

Warszawa, 18 maja 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Napieraj
pt.: "Rola poliamin w biosyntezie tlenku azotu w reakcji roślin na stres solny"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Natalii Napieraj pt. "Rola poliamin w biosyntezie tlenku azotu w reakcji roślin na stres solny" została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Redy, prof. UWr. w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca jest bardzo obszernym opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 221 stronach maszynopisu, zawiera 64 ryciny oraz 11 tabel. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje: przegląd literatury (zatytułowany jako Wstęp), cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, podsumowanie, wnioski, streszczenie (abstrakty) pracy w języku polskim i angielskim, oraz spis literatury (Bibliografia) obejmujący 309 pozycji. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów oraz spis rycin i tabel.

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie
Instytut Biologii
Katedra Fizjologii Roślin

prof. dr hab. Agnieszka
Gniazdowska-Piekarska

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 325 10
+48 22 59 325 30
agnieszka_gniazdowska@sggw.edu.
pl
www.sggw.pl

Zagadnienia poruszone w pracy doktorskiej dotyczą dróg biosyntezy tlenku azotu (NO) w korzeniach roślinach poddanych działaniu stresu solnego oraz wpływu poliamin na biosyntezę NO w korzeniach. **Nadrzędnym celem** recenzowanej rozprawy było określenie czy egzogenne poliaminy, w tym głównie putrescyna (Put) wpływają na aktywność reduktazy azotanowej w korzeniach siewek ogórka jako głównego źródła NO i jak zmienia się rola poliamin w tym procesie w warunkach stresu solnego.

Doktorantka oznaczyła poziom emisji NO tkankach, aktywność reduktazy azotanowej (NR), plazmolemowej reduktazy azotanowej (PM-NR), aktywność NOS-podobną (NOS-like), S-nitrozylację reduktazy azotanowej i wzór S-nitrozylacji białek cytoplazmatycznych korzeni oraz przeprowadziła analizę ekspresji genów kodujących reduktazę azotanową (*CsNR1*, *CsNR2*, *CsNR3*) i komponent redukujący amidoksym (*CsARC*). W prowadzonych doświadczeniach zbadała związek pomiędzy aplikacją egzogennych poliamin (Put), stresem solnym (1, 2, 24 godz.) i emisją NO w korzeniach siewek ogórka. Biorąc pod uwagę kontrowersje dotyczące dróg biosyntezy NO w komórkach roślin, stosunkowo nieliczne prace odnoszące się do znaczenia poliamin jako ewentualnych źródeł NO lub udziału poliamin w regulacji syntezy NO, a także pojawiające się w ostatnim okresie doniesienia o znaczeniu molibdoenzymów w produkcji NO u roślin, prezentowana rozprawa doktorska bardzo dobrze wpisuje się w światowy nurt tej tematyki.

Część teoretyczna pracy - **wstęp literaturowy, zajmujący 37 stron** - jest napisana jasnym, starannym i poprawnym językiem naukowym. Zwraca uwagę dbałość autorki o poprawność używanych sformułowań i czystość języka polskiego. Ten rozdział pracy świadczy o ogólnej wiedzy teoretycznej kandydatki i dobrej znajomości literatury dotyczącej zarówno reakcji roślin na stres solny jak też zagadnień związanych z biosyntezą i sygnałową funkcją NO u roślin. Na podkreślenie zasługuje dobre wyważenie proporcji informacji zawartych w poszczególnych podrozdziałach, wystarczające do dalszego śledzenia wyników badań, ich interpretacji i wyciągania odpowiednich wniosków. W pierwszej kolejności Doktorantka opisała reakcję roślin na stres solny uwzględniając przede wszystkim mechanizmy umożliwiające tolerancję stresu, w tym zwróciła uwagę na działanie komórkowego systemu antyoksydacyjnego, oraz czynniki transkrypcyjne pełniące kluczową rolę w regulacji ekspresji genów odpowiedzi na stresy abiotyczne (ZFPs, MYB, DREB, NAC, WRKY). Stosunkowo dużo miejsca poświęciła przedstawieniu dróg biosyntezy NO oraz syntetycznie opisała mechanizm działania tej cząsteczki u roślin poddanych działaniu stresu. Podsumowała dostępną wiedzę dotyczącą korzystnego wpływu aplikacji donorów NO na rośliny eksponowane na stres solny. Zaprezentowane we wstępie dane, w szczególności podrozdziały poświęcone reduktazie azotanowej, plazmolemowej reduktazie NO₂:NO oraz innym enzymom zawierającym domenę MoCo (tzw. molibdoenzymom) stanowią dobry punkt wyjścia dla przedstawionego w dysertacji celu pracy. Podrozdział dotyczący poliamin, nie jest bardzo obszerny, lecz większość danych literaturowych wiążących poliaminy

z NO została wykorzystana w rozdziale dyskusja, a we wstępie autorka umieściła tylko podstawowe informacje o tej grupie regulatorów wzrostu. Rozdział "Wstęp" zawiera 8 bardzo przejrzystych rycin, część z nich np. ryc. 1-3 stanowią podsumowanie wielu prac, co świadczy o nabyciu przez Doktorantkę umiejętności uogólniania i syntezy.

Po przeczytaniu, tej części rozprawy nasuwają mi się pewne drobne uwagi. Na rycinie 2 uszeregowano od 1 do 5 korzystne efekty działania NO na rośliny w warunkach stresu solnego. Czy Autorka uważa, że podana na rycinie kolejność odzwierciedla wagę/znaczenie tego działania? Proszę o krótki komentarz. W rozdziale 1.3 "Ścieżki produkcji NO u roślin", Doktorantka pisze o zwiększonej biosyntezie NO w warunkach stresu abiotycznego. Czy rzeczywiście we wszystkich podanych przykładach możemy mówić że oznaczono produkcję/biosyntezę NO czy raczej emisję tego gazu? W podsumowaniu wstępu literaturowego mgr Natalia Napieraj wspomina o możliwościach wykorzystania donorów NO w produkcji rolnej. Prosiłabym o wyjaśnienie tej kwestii i ewentualnie uzupełnienie, na którym z etapów wzrostu roślin można byłoby ewentualnie stosować donory NO na skalę produkcyjną i czy widzi jakieś przeszkody stosowania donorów NO w rolnictwie?

W rozdziale **cel pracy** sformułowano 3 podstawowe zadania badawcze:

1. Charakterystykę produkcji NO ze szczególnym uwzględnieniem szlaku zależnego od aktywności NR w korzeniach siewek ogórka poddanych stresowi solnemu przez 1, 2 i 24 godz.
2. Analizę wpływu egzogennej Put na emisję NO, wybrane ścieżki biosyntezy NO i regulację aktywności NR w korzeniach ogórka rosnącego w warunkach kontrolnych.
3. Określenie wpływu egzogennej Put na emisję NO, wybrane ścieżki biosyntezy NO i regulację NR w korzeniach siewek ogórka podczas stresu solnego trwającego 1, 2 i 24 godz.

Postawiono też 4 hipotezy badawcze. Szkoda, że w podsumowaniu pracy zabrakło jednoznacznego odniesienia do postawionych hipotez.

W rozdziale **Materiały i Metody** opisano materiał badawczy - warunki prowadzenia kultury siewek ogórka oraz stosowane w trakcie badań metody pozwalające na oznaczanie emisji NO, aktywności: NR, plazmolemowej NR, NOS-like, izolację plazmolemy, analizę ekspresji genów kodujących NR i ARC, oznaczenie S-nitrozylacji (metoda podstawienia biotynowego). Szeroki zakres użytych metod jest niewątpliwym atutem dysertacji, a ich dobór jest zasadny.

Zastosowane metody są adekwatne do postawionych celów i nowoczesne. Opis poszczególnych metod jest prawidłowy i umożliwia łatwe powtórzenie doświadczeń, stanowi zatem cenne źródło informacji, na którym można będzie bazować prowadząc dalsze prace dotyczące podjętej tematyki. Ten rozdział świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia i projektowania pracy naukowej przez Kandydatkę. Bardzo przydatna jest tabela 3 zawierająca opis jak traktowane były siewki ogórka w prowadzonych badaniach. Na podkreślenie zasługuje fakt wykonania analizy S-nitrozylacji w laboratorium dr Romero-Puertas w Granadzie (Hiszpania), jednym z wiodących w świecie, co gwarantuje wysoką jakość uzyskanych danych.

Rozdział **Wyniki** to najobszerniejsza część dysertacji, mieszcząca się na ponad 70 stronach. W pierwszej części Doktorantka dokumentuje wybór stężenia soli oraz Put jako podstawowej poliaminy stosowanej w badaniach. Ten fragment pracy doktorskiej wymagał wykonania wielu doświadczeń i analizy emisji NO w korzeniach siewek ogórka. W toku badań wybrano 120 mM NaCl jako stresor stymulujący emisję NO w korzeniach niezależnie od czasu ekspozycji roślin na stresor. Putrescyna (1 mM) jako jedyna z testowanych poliamin po 1, 2 i 24 godzinach zwiększała emisję NO w korzeniach siewek kontrolnych (nie poddanych stresowi soli). W pracy doktorantka nie wyjaśniła na jakiej podstawie dokonała wyboru stężenia podawanych poliamin. Proszę o informację czy poliaminy (Put, Spm, Spd) stosowano także w innych stężeniach niż 1 mM. W kolejnym etapie w korzeniach które były pre-traktowane Put i poddane działaniu stresu soli lub równocześnie traktowane NaCl i Put bądź traktowane Put zarówno przed jak i w trakcie stresu soli przeanalizowano emisję NO. Podanie Put przy ekspozycji korzeni na NaCl przez 1 lub 2 godziny generalnie obniżało emisję NO. Przy przedłużającym się stresie soli (24 godz.) podanie Put stymulowało emisję NO. Podanie inhibitorów biosyntezy Put, hamowało wzrost emisji NO w korzeniach. W kolejnym etapie Doktorantka zbadała wpływ inhibitorów podstawowych dróg biosyntezy NO (NR i NOS-like) na emisję NO w korzeniach siewek ogórka w obecności Put i w warunkach zasolenia, wykazując pośrednio zaangażowanie obu aktywności w produkcję NO w warunkach stresu soli.

Kolejne analizy dotyczyły wyznaczenia aktywności całkowitej i aktualnej NR, oraz stanu aktywacji enzymu, a także aktywność plazmolemowej NR, przy czym zmiany aktywności były różne w zależności od czasu ekspozycji roślin na stres soli. Aktywność całkowita i aktualna NR znacząco rosła w stresie soli z jednoczesnym podaniem PTIO - zmiatacza NO w porównaniu do

siewek poddanych tylko stresowi zasolenia, podobną tendencję, nieco słabiej zaznaczoną obserwowano przy zastosowaniu inhibitora NOS - L-NAME. Aktywność podobna do NOS nie była znacząco zmieniona przez Put w warunkach stresu soli, poza obserwowanym wzrostem aktywności po 24 godzinnej ekspozycji jednocześnie na NaCl i Put poprzedzonej pre-traktowaniem korzeni Put.

Ciekawym aspektem recenzowanej dysertacji jest analiza bioinformatyczna potencjalnych miejsc *S*-nitrozylacji NR, która wykazała, że reszty cysteiny które mogą podlegać tej modyfikacji są zlokalizowane w domenie stanowiącej kofaktor molibdenowy, cytochrom b5 oraz domenie reduktazy cytochromu b5. Jednak prowadzona następnie detekcja *S*-nitrozylacji NR metodą podstawienia biotynowego dała efekt negatywny zarówno u roślin kontrolnych jak i traktowanych NaCl, potwierdzony dodatkowo analizą wzoru *S*-nitrozylacji białek cytoplazmatycznych. Po 24 godzinach ekspozycji roślin na sól zaobserwowano około 10% obniżenie poziomu *S*-nitrozylacji białek w porównaniu do próby kontrolnej.

Dyskusja jest przeprowadzona logicznie, w oparciu o uzyskane wyniki. Polemika bądź powołanie się na dane literaturowe wskazują na dobrą znajomość literatury przedmiotu. Na szczególną pochwałę zasługują trzy ryciny 59, 61, 63 prezentujące modele syntezy NO w korzeniach siewek ogórka, odpowiednio w warunkach stresu solnego, po aplikacji Put oraz po podaniu Put w stresie solnym. Ryciny te stanowią syntetyczne podsumowanie prowadzonych przez Doktorantkę badań i są dobrą graficzną ilustracją weryfikacji postawionych na wstępie hipotez badawczych. Na stronie 163 Doktorantka stara się tłumaczyć negatywną regulację PM-NR w warunkach stresu solnego indukcją stresu oksydacyjnego. Prosiłabym o wyjaśnienie czy w badanym materiale roślinnym były oznaczane podstawowe parametry stresu oksydacyjnego? A jeśli tak, to proszę o ich krótkie przedyskutowanie w kontekście zmian emisji NO wykazanych w pracy, które w rezultacie mogą prowadzić do powstania stresu nitro-oksydacyjnego i wpływać na aktywność wielu enzymów. Znaczną część dyskusji poświęciła doktorantka na analizę regulacji aktywności NR w wyniku odwracalnej fosforylacji/defosforylacji białka. Przy czym rozważania te przeprowadziła zakładając zgodnie z publikacjami Kaisera i wsp., że zmiany poziomu fosforylacji oraz ilość formy nieufosforylowanej dpNR można śledzić analizując stosunek aktywności aktualnej do całkowitej enzymu, a stan aktywacji wyznaczany na podstawie tych dwóch mierzonych aktywności pozwala na oszacowanie puli dpNR w stosunku do całkowitej puli enzymu w tkance. Syntetyczne podsumowanie regulacji aktywności NR przez

fosforylację/defosforylację na tle zmian ekspresji genów kodujących NR w warunkach kontrolnych, stresu soli i po podaniu Put zobrazowano na rycinach 60, 62 i 64, co niewątpliwie ułatwia recenzentowi podążanie za tokiem rozumowania Doktorantki. Czy dla potwierdzenia znaczenia fosforylacji/defosforylacji NR w badanym układzie doświadczalnym nie planowała Autorka np. oznaczeń western-blott z przeciwciałami anty-NR i anty-pNR czy też oznaczeń aktywności kinazy /fosfatazy lub użycia inhibitorów tych enzymów, które dałyby uzasadnienie do mocnego stawiania wniosków nr 3 i 4 w niniejszej dysertacji?

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Napieraj pt. "Rola poliamin w biosyntezie tlenku azotu w reakcji roślin na stres solny" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiona do oceny praca dobrze wpisuje się we współczesne, wieloaspektowe rozważania dotyczące biosyntezy NO w komórkach roślinnych oraz rolę poliamin i NO w reakcji roślin na stres w tym w szczególności stres solny. Pani mgr Natalia Napieraj wykazała umiejętności w zakresie posługiwania się różnorodnymi metodami badawczymi, a sposób opracowania rozprawy i swoboda poruszania się w omawianym temacie świadczą o samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki.

Z powinności recenzenta przytaczam niektóre z zauważonych błędów edytorskich i niedociągnięć językowych, które jednak nie obniżają mojej pozytywnej oceny recenzowanej dysertacji. Doktorantka w całej pracy używa słowa "jon" przed symbolem jonu np. Na^{2+} , NO^{2-} , Ca^{2+} , co nie jest poprawne, bo stosowany zapis jonu, wskazuje że cząsteczka o której mowa jest jonem. Podobnie stosowanie zapisu genu czcionką pochyłą (kursywą) sprawia, że nie ma potrzeby używać przed symbolem genu słowa gen np. str. 43 ...genu *NIA2*. Doktorantka pisząc o danej roślinie po raz pierwszy w pracy czasami używa tylko nazwy łacińskiej bez podania odpowiednika w języku polskim, a niekiedy podaje tylko nazwę polską.

str. 24 - sformułowanie "U roślin można wyróżnić stresy abiotyczne i biotyczne" - jest niefortunne, gdyż stresy nie występują u roślin lecz w środowisku, a roślina jest narażona na działanie stresorów.

str. 25 - podobnie zdanie "Obecność stresu solnego prowadzi do..." - powstaje pytanie czy można mówić o obecności stresu, raczej można mówić o obecności czynnika stresowego.

str. 25 - rycina 1. Powinno być: zahamowanie aktywności enzymów; można dyskutować ze stwierdzeniem "ograniczenie fotosyntezy poprzez zmniejszoną akumulację barwników fotosyntetycznych" oraz stwierdzeniem "akumulacja ROS" - cząsteczki należące do ROS mają bardzo krótki okres półtrwania - zamiast akumulacji lepiej mówić o nadprodukcji lub indukcji stresu oksydacyjnego.

str. 27 - Autorka stwierdza, że stres może pojawiać się nagle lub stopniowo, co może powodować inną odpowiedź fizjologiczną i angażować inne mechanizmy percepcji - proszę o wytłumaczenie co Doktorantka miała na myśli pisząc o różnych mechanizmach percepcji i czy rzeczywiście chodzi o różny mechanizm percepcji?

str. 30 - wkradły się tu niefortunne sformułowania "... w celu zachowania odpowiedniego pobierania wody..." czy "W literaturze opisano kilka hormonów roślinnych."

str. 31 - Autorka stwierdza, że komórkowy metabolizm antyoksydacyjny pełni kluczową rolę w detoksykacji ROS w warunkach stresu solnego. Działanie systemu antyoksydacyjnego odnosi się do warunków każdego stresu, nie tylko zasolenia.

str. 32 - Doktorantka pisze o genach związanych z odpowiedzią lub genach zaangażowanych w przekazywanie sygnału. Geny jako takie nie uczestniczą w przekazywaniu sygnału, nie są też związane z odpowiedzią.

str. 33 - Pierwsze zdanie podrozdziału "przekazywanie sygnału NO u roślin" jest dużym uproszczeniem, a doktorantka powołuje się w tym miejscu na stosunkowo starą literaturę. Proponowałabym powołanie się na publikacje np. ze Special issue *Plants* (ISSN 2223-7747) z 2020 roku.

str. 36 - w zdaniu "Aplikacja donora NO... m.in. stężenia CO₂ ...", pominięto słowo wewnątrzkomórkowego.

W rozdziale Materiały i Metody doktorantka niekiedy nieprawidłowo używa słowa "hodowla" w odniesieniu do "kultury" siewek ogórka np. na str. 64, 67, 70. Słowo hodowla, zamiast kultura pojawia się także w wielu miejscach w opisie wyników.

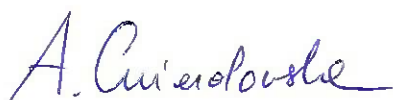
Inne drobne uwagi edytorskie zaznaczono w tekście rozprawy.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Napieraj pt. "Rola poliamin w biosyntezie tlenu azotu w reakcji roślin na stres solny", przygotowywana pod opieką dr hab. Małgorzaty Redy, prof.

UWr., stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na podstawie ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669 z późn. zmianami). Badania prezentowane w ramach dysertacji są interesujące i nowatorskie oraz wpisują się w najnowszy nurt zagadnień dotyczących regulacji biosyntezy NO w tkankach roślinnych i wskazują na znaczenie Put i NR w tym procesie w warunkach stresu soli. Doktorantka podczas przygotowywania dysertacji zastosowała różnorodne metody i przeanalizowała bogatą literaturę, co świadczy o dobrej orientacji w problematyce badawczej i ogólnej wiedzy teoretycznej.

Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Natalii Napieraj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska