w jego degradacji w rosnących *in vitro* łagiewkach pyłkowych, bez jednoczesnych efektów cytotoksyczności. Potwierdził także, że efektem degradacji *PhCRT* był dramatyczny spadek ilości białka *PhCRT* w łagiewkach. Najważniejszym wynikiem tej pracy było pokazanie, że wyciszenie ekspresji *PhCRT*

hamowało wzrost łagiewki pyłkowej, zmieniając jej morfologię i ultrastrukturę, szczególnie strefową organizację cytoplazmy, organizację mikrofilamentów aktynowych i destabilizując gradient Ca^{2+} . Co więcej redukcja ilości PhCRT obniżała akumulację ER w subapikalnej części łagiewki i zaburzała ich strukturę, a także hamowała przepływ cytoplazmy. W ten sposób dr Lenartowski udowodnił, że PhCRT odgrywa istotną rolę w stabilizacji gradientu Ca^{2+} w rosnącej łagiewce pyłkowej, przez co wpływa na współdziałanie struktur i procesów warunkujących jej szczytowy wzrost.

Podsumowując, przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi merytorycznie spójną całość i udowadnia istotną rolę białka PhCRT w regulacji kluczowych etapów rozmnażania generatywnego *Petunia* poprzez udział w buforowaniu poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Oceniam pozytywnie to osiągnięcie i uważam, że spełnia ono wszystkie wymogi stawiane przez znowelizowaną ustawę o stopniach i tytule naukowym. Analiza osiągnięcia habilitacyjnego pozwala też ocenić Habilitanta jako samodzielnego i dojrzałego badacza, dysponującego bogatym warsztatem badawczym.

2. OCENA OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH I ISTOTNEJ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ HABILITANTA.

Poza cyklem 5 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, dr Lenartowski opublikował 8 prac, w tym 2 przeglądowne, w czasopismach naukowych ujętych w bazie Journal Citation Reports o zróżnicowanych współczynnikach oddziaływania (od 0,621 do 3,376) oraz 5 prac, w tym 4 przeglądowne w czasopismach spoza bazy. W wypadku 8 prac Kandydat jest pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem, co świadczy o istotnej roli w ich przygotowaniu. W pozostałych pracach udział Pana Doktora jest określony na 10 do 30%. Ponadto jest on współautorem 35 doniesień opublikowanych w materiałach zjazdowych konferencji krajowych i międzynarodowych. Publikacje, w których współautorem był Habilitant zyskały łącznie 78 cytowań (62 bez autocytowań) w bazie *Web of Science*, a indeks Hirscha wynosi 5. Pod względem ilościowym i z uwagi na rangę czasopism nie jest to dorobek imponujący, ale wystarczający na tym etapie kariery zawodowej.

Analizując problematykę publikacji Habilitanta można wyróżnić kilka obszarów badawczych. Chronologicznie pierwszy, obejmujący 2 prace oryginalne i 6 przeglądowych, zainicjowany już podczas wykonywania pracy magisterskiej i kontynuowany w czasie doktoratu, dotyczy przestrzennej organizacji chromatyny genu *TH* kodującego hydrolazę tyrozynową i jej wpływu na status transkrypcyjny genu. Efektem badań było ujawnienie sekwencji S/MAR wiążących białka NMP w promotorach i intronach genu bydlęcego i ludzkiego, wykazanie u obu gatunków korelacji pomiędzy statusem transkrypcyjnym genów a obecnością miejsc S/MAR w proksymalnej części promotorów i dowiedzenie gatunkowo specyficznej organizacji chromatyny obu badanach jednostek transkrypcyjnych. Aktualnie, w ramach tej tematyki dr Lenartowski pełniąc funkcję promotora pomocniczego współuczestniczy w pracach nad identyfikacją i molekularną charakterystyką czynników *trans* i wiążących je elementów *cis* odpowiadających za swoistą tkankowo ekspresję genów *TH*.

Tematyka drugiego obszaru badawczego (2 prace oryginalne), podobnie jak cykl habilitacyjny, dotyczy białka CRT i jego roli w interakcjach pomiędzy komórkami pyłku i słupka, w trakcie rozmnażania generatywnego okrytonasiennych. Wykorzystując takie same modele doświadczalne (słupki izolowane z kwiatów na różnych etapach reprodukcyjnych i rosnące *in vitro* łagiewki pyłkowe) oraz metody badawcze (FISH i techniki immunocytochemiczne) dr Lenartowski wykazał, że dystrybucja białka CRT i jego transkryptów u dwóch gatunków okrytonasiennych (*Haemathus* i

Hyacinthus orientalis) jest podobna jak u *Petunia*, czym potwierdził uniwersalną rolę kalretikuliny w regulacji kluczowych etapów rozmnażania generatywnego okrytonasiennych.

Trzeci obszar badawczy dotyczy regulacji ekspresji genów neuronalnych i został zainicjowany podczas dwuletniego (2002-2003) stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Karen O'Malley, w Washington University School of Medicine, w St. Louis, USA. Zgodnie z informacjami zawartymi w Autoreferacie, dr Lenartowski uczestniczył w przygotowaniu zwierzęcego modelu choroby Parkinsona z możliwością czasowo-przestrzennej kontroli wybranych genów. W ramach projektu przygotował konstrukcję do otrzymania organizmów linii transgenicznnych mysz, z możliwością indukcji ekspresji transgenu w neuronach dopaminergicznnych. Tematykę tę kontynuował po powrocie do kraju, w ramach umowy finansowej pomiędzy UMK i WUSTL oraz dwóch grantów finansowanych ze środków UE. Z przyczyn niezależnych (śmierć amerykańskiego koordynatora badań i zawieszenie współpracy) wyniki tych badań nie zostały opublikowane, a jedynym efektem publikacyjnym jest praca przeglądowa podsumowująca wiedzę o wielofunkcyjności białka CHIP w kontroli jakości białek.

Swoje umiejętności metodyczne dr Lenartowski zdyskontował także we współpracy z innymi badaczami. Na podkreślenie zasługują badania nad dynamiką DNA, determinującą właściwości tej molekuly prowadzone we współpracy z prof. Aleksandrem Balterem, których efektem jest publikacja w *Physical Review E* oraz badania nad ekspresją miozyny VI u zwierząt prowadzone we współpracy z zespołem kierowanym przez prof. Rędownicz z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie.

Znakomitą część badań dr Lenartowski zrealizował w ramach projektów badawczych. Był wykonawcą grantu przyznanego przez amerykański National Institute of Health i grantu NCN, głównym wykonawcą w dwóch grantach MNiSW oraz kierował dwoma grantami finansowanymi ze środków UE. Działalność naukowa Pana Doktora została także czterokrotnie nagrodzona przez JM Rektora UMK (Zespołową Nagrodą III stopnia, Nagrodą Indywidualną III stopnia oraz Wyróżnieniem zespołowym i Wyróżnieniem indywidualnym) i trzykrotnie nagrodami/wyróżnieniami Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin.

W podsumowaniu pozytywnie oceniam osiągnięcia naukowo-badawcze i aktywność naukową Kandydata.

3. OCENA DOROBKU DYDAKTYCZNEGO I POPULARYZATORSKIEGO ORAZ WSPÓŁPRACY MIĘDZYKRAJOWEJ.

Podczas pracy w Uniwersytecie im. Mikołaja Kopernika, od roku 1995 dr Lenartowski prowadził i prowadzi ćwiczenia z czterech przedmiotów i jeden autorski wykład dla studentów. Ponadto prowadzi trzy przedmioty autorskie w ramach projektów finansowanych z Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki. Uczestniczył także w przygotowaniu wniosków konkursowych o te fundusze. Był opiekunem 6 i recenzentem 4 prac licencjackich. Opiekował się także kilkunastoma pracami magisterskimi i sprawuje bądź sprawował funkcję promotora pomocniczego w czterech przewodach doktorskich. Pan Doktor włącza się także w popularyzowanie wiedzy wśród uczniów szkół gimnazjalnych. Organizował i prowadził zajęcia w ramach Nocy Biologów oraz Drzwi Otwartych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UMK.

Dr Lenartowski nie uchyla się od obowiązków organizacyjnych. Od 2011 jest kierownikiem Pracowni Izotopowej i Analizy Instrumentalnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK, a od roku 2016 członkiem podkomisji ds. efektów kształcenia na kierunku diagnostyki molekularnej oraz członkiem Kolegium Elektorów UMK.

Pan Doktor odbył dwuletni staż podoktorski w laboratorium prof. Karen O'Malley w Department of Anatomy and Neurobiology, WUSM w St. Louis, USA, którego efektem była dalsza, 2-letnia współpraca. Ma zatem doświadczenie w pracy w innych ośrodkach naukowych poza macierzystą uczelnią.

WNIOSEK KOŃCOWY

Pozytywnie oceniam osiągnięcia naukowe dr Roberta Lenartowskiego i uważam, że Jego oryginalne odkrycia istotnie poszerzyły wiedzę o regulacji kluczowych etapów rozmnażania generatywnego okrytozależnych. Stwierdzam także, że w okresie po uzyskaniu stopnia doktora wystarczająco poszerzył swój dorobek naukowy, a Jego osiągnięcia dydaktyczne i popularyzatorskie, sukcesy w pozyskiwaniu środków na badania oraz współpraca naukowa są zadawalające. W mojej ocenie Kandydat wypełnia więc wszystkie warunki konieczne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego określone art. 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw z 2003r., nr 65, poz. 595; Dz. Ustaw z 2005 r. nr 164, poz. 1365 oraz Dz. Ustaw z 2011., nr 84, poz. 455). Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu o nadanie dr Robertowi Lenartowskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych – dyscyplina biologia.

Wrocław, 15.07.2017

(prof.dr hab. Grażyna Kłobus)

