



UNIwersytet w Białymstoku  
Wydział Biologiczno-Chemiczny  
Instytut Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok  
tel. 85 738-82-24, tel./fax 85 738-84-14



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Andrzejczak „Metabolizm reaktywnych form azotu w korzeniach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach fitotoksycznego oddziaływania *meta*-tyrozyny”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Olgi Andrzejczak, doktorantki studiów doktoranckich Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej, prof. nadzw. SGGW, w Katedrze Fizjologii Roślin (Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie). Promotorem pomocniczym była dr Urszula Krasuska z Katedry Fizjologii Roślin. Rozprawa jest starannym opracowaniem napisanym w języku polskim. Doktorantka wykorzystując nowoczesne techniki badawcze przeprowadziła interesującą analizę odpowiedzi siewek pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.) na krótkotrwały stres wywołany dostarczeniem *meta*-tyrozyny (niebiałkowego aminokwasu o właściwościach allelozwiązku) do podłoża wzrostowego badanych roślin. Starła się określić udział procesów wytwarzających (i usuwających) reaktywne formy azotu i tlenu w korzeniach pomidora, charakteryzujących się znaczną redukcją wzrostu elongacyjnego, w odpowiedzi na zastosowany w różnych stężeniach związek allelopatyczny.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu pracy i obejmuje 142 strony wydruku, w tym: Wstęp (36 stron), Cel pracy (2 strony), Materiały i Metody (16 stron), Wyniki (24 strony), Dyskusja (18 stron), Podsumowanie i wnioski (2,5 strony); rozprawa doktorska poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. W pracy umieszczono łącznie 32 ryciny i 5 tabel, a także spis 285 pozycji cytowanego piśmiennictwa (w większości angielskojęzycznych aktualnych prac oryginalnych).

Wstęp jest bardzo dobrze opracowanym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Obszerny przegląd aktualnej literatury wyczerpująco wprowadza w dziedzinę naukowych zainteresowań Doktorantki. Wstęp został podzielony na pięć podrozdziałów, w których Doktorantka kolejno charakteryzuje: niebiałkowe aminokwasy, biosyntezę, mechanizm działania i znaczenie *meta*-tyrozyny, a następnie - reaktywne formy azotu (RNS), szlaki biosyntezy tlenku azotu (NO) oraz regulację stężenia NO w komórkach, opisuje także sposoby współdziałania NO i reaktywnych form tlenu (ROS). Następnie omawia mechanizmy uruchamiane w tkankach roślin w odpowiedzi

na stres nitrozacyjny i oksydacyjny, przedstawia typy modyfikacji potranslacyjnych białek wywołane przez RNS i ROS, charakteryzuje białka karbonylowane i białka nitrowane. Ponadto, omawia metabolizm glutationu i interakcje z przemianami NO. Podkreśla rolę glutationu jako istotnego elementu systemu antyoksydacyjnego, opisuje powstawanie i funkcje nitrozoglutationu oraz reduktazy nitroglutationu. Wstęp zawiera 9 dobrze wykonanych schematów oraz jedną tabelę przedstawiającą funkcje i mechanizm działania wybranych niebiałkowych aminokwasów u roślin. Schematy przedstawiają kolejno: wzory strukturalne *meta*-tyrozyny (i izomerów), szlaki biosyntezy *meta*-tyrozyny, syntezę NO i lokalizację w komórkach roślinnych, mechanizm „zmiatania NO”, model współdziałania RNS i ROS w komórkach, drogi powstawania grup karbonylowych w aminokwasach. Kolejne schematy dotyczą potranslacyjnych modyfikacji białek w warunkach podwyższonych stężeń RNS i ROS, etapów cyklu Halliwella-Asady, a w końcu - metabolizmu glutationu, z uwzględnieniem *S*-nitrozylacji reszt cysteiny. Należy podkreślić, że Wstęp zawiera najbardziej istotne informacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej. Uwzględnia także najważniejsze pozycje piśmiennictwa z danej tematyki, a wiele cytowanych prac opublikowano w ciągu ostatnich kilku lat. Nie mam uwag krytycznych do tego dobrze opracowanego rozdziału. Nasuwają się jedynie drobne sugestie, np. uważam że Tab. 1 (str. 26) powinna zawierać odnośniki do literatury, a Rys. 1.3.2 (str. 40) powinien w opisie zawierać spis skrótów (podobnie jak inne schematy). Niektóre fragmenty tekstu charakteryzują się nadmierną ilością używanych skrótów, co nie jest przyjazne dla czytelnika - częste stosowanie skrótów jest zwyczajowo przyjęte w publikacjach angielskojęzycznych, ale raczej nie w rozprawie doktorskiej napisanej w języku polskim. Zabrakło natomiast podania numerów klasyfikacji enzymów (E.C.) do większości opisywanych i analizowanych później białek enzymatycznych (z wyjątkiem GSNOR, str. 59). Szkoda, że nie cytowano we Wstępie niektórych prac polskich zespołów, np. pracy przeglądowej Szuba i Wojtaszek z Postępów Biochemii (2010, 56: 107) omawiającej modyfikacje strukturalne białek takie jak nitrozylacje i nitracje.

Cel pracy został sprecyzowany jako „określenie zmian metabolizmu RNS wynikających z toksycznego działania *meta*-tyrozyny na siewki pomidora”. Doktorantka trafnie postawiła cztery główne zadania badawcze, które posłużyły do realizacji zasadniczego celu pracy. Postanowiła zbadać wpływ *meta*-tyrozyny na: i) emisję NO i nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>) oraz tkankową lokalizację RNS w korzeniach siewek pomidora, ii) potranslacyjne modyfikacje białek, zwłaszcza karbonylację i nitrację, iii) funkcjonowanie enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego oraz iv) metabolizm *S*-nitrozoglutationu (GSNO). Należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany - świadczy o tym analiza dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Andrzejczak.

Stosowany w pracy układ eksperymentalny oraz materiał roślinny i metodyka badań nie budzą zastrzeżeń. Rozdział Materiał i metody zawiera wiele informacji, zazwyczaj wystarczających do ewentualnego powtórzenia przedstawionych doświadczeń. Dobór metod badawczych jest właściwy, różnorodny, zastosowano nowoczesne metody i techniki badawcze. Stosowano zarówno metody cytologiczne, histochemiczne, fizjologiczne i biochemiczne oraz techniki molekularne. Lokalizację NO oraz ONOO<sup>-</sup> w korzeniach siewek oraz pomiar emisji RNS wykonano stosując znaczniki fluorescencyjne z użyciem mikroskopu konfokalnego. Przeprowadzono ponadto immunodetekcję białek nitrowanych (zawierających 3-nitrotyrozynę, 3-NT) i karbonylowanych z użyciem metody western blotting. Stosowano także metodę elektroforezy natywnej (native-PAGE) określając aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz reduktazy nitrozoglutationowej. Przeprowadzono szereg analiz spektrofotometrycznych, oznaczając stężenie jonów azotynowych, zawartość grup tiolowych, białek zawierających grupy karbonylowe, czy aktywności enzymów antyoksydacyjnych i reduktazy nitrozoglutationowej. Badano także zmiany ekspresji genów kodujących te enzymy (w tym z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym, real-time PCR). Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Należy podkreślić iż szeroki zakres użytych technik badawczych jest niewątpliwym atutem ocenianej rozprawy doktorskiej. Pewne zastrzeżenia może budzić brak odnośników do badań wstępnych na bazie których wybrano stosowane w pracy stężenia *meta*-tyrozyny. Nie zauważyłam informacji w jakich stężeniach *meta*-tyrozyna może być obecna w wydzielinach korzeniowych kostrzew? Czy stosowane w pracy stężenia allelozwiązku są możliwe w warunkach naturalnych? Nie podano też charakterystyki *meta*-tyrozyny (np. jaki enancjomer stosowano) ani pochodzenia odczynnika, niestety jest to spore uchybienie, bo był to kluczowy związek w badaniach... Zabrakło również w kilku miejscach odnośników do literatury metodycznej (np. podrozdział 3.3 i 3.4 na str. 64, 65 oraz 3.5 i 3.7.1 na str. 66 i 67). Do oznaczeń ekspresji genów /poziomu transkryptów stosowano dwie różne metody, proszę o wyjaśnienie, dlaczego? Analiza rozdziału Materiał i metody (łącznie z przedstawionymi wynikami) nie pozostawia jednak wątpliwości, że Doktorantka doskonale opanowała metodykę badań eksperymentalnych w dziedzinie nowoczesnej fizjologii i biochemii roślin.

Rozdział Wyniki jest stosunkowo obszernym rozdziałem rozprawy, podzielonym na podrozdziały opisujące kolejno: parametry wzrostowe siewek pomidora po potraktowaniu *meta*-tyroziną o stężeniu 50 μM lub 250 μM (24 i 72 godziny), badania analizy żywotności komórek korzeni pomidora, analizę lokalizacji w korzeniach i emisji NO oraz ONOO<sup>-</sup>, oznaczenie stężenia jonów azotynowych w korzeniach, zawartości grup tiolowych, detekcję i analizę ilościową białek zawierających 3-NT, a także profil białkowy oraz immunodetekcję białek karbonylowanych. Następnie przedstawiono wyniki oznaczeń aktywności elementów systemu antyoksydacyjnego:

dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), reduktazy glutationowej (GR), peroksydazy glutationowej (GPX) oraz reduktazy nitrozoglutationowej (GSNOR); oznaczono także zawartość białka GSNOR i ekspresję genu kodującego reduktazę nitrozoglutationową (*GSNOR*). W kolejnym etapie badań Autorka przeprowadziła analizę profilu ekspresji genów kodujących enzymy systemu antyoksydacyjnego. Poziom transkryptów SOD w korzeniach siewek pomidora oznaczono dla pięciu genów kodujących trzy enzymy rodziny Mn-FeSOD (*MNSOD*, *SOD3*, *FESOD*) i dwa z rodziny Cu-ZnSOD (*SODCP.2*, *CUSOD2*); oznaczono również poziom transkryptów dwóch genów kodujących reduktazę glutationową (*GRI* i *GR*) a także sześć genów kodujących peroksydazę glutationową (*GPXle-1*, *GPXle-2*, *GPx*, *pGPx8*, *GSHPx1*, *GSHPx2*).

W ramach pracy doktorskiej wykonano pomiary wskazujące, że traktowanie siewek pomidora *meta*-tyroziną prowadziło do silnego zahamowania wzrostu elongacyjnego korzeni, we wszystkich stosowanych wariantach eksperymentalnych, oraz obniżenia żywotności komórek. Nie podano niestety zbyt wielu parametrów wzrostowych ani zawartości wody w tkankach. W korzeniach siewek w obecności *meta*-tyrozyny obserwowano indukcję wtórnego stresu nitrozacyjnego, zwiększoną emisję tlenu azotu lub nadtlenoazotynu, zwłaszcza z ryzodermy komórek granicznych w okolicach czapeczki korzeniowej, w zależności od czasu oddziaływania i stosowanego stężenia allelozwiązku (oraz zmienioną lokalizację NO oraz ONOO<sup>-</sup>). Stwierdzano zmiany w ilości białek karbonylowanych i nitrowanych, odmienny był także profil białkowy po oddziaływaniu niebiałkowym aminokwasem, w porównaniu do roślin kontrolnych. Obserwowano zmiany aktywności wybranych enzymów związanych z obroną przed stresem oksydacyjnym. Traktowanie korzeni *meta*-tyroziną prowadziło też do zmian ekspresji licznych genów kodujących enzymy systemu antyoksydacyjnego: dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazy glutationowe i reduktazę glutationową oraz reduktazę nitrozoglutationową. Jednak nie zawsze obserwowanym zmianom ekspresji genów towarzyszyły podobne trendy zmian w aktywności enzymów. Uzyskane wyniki wskazały, że efektem działania *meta*-tyrozyny, podczas procesu hamowania wzrostu elongacyjnego korzeni, jest stres nitrozacyjny i oksydacyjny, prawdopodobnie jako stresy wtórne. Do najciekawszych wyników rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Andrzejczak należy zaliczyć obserwacje, że *meta*-tyrozyna indukuje stres nitrozacyjny w korzeniach, a zmianom emisji/lokalizacji NO oraz ONOO<sup>-</sup> i zawartości/profilowi białek nitrowanych w korzeniach towarzyszą modyfikacje metabolizmu nitrozoglutationu. Ekspozycja pomidora na *meta*-tyrozinę generalnie powodowała wzrost ekspresji genu *GSNOR*, wzrost ilości białka i aktywności enzymatycznej reduktazy nitrozoglutationowej. Nie prowadzono dotychczas zbyt wielu badań związanych z metabolizmem RNS po podaniu związków allelopatycznych - dlatego wyniki te można uznać za nowatorskie. Należy stwierdzić, że opis uzyskanych wyników badań w rozprawie doktorskiej jest staranny i logiczny, ilustrowany ponad dwudziestoma rycinami

(21) i tabelą. Sposób przedstawienia i opis wyników badań nie budzą zastrzeżeń. Wykresy słupkowe i tabela są zrozumiałe i możliwe do porównania. Po fragmentach opisu wyników są cytowane i przedstawiane adekwatne ryciny. Niestety jakość rycin na wydruku nie jest najlepsza, zwłaszcza fotografie żeli pozostawiają wiele do życzenia. Nieco lepszej jakości są ryciny w elektronicznej wersji pracy dostarczonej jako załącznik do rozprawy na płycie CD.

Dyskusja jest bardzo dobrze napisanym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Doktorantka wnikliwie przeanalizowała wszystkie wyniki badań własnych oraz porównała je z dostępnymi danymi z literatury oraz w logiczny sposób starała się wyjaśnić podłoże zjawisk i reakcji roślin doświadczalnych na zastosowany wariant czynnika stresowego. Omówienie wyników kolejnych doświadczeń, i ich dyskusję, podzielono na pięć podrozdziałów. W pierwszych podrozdziale Doktorantka podjęła próbę objaśnienia podłoża hamującego wpływu *meta*-tyrozyny na elongacyjny wzrost korzeni podając przykład interakcji z auksyną. Niestety pominięto w dyskusji wiele innych aspektów, w tym także możliwych interakcji z innymi regulatorami wzrostu. Nie zgadzam się z poglądem że badania fotosyntezy pędów/liści po podaniu *meta*-tyrozyny są mniej interesujące i że można je pominąć - po dłuższym czasie oddziaływania allelozwiązku nie wykluczałabym wpływu na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego. Doktorantka dyskutowała następnie aspekty związane z wpływem *meta*-tyrozyny na emisję i zawartość NO i ONOO<sup>-</sup> oraz na zmiany zawartości i profilu nitrowanych i karbonylowanych białek w korzeniach siewek pomidora. W kolejnych podrozdziałach obszernie został opisany i dyskutowany niejednorodny wpływ *meta*-tyrozyny na modyfikacje ekspresji genów i aktywności wybranych enzymów systemu antyoksydacyjnego. Ponadto wyczerpująco przedyskutowano mechanizm oddziaływania *meta*-tyrozyny na metabolizm nitrozoglutationu, wskazując na rolę reduktazy nitrozoglutationowej (GSNOR). Nie nasuwa się zbyt wiele uwag krytycznych dotyczących rozdziału Dyskusja. Własne osiągnięcia Doktorantki są podkreślone w odpowiednim stopniu, nie znikają na tle danych literaturowych. Zamieszczano odnośniki do własnych wyników (rycin) we właściwych fragmentach tekstu dyskusji. Bardzo dobry schemat (Rys. 5.1) i dwie klarowne tabele podsumowujące otrzymane dane doświadczalne znacznie ułatwiają powiązanie poszczególnych wątków pracy. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała szereg logicznych i klarownych wniosków, umieszczonych po rozdziale Dyskusja. W moim odczuciu zabrakło jednak powiązania obserwowanych modyfikacji metabolizmu RNS z ich ewentualnym wpływem na zaobserwowane natychmiastowe i silne hamowanie wzrostu elongacyjnego korzeni siewek pomidora. Uważam, iż interesujące byłoby wykazanie, czy obserwowane zmiany emisji/metabolizmu RNS są wystarczające do zahamowania wzrostu korzeni. Czy Doktorantka ma w planach kontynuację badań i wykonanie pomiarów m.in. pod tym kątem? Oczekuję uzupełnienia dyskusji, na obronie rozprawy doktorskiej, o potencjalne mechanizmy hamowania

wzrostu korzeni badanych siewek oraz określenia, w podsumowaniu, które wątki badań należy uzupełnić i czy warto by było kontynuować badania w tym kierunku. Chciałabym aby Kandydatka, po obronie rozprawy doktorskiej, szerzej omówiła procesy towarzyszące początkowym stadiom wzrostu i rozwoju korzeni u roślin modelowych i użytkowych, na bazie aktualnych danych z literatury, z podkreśleniem udziału różnych regulatorów wzrostu (oraz czynników zewnętrznych).

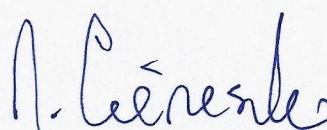
Generalnie Doktorantka starała się dość krytycznie i obiektywnie przedstawiać wyniki własnych badań, co jest ważne w pracy naukowej. Należy podkreślić duże doświadczenie mgr inż. Olgi Andrzejczak, jako badacza, o czym świadczą prace oryginalne opublikowane w dobrych czasopiśmie angielskojęzycznych, w których jest współautorem, oraz prace przeglądowe. Nazwisko Doktorantki widnieje w łącznie dziesięciu publikacjach - co jest imponującym osiągnięciem w tak krótkim okresie przygody naukowej. Doktorantka jest również współautorką kilkudziesięciu doniesień konferencyjnych (w tym wystąpień na konferencjach międzynarodowych). Mgr inż. Olga Andrzejczak zdobywała ponadto doświadczenie na stażach zagranicznych oraz była kierownikiem projektu badawczego NCN „Preludium”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Olgi Andrzejczak jest napisana poprawnym językiem, bez większych błędów. Rozprawa jest dobrze zredagowana, kolejność rozdziałów jest zachowana, prawidłowo cytowane są adekwatne prace innych autorów a spis literatury jest starannie ujednolicony. Znalaziono jednak pewne niedociągnięcia, np.: brakuje wyjaśnienia skrótów pod Rys. 1.3.2, wyjaśnienia dotyczące stosowanych stężeń powinny znaleźć się w rozdziale Materiał i metody a nie na końcu rozdziału Cel pracy, czasami cytowane są niewłaściwe ryciny (np. na str. 93), a na końcu str. 73 zastosowano inne odstępy pomiędzy wierszami niż na innych stronach. W pracy stosowano nadmierną ilość skrótów, niektóre fragmenty są trudne do czytania i rozumienia (np. fragment Celu pracy, cytuję: „Synteza GSNO zależy od dostępności GSH, a pośrednio także wartości stosunku GSH:GSSG, które są regulowane przez aktywność GR oraz GPX. Za katabolizm GSNO odpowiada GSNOR. GSNO modulując szlak sygnału NO...”, str. 61). Nie widzę zwłaszcza uzasadnienia dla wprowadzania skrótów zastosowanych jedynie raz, np.: GGC (str. 54), CLMS (str. 64), DMF (str. 65), czy MD i MPD (występujące chyba tylko w spisie skrótów, str. 18). Spis bibliografii został starannie wykonany, stwierdzono jedynie nieliczne drobne błędy: np. brak spacji i drobne błędy literowe (str. 129, 142), czy niewłaściwą kolejność (np. str. 125 poz. 11 i 12). Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością terminologii naukowej, znalaziono jednak pewne „niezręczności językowe” oraz „literówki” (np. str. 17, 19, 34, 42, 45, 46, 55, 57, 58, 93, 112, 115, 117, 120). Wymienione powyżej drobne błędy nie wpływają jednak na wartość merytoryczną ocenianej rozprawy doktorskiej. Przedstawiona do recenzji praca jest starannie przygotowaną rozprawą doktorską, którą z przyjemnością

recenzowałam. Rozprawa dobrze wpisuje się we współczesny nurt rozważań dotyczących odpowiedzi roślin użytkowych na czynniki stresowe oddziałujące na kondycję roślin. Pewne aspekty badawcze rozprawy mogą mieć również wartość aplikacyjną. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej można uznać, że Doktorantka dobrze opanowała metodykę badań w dziedzinie nowoczesnej fizjologii i biochemii roślin, wykazała się bardzo dobrą znajomością terminologii naukowej, potrafiła poprawnie zaplanować doświadczenia oraz prawidłowo zinterpretować i przedyskutować uzyskane wyniki z danymi z aktualnej literatury światowej.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że nieliczne uwagi krytyczne recenzenta mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Andrzejczak. Doktorantka w pełni zrealizowała cele postawione w pracy, tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i dotyczy aspektów mało poznanych. Doktorantka dobrze opanowała współczesne metody badawcze, wyniki są oryginalne a dyskusja wnikliwa. Stwierdzam, jako recenzent, że **praca doktorska mgr inż. Olgi Andrzejczak, zatytułowana „Metabolizm reaktywnych form azotu w korzeniach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach fitotoksycznego oddziaływania *meta*-tyrozyny”** w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Występuję zatem do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. **Olgi Andrzejczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Białystok, 21.05.2018 r.



*Dr hab. Iwona Ciereszko, prof. UwB*

*Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii UwB*