

Prof. dr. hab. inż. Ewa Niewiadomska

Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* PAN w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Napieraj pt „Rola poliamin w biosyntezie tlenu azotu w reakcji roślin na stres solny”

Wartość naukowa rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Napieraj koncentruje się na złożonym mechanizmie syntezy tlenu azotu w roślinach. Niniejsza praca dostarcza nowych cennych informacji na temat zaangażowania różnych szlaków syntezy NO w korzeniach siewek ogórka w odpowiedzi na zasolenie. Podstawowa trudność w ocenie NO polega przede wszystkim na braku specyficznej metody detekcji, gdyż ze względu na posiadanie niesparowanego elektronu tlenek azotu łatwo wchodzi w reakcje chemiczne polegające na oddaniu lub pobraniu elektronu i jest zaliczany do rodników. Doktorantka poradziła sobie z tym problemem stosując dwie różne metody detekcji (z barwnikiem fluorescencyjnym diocetanem diaminofluoresceiny DAF-2 DA oraz z tzw. odczynnikiem Griessa) i wykazując dosyć wysoką zgodność pomiędzy nimi. To stanowi mocny argument przekonujący o jakości naukowej uzyskanych wyników. Kolejna trudność w analizie biosyntezy NO polega na wielu możliwych szlakach syntezy, z czego część jest dobrze poznana, a część jest niemal hipotetyczna. Doktorantka w niniejszej rozprawie konsekwentnie przeanalizowała wszystkie te szlaki, dodając do tej analizy najbardziej nowatorski aspekt – ocenę modyfikacji tych szlaków przez wybraną poliaminę. Tak bogaty schemat eksperymentalny przekłada się na różnorodność zastosowanych metod i mnogość uzyskanych wyników.

Niniejsza rozprawa jest opracowaniem bardzo obszernym – liczy 221 stron. Zamieszczono w niej 64 ryciny i 11 tabel, a wszystkie przygotowano z wielką dbałością o przekaz naukowy i o szatę graficzną. Dosyć rozbudowany schemat badawczy pracy został ujarzmiony w postaci rozbudowanego (6 stron) ale jednak przejrzystego spisu treści. Praca zawiera wykaz skrótów i dwustronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Opisano w nich skrótowo tok eksperymentalny i otrzymane wyniki. Wstęp (38 stron) w sposób wnikliwy i atrakcyjny przedstawia aktualny stan wiedzy na temat syntezy i roli NO oraz poliamin w reakcjach stresowych roślin. Należy docenić bardzo ciekawe i oryginalne schematy które ułatwiają poznanie: toksyczności stresu solnego, mechanizmu działania NO i ścieżek jego syntezy, budowy i regulacji aktywności reduktazy azotanowej (NR), prawdopodobnej interakcji pomiędzy NR i komponentem redukującym amidoksym (ARC), i metabolizmu poliamin. Dobrym punktem wyjścia dla części eksperymentalnej jest precyzyjne sformułowanie 3 celów badawczych i 4 nowatorskich hipotez.

W rozdziale Materiał i Metody (25 stron) poszczególne metody zostały opisane bardzo starannie i szczegółowo, co wskazuje na gruntowne zrozumienie warsztatu metodycznego. Tu także zamieszczono szereg schematów przedstawiających: mechanizm detekcji NO za pomocą barwnika DAF-2 DA i odczynnika Griessa, zasadę oznaczania aktywności i stanu aktywacji NR, schemat podstawienia biotynowego w celu wykrycia reszt nitrozylowanych. Rozdział Wyniki, przedstawiony na 74 stronach maszynopisu, konsekwentnie prowadzi czytelnika przez wszystkie etapy eksperymentu. W pierwszym

etapie badań zoptymalizowano układ eksperymentalny pod kątem natężenia i czasu oddziaływania stresu solnego i stymulacji syntezy NO, a także oceniono efekty aplikacji 4 wybranych poliamin w odniesieniu do produkcji NO, co doprowadziło do wyboru putrescyny (Put). Poprzez zastosowanie inhibitorów, przetestowano udział endogennej Put, NR i innych molibdoenzymów, oraz enzymu podobnego do zwierzęcej syntazy NOS (nazywanego w dalszej części recenzji skrótowo „NOS-like”) w syntezie NO. Następnie oceniono aktywność enzymu NR (obecnego w cytozolu oraz związanego z plazmalemą) z wykorzystaniem specyficznej metody poprzez ustalenie udziału form nieufosforylowanej i ufosforylowanej, a także formy nieaktywnej, związanej z białkiem 14-3-3. Oceniono także zmiany ekspresji genów dla wybranych molibdoenzymów (NR i ARC). W większości z w/w analiz przetestowano także wariant aplikacji Put. W dalszej kolejności zweryfikowano, czy zastosowanie egzogenego donora NO oraz zmiatacza NO wpływa na poziom NO i na aktywność NR. A także zweryfikowano, czy NO produkowany przez enzym „NOS-like” może uczestniczyć w hamowaniu aktywności NR. W celu wyjaśnienia mechanizmu hamowania aktywności NR przez NO przetestowano czy za ograniczenie aktywności NR przez NO może odpowiadać S-nitrozylacja tego białka. Warto zauważyć, że tę ostatnią analizę Doktorantka przeprowadziła we współpracy międzynarodowej, w trakcie pobytu w stacji badawczej EEZ-CSIC w Grenadzie (Hiszpania) w ramach projektu Erasmus.

Rozdział Dyskusja (33 strony) stanowi dojrzałe opracowanie naukowe, w którym dokonano analizy uzyskanych wyników na tle literatury światowej. W syntetycznej analizie uzyskanych wyników pomaga 6 klarownych schematów. Na tej podstawie sformułowano 10 wniosków, których lektura budzi jednak mój niedosyt. Wprawdzie skrótowo opisują one poszczególne uzyskane wyniki ale w sposób oderwany od siebie. Brakuje mi tu dokonania spójnej syntezy. Ponadto, w mojej ocenie, rola putrescyny przedstawiona we wnioskach 7-10 powinna być opisana nieco ostrożniej. Mam tu na myśli unikanie określeń nadających wyrażnie przyczynowo-skutkowy charakter takich jak np. „Put reguluje produkcję NO..”, gdyż nie można jednoznacznie wykluczyć że są to efekty wtórne. Spis literatury obejmuje 309 pozycji. Autorka uwzględniła zarówno prace pionierskie jak i te najnowsze.

Pracę cechuje nadzwyczaj wysoka dbałość o stronę redakcyjną i o szatę graficzną. Mogę jedynie zauważyć, że przy tak obszernym opracowaniu rozdziały najwyższego rzędu, czyli takie jak Wyniki i Dyskusja, warto byłoby zacząć od nowej strony.

Najważniejsze wyniki

Do najważniejszych wyników niniejszej pracy doktorskiej zaliczam:

- 1/ Udokumentowanie dwoma metodami, że zasolenie zwiększa syntezę NO w korzeniach siewek ogórka, przy czym zmiany te są zależne od czasu trwania stresu.
- 2/ Wykazanie, że egzogenna putrescyna może zwiększać syntezę NO zarówno w stresie solnym jak i w warunkach nie stresowych.
- 3/ Stwierdzenie udziału różnych ścieżek syntezy NO w stymulacji wywołanej zasoleniem. W szczególności udokumentowano aktywację: ścieżki syntezy NO zależnej od NR oraz od innych molibdoenzymów, enzymu „NOS-like” i ścieżki syntezy zależnej od endogennych poliamin. Aczkolwiek zaangażowanie tych szlaków było różne w zależności od czasu trwania stresu solnego.

4/ Zweryfikowanie, że aktywność PM-NR nie bierze udziału w stymulacji produkcji NO w wyniku zasolenia, a aktywność cytozolowej NR jest istotna tylko w szybkiej reakcji na stres (1 h).

5/ Wykazanie, że aktywność NR jest inhibowana przez zwiększony poziom NO, a inhibicja ta nie zachodzi poprzez nitrozylację białka NR.

6/ Stwierdzenie, że dwa ważne szlaki syntezy NO (szlak NR i szlak „NOS-like”) są ze sobą negatywnie sprzężone, gdyż inhibicja enzymu „NOS-like” prowadzi do wzrostu aktywności NR.

Uwagi krytyczne i sugestie

1/ Nie było dla mnie jasne z czego może wynikać produkcja NO obserwowana w warunkach nie stresowych.

2/ W analizie wpływu molibdenianu na aktywność NR (Ryc. 43) zabrakło mi wariantu „-Put + wolframian”. Myślę, że byłby on dobrą dodatkową kontrolą metody aktywności NR. Byłoby to szczególnie istotne w obliczu braku wpływu wolframianu na aktywność NR w roślinach poddanych stresowi solnemu (Ryc. 44) oraz braku wpływu wolframianu na produkcję NO w roślinach kontrolnych (Ryc. 28-30).

3/ W Dyskusji zabrakło mi omówienia hipotetycznych efektów redoksoowych. Trzeba bowiem zauważyć, że dwa szlaki syntezy NO, z wykorzystaniem jonów azotanowych (szlak NR) oraz z argininy (enzym „NOS-like”), wykorzystują NAD(P)H jako substrat zredukowany. Konkurencja o ten sam substrat może być zatem jedną z możliwych przyczyn stymulacji aktywności NR po inhibicji enzymu „NOS-like” (Ryc. 54-55).

4/ Biorąc pod uwagę różnorakie efekty aplikacji Put (wpływ na ekspresję genu *CsNR3*, wpływ na aktywność NR poprzez fosforylację/defosforylację, wpływ na aktywność innych molibdoenzymów, wpływ na aktywność „NOS-like”, wpływ na poziom NO w kontroli), a także biorąc pod uwagę zróżnicowany wpływ Put na całkowitą aktywność NR w zależności od czasu trwania stresu (po 1 h – hamowanie, po 2 h - brak wpływu, po 24 h – stymulacja), w moim przekonaniu należałoby w pierwszej kolejności rozważyć jej oddziaływanie wtórne poprzez zaburzenie równowagi oksydo-redukcyjnej i zmiany aktywności antyutleniaczy.

Pragnę jednak zaznaczyć, że wszystkie moje uwagi to jedynie wskazówki do ewentualnego uwzględnienia przy opracowaniu publikacji z tych wyników. Z pewnością duża część tych wyników znajdzie swoje miejsce w manuskrypcie przeznaczonym do druku.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że oceniana praca pod względem poziomu merytorycznego i wartości poznawczej, zasługuje na wysoką ocenę. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Pani mgr Natalii Napieraj pt „Rola poliamin w biosyntezie tlenu azotu w reakcji roślin na stres solny”** spełnia warunki określone w art. 13.1 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., i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie **Pani mgr Natalii Napieraj** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję także o wyróżnienie

niniejszej rozprawy doktorskiej ze względu na: wysoką rangę naukową uzyskanych wyników, a także na profesjonalny sposób ich opisu na tle aktualnego stanu wiedzy.

Kraków, 11.05.2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Kiew", is positioned to the right of the date.