



Dr hab. Wojciech Pokora, Prof. UG

Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin

Wydział Biologii, ul Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

Uniwersytet Gdański

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Patrycji Wojtaczk**

pt. „Wpływ indolilo-3-acetylo-asparaginianu na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny”

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Macieja Ostrowskiego, prof. UMK, Katedra Biochemii,
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, uchwała nr 88, z dnia 15.12.20203 r, przesłana w piśmie Dziekan Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK, z dnia 18.12.2023.

Aspekty formalne

Przedłożona Rozprawa doktorska ma formę pracy pisemnej o charakterze monograficznym, prezentujące oryginalne, nie publikowane wcześniej wyniki badań laboratoryjnych wraz z ich opisem i interpretacją. Forma jest w pełni zgodna z wykładnią Rady Doskonałości Naukowej 19/2020, w sprawie składania rozpraw doktorskich (art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Na 110 stronach maszynopisu Autorka przedstawia wyniki badań dotyczące obecności, przemian biochemicznych oraz roli koniugatu amidowego auksyny IAA-Asp w tkankach siewek grochu, ze szczególnym uwzględnieniem roli ww. koniugatu w odpowiedzi roślin na stres osmotyczny. Przedłożona rozprawa doktorska jest przykładem kompleksowej analizy, gdzie efekt działania jednego związku jest analizowany w wielu aspektach, od jego trwałości w roślinie, poprzez efekty rozwojowe związane z homeostazą hormonalną, odpowiedzi na warunki stresowe analizowane na poziomie regulacji aktywności enzymatycznej, aż po regulację ekspresji wybranych genów. Praca w znaczący sposób uzupełnia wiedzę w zakresie roli, jaką mogą pełnić koniugaty auksyny – tu w szczególności nie opisywany bliżej dotychczas IAA-Asp, nie tylko w szeroko rozumianym metabolizmie auksyn i roli koniugatów w „wygaszaniu” sygnału hormonalnego, ale przede wszystkim w odpowiedzi komórki roślinne na stres środowiskowy – tu stres osmotyczny.

Doktorantka jest wiodącym autorem w jednej i współautorem w publikacji o zasięgu międzynarodowym, w których opublikowano wyniki badań związanych problematyką badawczą zespołu prof. Ostrowskiego, w którym realizowała rozprawę doktorską. Doktorantka posiada w dorobku także prezentacje na 2 konferencjach o zasięgu międzynarodowym, w tym FEBS oraz 7 konferencjach o zasięgu krajowym. We wszystkich jest pierwszą autorką.

Układ pracy jest typowy i właściwy dla dysertacji doktorskiej: Autorka zawarła w niej wstęp, opisujący podjęty problem badawczy oraz aktualny stan wiedzy w zakresie poruszanego przez Nią problemu naukowego. W sposób szczegółowy opisała zastosowane metody wraz z wykorzystywanymi materiałami. Na niemal trzydziestu stronach doktorantka przedstawia uzyskane wyniki, w tym zestawienia tabelaryczne (3 tabel) oraz ryciny (30, z czego wiele z nich zawiera dokumentację fotograficzną analizy białek metodami PAGE, SDS-PAGE, IEF/SDS-PAGE oraz chromatogramy LC-MS/MS). Kolejnych 15 stron zajmuje dyskusja oraz podsumowanie uzyskanych wyników. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, obszerny spis stosowanych skrótów oraz liczący 178 pozycji spis cytowanych prac naukowych. Należy podkreślić, że manuskrypt rozprawy doktorskiej został bardzo starannie przygotowany pod względem edytorskim, a Autorka biegle wykorzystwała dostępne programy komputerowe. Praca została napisana poprawną polszczyzną, na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka ustrzegła się stosowania neologizmów i określeń anglojęzycznych. Stwierdzam, iż przedłożona praca spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Ocena merytoryczna

Wstęp.

Wstęp pracy dobrze wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań. Zawiera podrozdziały pozwalające na przedstawienie problemu badawczego, przy czym w dobry sposób zrównoważona jest proporcja między aspektami oczywistymi dla większości czytelników poruszających się naukowo w obszarze biologii i biochemii komórek roślinnych - krótko opisana rola auksyn w biologii roślin, a aspektami bardziej szczegółowymi takimi jak charakterystyka koniugatów auksynowych, ich rodzaje, synteza oraz poznana dotychczas rola biologiczna. Podobnie w podrozdziale dotyczącym stresu oksydacyjnego, mechanizmów sposób zwięzły opisane jest zjawisko nadprodukcji RFT, natomiast w sposób bardziej szczegółowy opisywane efekty zjawiska na modyfikację białek. Do rozdziału poświęconego stresowi oksydacyjnemu, doktorantka włączyła opis procesu nitrozytacji białek. Moim zdaniem proces ten nie do końca powinien być przypisany do zjawiska stresu oksydacyjnego – w literaturze zazwyczaj nadprodukcja reaktywnych form azotu opisywana jest jako stres nitrozylacyjny.

Tu poprosiłbym doktorantkę o doprecyzowanie jej rozumienia zjawiska stresu oksydacyjnego i nitrozylacyjnego w komórkach roślinnych oraz ewentualne wskazanie źródeł RFT i RFA ich potencjalnych interakcji w warunkach stresowych.

W rozdziale wstęp brakuje mi rozdziału poświęconego warunkom stresowym jakie zostały zastosowane w wybranym modelu badawczym. Generalnie rozumiany stres osmotyczny, czy też stres suszy jest przecież zjawiskiem wieloaspektowym, a zjawisko nadprodukcji RFT, czy generalnie stres oksydacyjny jest tylko jednym z elementów odpowiedzi komórek i tkanek roślinnych na ograniczoną

dostępność wody. Nie umniejsza to meritum pracy jakim są uzyskane wyniki i ich interpretacja w dyskusji. Tu doktorantka traktuje problem wieloaspektowo, analizując chociażby poziom niskocząsteczkowych antyoksydantów, peroksydację lipidów. Podobnie w podrozdziale poświęconym mechanizmom obronnym przez skutkami stresu oksydacyjnego zabrakło mi wzmianki o dysmutazach ponadtlenkowych, jako enzymach zaangażowanych w neutralizację anionorodnika ponadtlenkowego, czy katalazy jako enzymu „równoległego” dla aktywności opisywanych w rozdziale peroksydaz. Rozumiem, iż poniekąd jest to związane z faktem, iż aktywności tych enzymów nie były przedmiotem analizy w pracy, niemniej jednak w rozdziale wstęp mogły by być wzmiankowane.

Materiały i metody

Rozdział poświęcony stosowanym materiałom i metodom badawczym nie budzi zastrzeżeń i w mojej ocenie spełnia wymogi stawiane dysertacji doktorskiej.

Wyniki

Z przyjemnością przeczytałem napisany przez Doktorantkę rozdział poświęcony uzyskanym wynikiom. W zdecydowanej większości prac dyplomowych i/lub doktorskich, ta część rozprawy stanowi dość „suchy” i stosunkowo nużący w czytaniu fragment. Tekst napisany przez Panią mgr Wojtaszka prowadzi czytelnika przez kolejne etapy pracy, w logiczny sposób uzasadniając podjęcie kolejnych etapów pracy, które są rozwijane w kierunkach wskazanych na podstawie uprzednio uzyskanych w trakcie pracy wyników. W mojej opinii taki sposób formułowania opisu uzyskanych przez Doktorantkę wyników jest trafny. W tekście opisu wyników znajdują się także odwołania do wcześniejszych wyników zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała projekt. Czasami przybierają one formę typową dla dyskusji wyników, jednak uzasadnioną.

Dyskusja

Dyskusja uzyskanych wyników jest wyważona ilościowo i w sposób systematyczny stanowi komentarz do kolejnych partii wyników uzyskiwanych przez Doktorantkę. Podział na wiele akapitów, których tytuły nawiązują do najważniejszych osiągnięć w prezentowanym zakresie, są nawiązaniem do sposobu prezentowania problemów naukowych, typowego dla współczesnych, anglojęzycznych podręczników akademickich. Uważam to za cenną umiejętność korzystania Pani mgr Wojtaszka ze sprawdzonych i dobrych wzorców prezentowania treści naukowych.

Projekt przeprowadzonego eksperymentu, na pierwszy rzut oka może budzić pewien niedosyt, upraszczając rzecz, można powiedzieć, że jest to 8 wariantów eksperymentalnych (4 dla NaCl i 4 dla PEG + koniugat i kontrole). Niemniej jednak, moim zdaniem jest to dobry przykład kompleksowej, systematycznej analizy problemu badawczego, uwzględniając wiele parametrów, od podstawowej analizy stabilności badanego koniugatu w układzie eksperymentalnym oraz określenia jego potencjalnej roli w układzie bez warunków stresowych. Doktorantka we właściwy sposób opisuje i interpretuje kolejne aspekty działania koniugatu IAA-Asp na homeostazę hormonalną grochu. Bardzo doceniam część pracy, w której Doktorantka pojęła się analizy IAA-Asp na modyfikacje proteomu roślin grochu. Zmiana stopnia karbonylacji czy s-gluatonylacji białek nie jest procesem łatwym analitycznie, o czym Doktorantka zapewne doskonale wiedziała podejmując w tym zakresie współpracę z Uniwersytetem w Poczdamie, gdzie identyfikowała wybrane białka. Dodatkowo, wyniki uzupełnione są o analizy molekularne, w zasadzie będące obecnie nieodzowną częścią większości prowadzonych badań biologicznych.

Kilka drobnych szczegółów,

W przypadku analizy aktywności oraz profilu izoform enzymów warunkujących adaptację komórek do warunków stresu oksydacyjnego, Doktorantka wskazuje, iż rozbieżności w wynikach mogły być efektem różnic w czułości stosowanych metod. Czy Doktorantka rozważała w tym przypadku weryfikację takich zależności z zastosowaniem programów opartych na pół-ilościowej analizie densytometrycznej (np. Quantity One; część z nich jest dostępna w trybie free trail).

W Rozdziale opisującym wpływ IAA-Asp na s-glutationylację białek, Doktorantka wskazuje na różnice w obrębie białka o masie 70 kDa, przypuszczalnie HSP. Do identyfikacji tego białka jako HSP brakuje mi potwierdzenia tej zależności. Proste doświadczenie, czasowej ekspozycji kontrolnych siewek grochu na podwyższoną temperaturę mogłoby stanowić dobry wariant kontrolny i pozwoliło bardziej jednoznacznie zidentyfikować prążek 70kDa jako białko z rodziny HSP.

Uwagi te nie umniejszają w żaden sposób osiągnięcia Doktorantki, a są jedynie aspektami, które może warto byłoby rozważyć w czasie publikowania uzyskanych wyników w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, co zakładam że jest w planach Doktorantki i zespołu Prof. Ostrowskiego.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Wojtaczki spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie z dnia 14 marca 2004 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami. Stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Wojtaczki do następnych etapów publicznej obrony.

06.02.2024

Profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Wojciech Pokora
dr hab. Wojciech Pokora