

Poznań, 18.01.2021 r.

Prof. dr hab. Iwona Morkunas
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

Ocena pracy doktorskiej mgr Pawła Staszka
pt. „Metabolizm reaktywnych form tlenu i azotu w korzeniach
pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach
fitotoksycznego oddziaływania kanawaniny”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Staszka została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej z Katedry Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Recenzowana praca dotyczy zastosowania toksycznego niebiałkowego aminokwasu L-kanawaniny występującego u roślin z rodziny bobowatych, który wykazuje podobieństwo strukturalne do aminokwasu L-argininy, co sprawia, że większość enzymów wykorzystujących substrat argininę katalizuje także przekształcenia L-kanawaniny. W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej, po pierwsze badano egzogenny wpływ L-kanawaniny na zależną od argininy drogę biosyntezy tlenku azotu (NO) w korzeniach siewek pomidora (*Solanum lycopersicum* L.). Po drugie sprawdzono czy L-kanawanina moduluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych, profil izoenzymatyczny i ekspresję genów kodujących te enzymy oraz zdolność antyoksydacyjną, co było związane z określeniem zawartości związków fenolowych i całkowitej zawartości związków tiolowych. Interesującym w tych badaniach było wyjaśnienie czy kanawanina oddziałuje na reduktazę S-nitrozoglutationu (GSNOR)-kluczowy enzym regulujący wewnątrzkomórkowy poziom S-nitrozoglutationu (GSNO), który stanowi komórkowy rezerwuar NO. Przyjmuje się, że endogennie powstające S-nitrozotiole, w tym GSNO biorą udział w transporcie i magazynowaniu NO.

Tematyka badań niniejszej rozprawy doktorskiej jest kontynuacją badań od wielu lat realizowanych pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej. Badania prowadzone przez Doktoranta były częściowo finansowane w ramach projektu badawczego NCN OPUS 2014/13/B/NZ9/02074 pt. "Reaktywne formy azotu i poliaminy w regulacji

fitotoksycznego oddziaływania niebiałkowych aminokwasów na wzrost korzeni", którym kierowała prof. dr hab. Agnieszka Gniazdowska. Poza tym badania prowadzone przez Doktoranta były także finansowane z projektu PRELUDIUM UMO-2018/29/N/NZ9/00588 pt. "Mechanizm toksycznego oddziaływania kanawaniny na wzrost korzenia: zaburzenia organizacji wierzchołka wzrostu, ultrastruktury komórek, cyklu komórkowego i transportu auksyn" finansowanego przez NCN, projektu DIAMENTOWY GRANT DI2013 012843 pt. "Indukcja stresu oksydacyjnego jako mechanizm fitotoksycznego działania L-kanawaniny" finansowanego przez MNiSW oraz zadania badawczego WULS-SGGW 505-10-010200-Q00212-99 "Metabolizm glutationu w korzeniach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach fitotoksycznego oddziaływania kanawaniny" finansowanego w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla uczestnika studiów doktoranckich.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech monotematycznych publikacji naukowych opublikowanych w międzynarodowych specjalistycznych czasopismach naukowych, z których dwie są pracami przeglądowymi opublikowanymi w latach 2017 i 2020 w czasopismach *Phytochemistry Reviews* i *Planta* oraz dwie są pracami doświadczalnymi opublikowanymi w latach 2019 i 2020 w *Frontiers in Plant Science* i *Plants*. Łączny sumaryczny impact factor tych publikacji wynosi 15.334, a łączna wartość według kryteriów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 300 punktów MNiSW. Zarówno oryginalne prace jak i przeglądowe wchodzące w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej są pracami wieloautorskimi, jedynie jedna z prac przeglądowych jest pracą dwuautorską. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem i Jego udział w pracach doświadczalnych wynosi 60%. Należy podkreślić, że w oryginalnych publikacjach mgr Paweł Staszka jest autorem korespondującym. Ponadto Doktorant złożył oświadczenia i w każdym z nich przedstawił, że Jego wkład w przygotowanie artykułów polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaprojektowaniu doświadczeń, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu graficznym, interpretowaniu wyników, napisaniu artykułów, a następnie edycji manuskryptów po recenzjach i przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Współautorzy poszczególnych prac także złożyli oświadczenia. Z treści oświadczeń jasno wynika, co było udziałem Doktoranta w realizacji badań tworzących dysertację. Prace przed opublikowaniem w czasopismach podlegały zarówno ocenie specjalistów recenzentów jak i edytorów otrzymując ich pozytywne opinie i akceptację do opublikowania. Zatem w mojej recenzji nie będę odnosiła się i komentowała strony edytorskiej tych prac. Poza tym zarówno publikacje oryginalne jak i przeglądowe wchodzące w skład rozprawy są dostępne, ponieważ zostały opublikowane w czasopismach Open Access.

W pierwszej kolejności skoncentruje się na omówieniu prac doświadczalnych, w których przedstawione zostały wyniki badań otrzymane przez Doktoranta. W mojej opinii prace doświadczalne są najistotniejsze, ponieważ są odzwierciedleniem jakości wykonanych badań w ramach dysertacji jak i pokazują czy postawione cele i hipotezy badawcze są właściwe.

Obiektem badań w dysertacji były korzenie siewek pomidora (*Solanum lycopersicum* L. cv. Malinowy Ożarowski), które prowadzono w roztworach wodnych kanawaniny (10 i 50 μ M) pobierając materiał roślinny w dwóch punktach czasowych, tj. w 24 i 72 godz.. Wyniki badań przedstawione przez Doktoranta w pierwszej oryginalnej publikacji pt. „Canavanine-induced decrease in nitric oxide synthesis alters activity of antioxidant system but does not impact S-nitrosoglutathione” opublikowanej w *Frontiers in Plant Science* pokazują hamujący wpływ kanawaniny na drogę syntezy NO zależną od argininy, stymulujący wpływ kanawaniny na całkowitą zdolność antyoksydacyjną i wzrost całkowitej zawartości tioli, obniżenie poziomu S-nitrozoglutationu, brak zmian w profilu izoenzymatycznym dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT). Ponadto Doktorant wykazał, że kanawanina zarówno w niższym jak i wyższym stężeniu powodowała wzrost poziomu białka reduktazy S-nitrozoglutationu (GSNOR) w badanych punktach czasowych, pomimo że aktywność tego enzymu we wczesnym etapie prowadzenia kultur pod wpływem kanawaniny była niższa niż w kontroli. Jedynie pokazano, że poziom transkryptu dla *GSNO* przy niższym stężeniu kanawaniny był skorelowany z wyższym poziomem białka w badanym materiale. W prezentowanej pracy znajdują się także wyniki badań dotyczące identyfikacji białek podlegających nitracji po egzogennym podaniu kanawaniny.

Na podstawie wyżej wspomnianych przeze mnie wyników badań, które Doktorant przedstawił w pierwszej oryginalnej publikacji w *Frontiers in Plant Science* na docenienie zasługują następujące wyniki:

- wykazanie, że L-kanawanina może być stosowana jako inhibitor zależnej od argininy drogi biosyntezy tlenu azotu w korzeniach siewek pomidora,
- określenie zmian aktywności reduktazy S-nitrozoglutationowej i przeanalizowanie odpowiedzi transkrypcyjnej genu *GSNOR* w odpowiedzi korzeni siewek pomidora na kanawaninę,
- pokazanie, jakie białka podlegały potranslacyjnej modyfikacji z udziałem RNS, tj. nitracji w korzeniach siewek pomidora w wyniku oddziaływania kanawaniny. Jest to pierwsze doniesienie w literaturze,
- określenie profili ekspresyjnych pięciu genów dysmutazy ponadtlenkowej (*MnSOD*, *FeSOD*, *SODCP.2*, *SOD3*), trzech genów katalazy (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*), dwóch genów reduktazy

glutationowej (*GR*, *GRI*) i pięciu genów peroksydazy glutationowej (*GPXle-1*, *GPXle-2*, *GSHPx1*, *pGPx8*, *GPx*) traktowanych kanawaniną.

Mam kilka uwag dotyczących tej części pracy doktorskiej:

1. Konkluzja przedstawiona przez Doktoranta w abstrakcie cytuję „We demonstrated that monodehydroascorbate reductase, activity of which is inhibited in roots of CAN-treated plants, is the protein preferentially modified by tyrosine nitration.” W prezentowanej pracy nie oznaczano aktywności tego enzymu, jedynie zidentyfikowano jakie białka podlegały nitracji, zatem proszę o wyjaśnienie

2. Wykonano identyfikację nitrowanych białek po egzogennym podaniu kanawaniny. Dlaczego w Tabeli 3 nie pokazano wyników dla kontroli, a tylko dla korzeni rosnących w 10 i 50 μM roztworze kanawaniny?

3. Dlaczego materiał roślinny prowadzono w wodzie, a nie zastosowano pożywki?, czy wcześniej wykonywano testy sprawdzające?

4. Zdjęcie przedstawiające wzrost siewek pomidora dla układu doświadczalnego na którym pracował Doktorant, pokazane w obu publikacjach wchodzących w skład dysertacji, tj. w pierwszej opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* w 2019 i drugiej opublikowanej w czasopiśmie *Plants* w 2020 było przedstawione także w publikacji opublikowanej wcześniej w 2016 roku w *Frontiers in Plant Science* pt. „Canavanine alters ROS/RNS level and leads to post-translational modification of proteins in roots of tomato seedlings” Urszula Krasuska i wsp.. Zatem wyniki dotyczące wzrostu siewek pomidora były już opublikowane przez zespół Pani prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej, zatem nie może to być jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej,

5. Rozdziały katalazy w żelu polyakrylamidowym są bardzo słabo czytelne, na zymogramie różnice pomiędzy wariantami są słabo widoczne, a zatem na podstawie prezentowanych obrazów należałoby wnioskować o wpływie kanawaniny na profil izoenzymatyczny,

7. Opracowanie statystyczne wyników badań powinno być bardziej rozszerzone, należało zastosować analizę wariancji i korelacji badanych cech

W drugiej pracy doświadczalnej pt. „Canavanine increases the content of phenolic compounds in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) roots”, Doktorant przedstawił stymulujący wpływ kanawaniny na zawartość związków fenolowych i względną zawartość flawonoidów, szczególnie wyższy poziom tych metabolitów był obserwowany przy wyższym stężeniu L-kanawaniny. Dodatkowo pokazano wpływ tego niebiałkowego aminokwasu na lokalizację flawonoidów w korzeniach. Poza tym Doktorant wykazał stymulujący wpływ L-kanawaniny na aktywność amoniakolizy fenyloalaniny (PAL), kluczowy enzym inicjujący szlak

fenylopropanoidowy na drodze którego zachodzi biosynteza flawonoidów i określił profil izoenzymatyczny oraz aktywność oksydazy polifenolowej (PPO)- enzymu, który katalizuje pierwszą fazę biochemicznej przemiany związków fenolowych do chinonów, które dalej polimeryzują do nierozpuszczalnych polimerów melanin.

W mojej opinii na docenienie zasługuje zbadanie przez Doktoranta zmian stopnia ekspresji czterech genów kodujących oksydazę polifenolową (*PPOA*, *PPOB*, *PPOD* i *PPOE*) i sześciu genów kodujących amoniakoliazę fenyloalaninową (*PAL1*, *PAL2*, *PAL3*, *PAL4*, *PAL5* i *PAL6*) w korzeniach siewek pomidora poddanych oddziaływaniu tego toksycznego aminokwasu.

Ponadto uważam, że w celu określenia lokalizacji flawonoidów w korzeniach siewek pomidora stosując mikroskopię konfokalną należało zastosować większe powiększenie, tak aby pokazać, gdzie rzeczywiście występuje nagromadzenie tych metabolitów w komórkach korzeni w odpowiedzi na L-kanawaninę.

Z kolei określenie aktywności enzymu PAL i wnioskowanie na tej podstawie o metabolizmie związków fenolowych jest zbyt daleko idące i nie w pełni uzasadnione, należałoby określić aktywność także innych enzymów z tego szlaku.

Prace doświadczalne wchodzące w skład dysertacji pokazują, że Doktorant opanował metody badawcze takie jak oznaczanie aktywności enzymatycznej spektrofotometrycznie, izolację białek, elektroforezę w warunkach natywnych, elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), wykonanie Western-blottingu, qRT-PCR, techniki immunofluorescencyjne, badanie lokalizacji wybranych metabolitów stosując laserową mikroskopię konfokalną i pomiary stężenia wybranych związków metodą spektrofotometryczną.

W dwuautorskiej pracy przeglądowej opublikowanej w 2020 roku w czasopiśmie *Plants* pt. „Peroxynitrite induced signaling pathways in plant response to non-proteinogenic amino acids”, mgr Staszka przedstawił także wynik doświadczalny pokazujący poziom 8-nitroguaniny (8-NO₂-G), uznawanej za marker nitracji kwasów nukleinowych. Wzmóženemu generowaniu nadtlenoazotynu (ONOO⁻) we wcześniejszym punkcie czasowym (24 godz. od momentu podania L-kanawaniny) towarzyszył spadek nitrowania RNA w odpowiedzi na kanawaninę. Należy podkreślić, że jest to trzecie doniesienie w publikowanej literaturze, co zasługuje na docenienie. Zatem nitracja kwasów nukleinowych wymaga dostarczenia kolejnych dowodów doświadczalnych, ponieważ jest stosunkowo słabo poznana u roślin. Powyższy wynik otrzymany przez mgr Pawła Staszka jest przeciwstawny do wyników otrzymanych przez inne grupy badawcze, które wykazały, że generowaniu ONOO⁻ u roślin towarzyszyło wzmóżone nitrowanie nie tylko białek, ale także kwasów nukleinowych tj. RNA i mRNA.

Pragnę nadmienić, że na uwagę zasługuje także pierwsza praca przeglądowa opublikowana przez Doktoranta w 2017 roku w *Phytochemistry Reviews* pt. „L-Canavanine: How does a simple non-protein amino acid inhibit cellular function in a diverse living system?”. Jak już wcześniej wspomniałam Doktorant jest pierwszym autorem w tej pracy, co wskazuje na Jego dominującą i kreatywną rolę w przygotowywaniu publikacji. Z pewnością przygotowanie powyższej publikacji przeglądowej pozwoliło Doktorantowi na zdobycie wiedzy o kanawaninie jako inhibitorze syntazy tlenku azotu (iNOS), enzymu odpowiedzialnego w komórkach zwierzęcych za syntezę NO z argininy i substancji toksycznej powodującej obniżenie poziomu NO i wzrost stresu oksydacyjnego w komórkach zwierzęcych. To było przesłanką dla Doktoranta do sprawdzenia toksyczności tego aminokwasu w komórkach roślinnych, a dokładnie jego wpływu na przemiany metaboliczne związane ze stresem nitozacyjnymi i oksydacyjnym.

W podsumowaniu rozprawa doktorska mgr Pawła Staszka, przedstawiona jako cykl monotematycznych publikacji naukowych spełnia wszystkie wymogi formalne na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669).

Badania prezentowane w ramach dysertacji są interesujące i nowatorskie. Doktorant podczas przygotowywania publikacji przeanalizował bogatą literaturę, co świadczy o dobrej orientacji w problematyce badawczej. Ważnym jest także fakt, że Doktorant zdobył samodzielne finansowanie na prowadzenie badań w ramach konkursu PRELUDIUM i brał udział w realizacji innych projektów badawczych. Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Pawła Staszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę duży nakład pracy Doktoranta w opublikowanie wyników badań i fakt, że w oryginalnych publikacjach jest autorem korespondującym wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

J. Morkunas

Prof. dr hab. Iwona Morkunas