

dr hab. Edyta Zdunek-Zastocka
Katedra Biochemii i Mikrobiologii
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa 12.02.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Wojtaczki zatytułowanej
„Wpływ indolilo-3-acetylo-asparaginianu na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.)
na szok osmotyczny”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Promotorem rozprawy jest dr hab. Maciej Ostrowski, prof. UMK, który od lat zajmuje się metabolizmem koniugatów auksyn, jak również ich rolą w rozwoju roślin oraz w odpowiedzi roślin na działanie niekorzystnych czynników środowiska. Tym samym niniejsza praca doktorska stanowi kontynuację badań promotora i dotyczy wpływu jednego z koniugatów IAA, indolilo-3-acetylo-asparaginianu (IAA-Asp), na odpowiedź siewek grochu na szok osmotyczny spowodowany 3-godziną inkubacją roślin z NaCl lub 48-godziną inkubacją z glikolem polietylenowym (PEG). W pracy zbadano wpływ egzogenego IAA-Asp, podanego oddzielnie lub w połączeniu z czynnikami indukującymi szok osmotyczny, na stężenie wybranych markerów stresu oksydacyjnego, przeciwutleniaczy, status tiolowy siewek, modyfikacje potranslacyjne białek, stężenia wybranych fitohormonów, jak również aktywności enzymów odpowiedzialnych za regulację stężenia glutationu oraz koniugatów IAA.

W tkankach grochu dominującym koniugatem amidowym IAA jest wspomniany powyżej IAA-Asp. Koniugat ten w przeciwieństwie do większości koniugatów amidowych IAA, które służą jako źródło wolnej auksyny, jest przede wszystkim intermediatem w oksydacyjnej degradacji tego fitohormonu. Z drugiej strony, koniugat ten wykazuje swoiste, niezależne od IAA działanie w odpowiedzi roślin na abiotyczne i biotyczne czynniki stresowe. Jednak, jak słusznie podkreśliła Doktorantka w swej rozprawie, wiedza na temat mechanizmu działania IAA-Asp jako cząsteczki biologicznie aktywnej jest wciąż bardzo mała. Stąd też podjęta przez Doktorantkę tematyka badań, będąca próbą określenia biochemicznych podstaw działania IAA-Asp w odpowiedzi siewek grochu na szok osmotyczny, jest w pełni uzasadniona i wnosi dużą wartość poznawczą.

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Wojtaczki ma postać klasycznej monografii naukowej (110 stron), która została napisana w języku polskim. Praca ma układ typowy dla opracowań opartych na badaniach eksperymentalnych i obejmuje: Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp (22 strony), Cel pracy (2 strony), Materiał i metody (16 stron), Wyniki (24 strony), Dyskusję (14 stron), Podsumowanie (strona) oraz Spis literatury (178 pozycji anglojęzycznej literatury naukowej). Praca została napisana niezwykle starannie pod względem edytorskim.

Rozprawę rozpoczyna **Wstęp** wprowadzający w tematykę pracy doktorskiej oraz uzasadniający celowość podjętych badań. Większość cytowanych prac naukowych pochodzi z ostatnich lat, co może wskazywać, że podjęty temat badań jest naukowo aktualny i ważny. Doktorantka rozpoczyna ten rozdział od przedstawienia ogólnych wiadomości dotyczących roli, mechanizmu działania i biosyntezy auksyn. Następnie omawia rolę koniugatów IAA w utrzymaniu homeostazy tego fitohormonu oraz w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. Najwięcej miejsca Doktorantka poświęca mechanizmom syntezy koniugatów amidowych IAA i roli amidosyntetazy GH3 w tym procesie. Przytacza również najnowsze dane dotyczące udziału amidosyntetazy GH3 w regulacji stężenia kwasu salicylowego oraz fitohormonów z grupy jasmonianów. Należy tutaj nadmienić, że Doktorantka jest pierwszym autorem manuskryptu o podobnej tematyce, który został opublikowany w 2022 roku w czasopiśmie *Phytochemistry* (Wojtaczka i wsp. 2022. The GH3 amidosynthetases family and their role in metabolic crosstalk modulation of plant signaling compounds. *Phytochemistry* 194, 113039). Ostatni podrozdział Wstępu poświęcony został stresowi oksydacyjnemu, zarówno mechanizmom prowadzącym do jego powstania, skutkom towarzyszącym nadmiernemu kumulowaniu się RFT, jak również mechanizmom obronnym roślin przed tymi skutkami. Przegląd literatury został napisany zwięźle, w sposób przystępny i zrozumiały, a omawiane zagadnienia zostały zilustrowane czytelnymi i estetycznymi schematami.

Cele pracy zostały sformułowane na 36 stronie rozprawy i brzmią następująco: „celem prowadzonych w ramach niniejszej pracy badań było szczegółowe poznanie wpływu IAA-Asp na między innymi poziom przeciwutleniaczy, aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz na modyfikacje potranslacyjne białek w siewkach grochu traktowanych NaCl lub glikolem polietylenowym (PEG). Sprawdzano również, w jaki sposób koniugat może wywoływać zmiany w wymienionych czynnikach. W związku z tym zbadano, czy podawany IAA-Asp moduluje poziom fitohormonów w siewkach grochu. Analizowano także, jak koniugat wpływa na aktywność enzymów odpowiedzialnych za koniugację IAA. Należy dodać, że w niniejszej pracy po raz pierwszy poddano weryfikacji tezę o biologicznej, niezależnej od wolnej auksyny, roli IAA-asparaginianu”. Następnie doktorantka wymienia zadania badawcze umożliwiające realizację powyższych celów. Chociaż zacytowane powyżej cele badawcze uważam, za oryginalne, to jednak w mojej opinii rozdział ten nie jest wystarczająco dopracowany. Po pierwsze, w rozdziale tym Doktorantka przytacza dane literaturowe, które wprawdzie uzasadniają podjęcie tematu badań, jednak w mojej opinii powinny one znaleźć się w przeglądzie literatury, i rzeczywiście większość tych informacji została wcześniej uwzględniona we Wstępie. Po drugie, jednoznaczne sformułowanie głównego/nadrzędnego celu pracy, a następnie sprecyzowanie celów szczegółowych znacznie ułatwiłoby zrozumienie podjętego przez Doktorantkę problemu badawczego oraz sposobu jego rozwiązania. Po trzecie, jedno z przytoczonych powyżej zdań, a mianowicie: „Sprawdzano również, w jaki sposób koniugat może wywoływać zmiany w wymienionych czynnikach”, w mojej opinii wymaga doprecyzowania.



Jego treść może bowiem sugerować, że koniugat IAA-Asp może modyfikować zastosowane w pracy czynniki stresowe, czyli NaCl lub PEG. Nie doprecyzowano także o jakie zmiany chodzi.

W kolejnym rozdziale pracy, **Materiały i metody**, Doktorantka szczegółowo i wyczerpująco opisała zastosowane w pracy techniki i metody badawcze. Godna uznania jest duża liczba i różnorodność przeprowadzonych analiz, od prostych oznaczeń kolorymetrycznych, poprzez zymografię, dwukierunkową elektroforezę SDS-PAGE, Western blot, po bardziej zaawansowane techniki jak spektrometria mas czy też Real-time PCR. Takie wszechstronne podejście do badanego problemu wymagało od Doktorantki nie tylko dużego nakładu pracy, ale również dużej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności praktycznych.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka przedstawiła kolejne etapy swojej pracy, szczegółowo opisując uzyskane wyniki i dokumentując je w postaci starannie przygotowanych tabel (2) oraz rycin (19), w skład których wchodzi wykresy, chromatogramy, zymogramy oraz proteinogramy. Rozdział ten, pomimo dużej liczby danych eksperymentalnych, jest dla czytelnika jasny i przejrzysty.

W pierwszym podrozdziale, stosując radioaktywnie znakowany koniugat IAA- $^{2}\text{H}_5$, ^{15}N]Asp Doktorantka wykazała, że IAA-Asp nie stanowi źródła wolnego IAA w siewkach grochu nienarażonych na działanie czynników stresowych. Koniugat IAA-Asp nie jest również źródłem wolnego IAA w warunkach szoku osmotycznego, jak pośrednio wnioskowała na podstawie pomiarów wolnego IAA.

Następnie Doktorantka wykazała, że w warunkach szoku osmotycznego IAA-Asp nie wpływa ani na poziom antyoksydantów ani też na peroksydację lipidów. Szkoda, że w warunkach doświadczenia nie zostały oznaczone stężenia reaktywnych form tlenu (tj. H_2O_2 czy O_2^-), których akumulacja następuje jeszcze przed mierzalnymi skutkami ich działania.

W dalszej części, Doktorantka opisała wpływ IAA-Asp i szoku osmotycznego na status tiolowy siewek. Jak wynika z rozprawy, inkubacja siewek z samym IAA-Asp znacząco modyfikuje stosunek GSH/GSSG, którego wartość wzrosła, a następnie zmniejszyła się, odpowiednio po 3 i 48 godzinach inkubacji. W warunkach szoku osmotycznego, spowodowanego zarówno działaniem NaCl jak i PEG, badany koniugat nie powodował jednak istotnych statystycznie zmian ani w stosunku GSH/GSSG, ani też w aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) czy też S-transferazy glutationowej (GST). W warunkach szoku osmotycznego, badany koniugat powodował obniżenie aktywności reduktazy glutationowej (GR) oraz stosunku grup -SH w białkach do całkowitej zawartości tych grup, jednak tylko po 3-godzinnym traktowaniu siewek NaCl.

Dużą wartość poznawczą wnoszą informacje dotyczące zidentyfikowanych w pracy doktorskiej białek, które ulegają S-glutationylacji oraz karbonylacji pod wpływem IAA-Asp i/lub szoku osmotycznego, jak również obserwowane pod wpływem badanego koniugatu w optymalnych warunkach wzrostu zmiany w stężeniu fitohormonów tj. ABA, SA i JA. W mojej opinii interesujący jest również wynik wskazujący na wzrost stężenia IAA-Asp w odpowiedzi na 3-godziną inkubację z NaCl. Wzrost ten z jednej strony może sugerować zaangażowanie badanego koniugatu we wczesną odpowiedź siewek na szok osmotyczny indukowany przez NaCl, z drugiej strony może wiązać się z „przygotowaniem” IAA do oksydacyjnej degradacji. Żeby wykluczyć tę drugą ewentualność można by w przyszłości pokusić się o oznaczenie aktywności enzymów biorących w tym procesie.



W rozdziale **Dyskusja**, Doktorantka omówiła otrzymane w pracy wyniki na tle badań innych autorów, dowodząc znajomości literatury przedmiotu i zrozumienia tematu. Rozdział ten został napisany poprawnym językiem i został podzielony na podrozdziały odpowiadające poszczególnym etapom pracy, co znacznie ułatwiło śledzenie toku rozumowania. Na pochwałę zasługuje krytyczna, a zarazem otwierająca perspektywę na dalsze badania, samoocena pracy zawarta w zdaniu kończącym dyskusję: „Badania te stanowią jednak początek do poznania mechanizmu działania IAA-Asp, nad którym należałoby się pochylić w przyszłości.”

W **Podsumowaniu**, Doktorantka przedstawiła w sześciu syntetycznie sformułowanych punktach najistotniejsze wyniki swojej pracy. Pewien niedosyt budzi w tym miejscu brak wniosku bądź wniosków końcowych. Ponadto stwierdzenie, że w warunkach szoku osmotycznego egzogeny IAA-Asp moduluje status tiolowy w siewkach grochu, w mojej opinii, wymaga doprecyzowania, gdyż jak pokazują otrzymane w pracy wyniki, zależność ta nie była obserwowana w każdych warunkach doświadczenia.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się **kilka pytań/uwag**, stąd też prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w czasie publicznej obrony:

1. Jakie przesłanki zdecydowały o tym, że czas ekspozycji siewek na czynniki stresowe wynosił 3 godziny w przypadku NaCl, natomiast 48 godzin w przypadku PEG?
2. Stres/szok osmotyczny prowadzi do obniżenia potencjału wody (Ψ) w komórce, co pociąga za sobą zmiany w stopniu uwodnienia tkanki roślinnej, a te z kolei mogą być oceniane na podstawie min.: procentowej zawartości wody w świeżej masie oraz wskaźników względnej zawartości wody RWC (ang. *Relative Water Content*) i deficytu wysycenia wodą WSD (ang. *Water Saturation Deficit*). Czy któryś z tych parametrów został oznaczony w warunkach doświadczenia? Jeśli bowiem zastosowane czynniki stresowe wpływają na stopień uwodnienia tkanek, to czy nie należałoby przeliczyć stężenia oznaczanych antyoksydantów czy hormonów na gram suchej masy?
3. Proszę o uzupełnienie bibliografii dotyczącej metody oznaczania zawartości kwasu askorbinianowego i wyjaśnienie dlaczego zastosowana metoda jest specyficzna tylko dla ilościowego pomiaru askorbinianu. Czy można ją zastosować do pomiaru całkowitej zdolności/siły redukującej ekstraktów roślinnych?
4. W jaki sposób Doktorantka potwierdziła, że gen *18s rRNA* jest odpowiednim genem referencyjnym do badania ekspresji genów w warunkach doświadczenia?
5. Dlaczego w doświadczeniu mającym na celu sprawdzenie czy IAA-Asp ulega hydrolizie, siewki inkubowano w roztworze zawierającym obok znakowanego radioaktywnie koniugatu IAA-[$^2\text{H}_5$, ^{15}N]Asp w stężeniu 1 μM , również nieznakowany IAA-Asp i to w stężeniu 200 razy wyższym? Dla porównania w cytowanej przez Doktorantkę publikacji Tang i wsp. (2019) przeprowadzono podobne doświadczenie na siewkach inkubowanych tylko w obecności znakowanego koniugatu.
6. Czy dostępne są w literaturze informacje na temat degradacji oksydacyjnej IAA-Asp w odpowiedzi na czynniki stresowe, szczególnie te, które prowadzą do szoku osmotycznego?
7. Czym można tłumaczyć odmienny wpływ zarówno koniugatu IAA-Asp jak i szoku osmotycznego na ekspresję genu *PsGH3* oraz na aktywność amidosyntetazy IAA-Asp? Czy u grochu znane są inne geny *GH3*, które mogą kodować białka amidosyntetazy IAA-Asp?
8. W Dyskusji (strona 89) Doktorantka pisze: „Należy zauważyć, że zmiany w poziomach ABA i SA wywołane podaniem IAA-Asp były podobne do tych występujących u roślin w warunkach szoku osmotycznego. Może to świadczyć o negatywnym wpływie koniugatu na siewki grochu.” Proszę o rozwinięcie tej myśli? W jaki sposób IAA-Asp może negatywnie wpływać na siewki?



Wnioski końcowe

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej pracy naukowej, której wyniki wnoszą niewątpliwą wkład w poznanie mechanizmów działania koniugatu IAA-Asp jako cząsteczki aktywnej biologicznie. Autorka rozprawy wykazała się znajomością literatury w obrębie badanego tematu oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników. Wysokie kompetencje merytoryczne w połączeniu z opanowaniem bogatego warsztatu metodycznego świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy badawczej.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Patrycji Wojtaczki pt.: „Wpływ indolilo-3-acetylo-asparaginianu na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny” spełnia wszystkie wymogi ustawowe określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Wojtaczki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zdunek-Zastocka

.....
dr hab. Edyta Zdunek-Zastocka

**Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Instytut Biologii
Katedra Biochemii i Mikrobiologii

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 325 61
kbim@sggw.edu.plwww.sggw.pl