

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Pawła Staszka** zatytułowanej „Metabolizm reaktywnych form tlenu i azotu w korzeniach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach fitotoksycznego oddziaływania kanawaniny” wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej

Oddziaływania roślin z innymi organizmami zamieszkującymi środowisko ich bytowania są realizowane poprzez wzajemnie nakładające się działania licznych substancji bioaktywnych. Próby klasyfikacji tych związków chemicznych zwykle prowadzą do wyróżnienia różnych kategorii funkcjonalnych takich jak toksyny roślinne, deterenty i atraktanty pokarmowe, substancje wabiące owady zapylające czy allelochemikalia. W skład każdej z wymienionych kategorii wchodzi setki i tysiące różnorodnych substancji chemicznych, wykorzystujących swoiste mechanizmy oddziaływania na organizmy docelowe a niejednokrotnie, pełniące także ważne funkcje w macierzystym organizmie roślinnym. Zyskującą na znaczeniu klasą takich substancji są niebiałkowe aminokwasy. W roślinach zidentyfikowano około 250 związków chemicznych reprezentujących tą kategorię substancji. Należy do nich kanawanina, syntetyzowany przede wszystkim w nasionach roślin bobowatych (*Fabaceae*) analog argininy. Ponieważ dysponujemy jedynie fragmentaryczną wiedzą o biologicznych funkcjach i biochemicznych mechanizmach działania roślinnych aminokwasów niebiałkowych, podjęcie przez mgr Pawła Staszka badań nad mechanizmem fitotoksycznego działania kanawaniny jest uzasadnione. Trafność wyboru przedmiotu badań uzasadniają nie tylko walory czysto poznawcze. Kanawanina może potencjalnie znaleźć zastosowanie w ochronie roślin (jako bioherbicyd) a może (jak np. L-DOPA) nawet w medycynie. To jednak wymaga szczegółowego scharakteryzowania mechanizmu jej działania.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Staszka składa się z cyklu czterech prac opublikowanych w latach 2017-2020 w recenzowanych czasopismach międzynarodowych posiadających tzw. współczynnik wpływu (impact factor). Tematyka prac oscyluje wokół mechanizmu fitotoksycznego działania kanawaniny oraz reakcji roślin na tą substancję. Prace zostały opatrzone wspólnym komentarzem autorskim w języku polskim. Ta

część rozprawy składa się z wprowadzenia, prezentacji celów naukowych opisywanych badań, omówienia i dyskusji wyników zawierających opis merytoryczny z odniesieniem do głównych tez pracy oraz syntetyczne podsumowanie i wnioski. Całość omówienia zamyka bibliografia zawierająca 92 pozycje. Do rozprawy dołączono również streszczenia w językach polskim i angielskim, oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w jej skład a także informację o źródłach finansowania badań.

W skład rozprawy doktorskiej mgr Pawła Staszka wchodzi cztery, tematycznie spójne, artykuły naukowe.

- L-Canavanine: How does a simple non-protein amino acid inhibit cellular function in a diverse living system? *Phytochemistry Reviews* 16:1269-1282.
- Canavanine induced decrease in NO synthesis alters activity of antioxidant system but does not impact GSNO catabolism in tomato roots. *Frontiers in Plant Science* 10:1077.
- Peroxynitrite induced signaling pathways in plant response to nonproteinogenic amino acids. *Planta* 252:5.
- Canavanine increases the content of phenolic compounds in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) roots. *Plants* 9:1595.

Łączny **IF** tych prac wynosi **15,33**. Wysokość punktacji wynosi według listy ministerialnej wg obecnego systemu **370 pkt**, natomiast z uwzględnieniem listy obowiązującej do 2019 roku **330 pkt**. We wszystkich artykułach wchodzących w skład rozprawy Doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto, w trzech publikacjach pełni on rolę autora korespondencyjnego (wyjątkiem jest artykuł opublikowany w *Phytochemistry Reviews*). Dwie spośród czterech publikacji składających się na osiągnięcie naukowe mają charakter prac przeglądowych, a dwie pozostałe są pracami eksperymentalnymi. Rola Doktoranta w powstanie poszczególnych prac różniła się siłą rzeczy, w zależności od charakteru pracy. Zaangażowanie w powstanie pracy przeglądowych opublikowanych w *Phytochemistry Reviews* i *Planta* polegało na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, napisaniu jej fragmentu oraz edycji manuskryptu. W wypadku publikacji w czasopiśmie *Planta*, Doktorant wykonał także analizę nitracji RNA, której wyniki umieszczono w materiałach dodatkowych. Wkład Doktoranta w powstanie publikacji eksperymentalnych polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu finansowania, wykonaniu eksperymentów, przygotowaniu manuskryptu i nadzorowaniu procesu publikowania pracy jako autor korespondujący. Według przedstawionego przez Doktoranta oświadczenia jego udział w powstanie poszczególnych publikacji wynosi od 40% (pierwsza publikacja) do 60 i 70% (pozostałe publikacje). Zatem **indywidualny wkład w badania naukowe, a zazwyczaj nawet wiodąca rola Doktoranta w powstanie wszystkich prac nie budzi wątpliwości**. Tym samym rozprawa doktorska wypełnia wymagania zawarte w Ustawie z 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (Dziennik Ustaw 2017, poz. 1789, art. 13, punkt 4).

Ocena merytoryczna

Badania zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej poświęcone były ważnemu a jednocześnie słabo dotychczas poznanemu mechanizmowi fitotoksycznego działania kanawaniny (Kan), jednego z niebiałkowych aminokwasów, syntetyzowanego w tkankach niektórych gatunków roślin z rodziny *Fabaceae*. Kan uczestniczy w interakcjach syntetyzujących ją roślin z owadami roślinożernymi oraz w oddziaływaniach allelopatycznych. Kan jest analogiem argininy więc podstawowym mechanizmem toksycznego działania Kan jest jej inkorporacja w strukturę łańcucha polipeptydowego białek. Jednak w tkankach zwierzęcych Kan jest także inhibitorem indukowalnej izoformy syntazy NO (iNOS) co prowadzi do zmniejszenia produkcji NO, zmiany przebiegu procesów regulowanych przez tą cząstkę sygnałową i generuje stres oksydacyjny. Obniżenie emisji NO, następujące pod wpływem Kan także w tkankach roślinnych, stwierdzono w toku wcześniejszych badań prowadzonych w macierzystym zespole badawczym Doktoranta. Wciąż jednak niezidentyfikowany pozostawał mechanizm obserwowanego zjawiska. Hipoteza leżąca u podstaw projektu postuluje funkcjonowanie mechanizmu działania Kan w komórkach roślinnych polegającego na rozregulowaniu ścieżek transdukcji sygnału zależnej od NO, skutkującej powstawaniem reaktywnych form tlenu (RFT), reaktywnych form azotu (RNS) oraz nitrowaniem makromolekuł komórkowych, w tym białek, także enzymów antyoksydacyjnych. Jeżeli na skutek nitracji enzymów antyoksydacyjnych lub/i kodujących je transkryptów dochodzi do obniżenia wydajności obrony antyoksydacyjnej, nasuwa się pytanie o mechanizm kompensujący spadek aktywności enzymów. Taki mechanizm może uwzględniać działanie drobnocząsteczkowych antyoksydantów, które neutralizując RFT na drodze nieenzymatycznej, mogłyby częściowo kompensować efekt upośledzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

W celu weryfikacji postawionych hipotez wykorzystano model eksperymentalny oparty na hamowaniu wzrostu korzeni siewek pomidora przez Kan. Doktorant skorzystał z modelu dobrze scharakteryzowanego w toku uprzednich badań prowadzonych w macierzystej Katedrze. Traktowanie kilkudniowych siewek roztworami kanamycyny, w warunkach laboratoryjnych, hamuje elongację korzenia głównego w sposób powtarzalny i zależny od stężenia aminokwasu. **W tym miejscu chciałabym zapytać Doktoranta o jego opinię na temat fitotoksycznego działania Kan w warunkach naturalnych. Czy Kan ma w ogóle szansę działać jako substancja czynna w relacjach allelopatycznych? Czy jest to substancja na tyle trwała w warunkach naturalnych aby skutecznie oddziaływać na inne rośliny? To pytanie wydaje się istotne także w kontekście wspomnianej perspektywy wykorzystania Kan jako bioherbicydu.**

Wyniki badań opublikowane w 2019 roku w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* wskazują, że zmniejszenie emisji NO przez Kan jest spowodowane hamowaniem ścieżki biosyntezy NO zależnej od Arg. W ten sposób wykazano, że mechanizm działania Kan na

komórki roślinne może być pod tym względem podobny do obserwowanego w tkankach zwierzęcych, przede wszystkim komórkach nowotworowych. Wykazano także, że spadkowi emisji NO towarzyszy obniżenie stężenia S-nitrozoglutationu (GSNO) w korzeniach siewek traktowanych Kan. Takiego efektu należało się spodziewać zważywszy, że ten niskocząsteczkowy SNO powstaje, w toku realizowanej kosztem NO, S-nitrozylacji glutationu. Ponieważ GSNO jest zarówno magazynem NO jak i cząsteczką sygnałową, spadek poziomu tej substancji może być powiązany z zahamowaniem wzrostu korzeni przez Kan. Spadek poziomu GSNO następował wskutek zmniejszenia tempa jego biosyntezy. Dowodów na rzecz tej tezy dostarczyły pomiary aktywności enzymatycznej GSNOR i poziomu ekspresji kodującego ją genu. Obydwa parametry nie zmieniały się istotnie pod wpływem Kan.

Kolejnym aspektem fitotoksycznego działania Kan, którego wyjaśnienia podjął się Doktorant było wskazanie mechanizmu odpowiedzialnego za akumulację RFT w korzeniach siewek traktowanych Kan. W toku badań wykazano, że Kan powoduje spadek aktywności najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych. Pod wpływem traktowania tym analogiem argininy zmniejszała się m.in. aktywność wszystkich izoenzymów SOD, co tłumaczyć może obserwowany wcześniej wysoki poziom $O_2^{\bullet-}$ w korzeniach siewek pomidora traktowanych Kan. Po 24 godzinach ekspozycji na Kan obniżeniu ulegała także aktywność dwóch obecnych w korzeniach izoform CAT. Kan bardzo wyraźnie i trwale hamowała aktywność reduktazy monodehydroaskorbinianu (MDAR). Przejściowo zmniejszała się także aktywność reduktazy glutationu (GR) i peroksydazy glutationowej. **MDAR oraz GR uczestniczą w cyklu ASC-GSH, którego centralnym ogniwem jest reakcja katalizowana przez peroksydazę askorbinianową (APX). Enzym ten kontroluje poziom H_2O_2 w najważniejszych kmpartmentach komórki roślinnej. Zastanawiająca jest nieobecność APX w przeprowadzonych analizach, enzym ten jest aktywnego w korzeniach pomidora i zaangażowany (izoforma mitochondrialna i peroksysomowa) w aklimatyzację do stresów abiotycznych. Czy podejmowano próby analizy aktywności tego enzymu? Czy mierzono H_2O_2 w korzeniach traktowanych Kan?**

Zmniejszała się pod wpływem Kan nie tylko aktywność enzymów antyoksydacyjnych lecz także ekspresja kodujących je genów. Wykazano, że za zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych może być odpowiedzialny mechanizm nitracji białek. W toku wcześniejszych badań realizowanych w zespole wykazano, że traktowanie Kan powoduje wzrost zawartości 3-nitrotyrozyny (3-NT) spowodowany przez nadtlenoazotyn ($ONOO^{\bullet-}$), którego wzrost również obserwowano w analizowanym układzie eksperymentalnym. Doktorant doprecyzował konkluzje wynikające z tych badań identyfikując za pomocą spektrometrii mas nitrowane białka w korzeniach siewek pomidora traktowanych Kan. W ten sposób wykazano, że na drodze nitracji Kan może zmieniać aktywność białek zaangażowanych w ochronę przed stresem oksydacyjnym, jak mitochondrialne inhibitory,

peroksydaza czy MDAR. Jednak nitracji pod wpływem Kan nie podlegały SOD i CAT co wskazuje, że za hamowanie aktywności tych enzymów przez Kan jest odpowiedzialny inny, niezidentyfikowany mechanizm. **Chciałbym zapytać Doktoranta czy ma jakieś pomysły jaki mechanizm mógłby wchodzić w grę?**

Trudniejsze do wyjaśnienia jest funkcjonalne powiązanie wzrostu ONOO⁻, następującego pod wpływem Kan, ze zmianami poziomu transkryptów. Takie zmiany mogą następować na skutek nitracji transkryptów kodujących np. enzymy antyoksydacyjne i/lub inne białka. Aby sprawdzić czy Kan powoduje nitrację RNA w korzeniach siewek pomidora w warunkach ekspozycji na Kan, Doktorant przeprowadził pomiary poziomu 8-nitroguaniny (8-NO₂-G), która jest uważana za marker nitracji kwasów nukleinowych. Wyniki eksperymentu zostały opublikowane w suplemencie do pracy przeglądowej, która ukazała się w czasopiśmie *Planta* w 2020 roku. Nie wskazują one na wzrost nitracji RNA pod wpływem Kan. Poziom 8-nitroguaniny w roślinach traktowanych Kan przez 24 godziny nie różnił się od obserwowanego w kontroli, a po 72 godzinach ekspozycji nawet się obniżał. Na stronie 38 komentarza do cyklu publikacji Doktorant spekuluje, że w reakcji ONOO⁻ z guaniną może preferencyjnie powstawać nie 8-nitroguanina a 8-oksoguanina, „niewidoczna” dla przeciwciał w teście ELISA. **Jest to możliwe, jednak uważam, że trudno wnioskować o wpływie stosowanego czynnika na funkcjonalność transkryptów gdy analizuje się całą pulę RNA, której przecież tylko znikomą część stanowią transkrypty. W moim przekonaniu bardziej konkluzywne byłyby wyniki analiz ukierunkowanych na detekcję 8-NO₂-G w poszczególnych frakcjach komórkowej puli RNA, np. w puli mRNA. Czy Doktorant widzi możliwość i sensowność takich analiz? Jakie podejście metodyczne można by zastosować?**

Wyniki wcześniejszych analiz wskazują, że pomimo wzrostu poziomu RFT i RFN w traktowanych Kan siewkach pomidora nie dochodzi do powstania uszkodzeń oksydacyjnych na dużą skalę. W sytuacji, gdy spada aktywność enzymów antyoksydacyjnych rodzi się pytanie o funkcjonalny mechanizm ochrony antyoksydacyjnej w korzeniach siewek eksponowanych na działanie Kan. Doktorant wykazał, że sumaryczna aktywność antyoksydacyjna, mierzona zdolnością do redukcji rodnika DPPH (rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego) przez ekstrakty metanolowe z korzeni, a także ogólna zawartość tioli w korzeniach siewek wzrastała w korzeniach siewek pomidora na skutek traktowania Kan. W pracy eksperymentalnej opublikowanej w 2020 roku w czasopiśmie *Plants*, jako odpowiedzialne za wzrost zdolności antyoksydacyjnej w korzeniach siewek traktowanych Kan wskazane zostały związki fenolowe, które są skutecznymi wymiataczami wielu komórkowych oksydantów, w tym O₂^{•-} oraz ONOO⁻. Ze wzrostem zawartości związków fenolowych korelowały zmiany aktywności enzymatycznej oksydazy polifenolowej (PPO) oraz liazy fenyloalaninową (PAL) a także ekspresji jednego z genów kodujących ten drugi enzym. W reakcji katalizowanej przez PAL generowany jest kwas *trans*-cynamonowy, prekursor w ścieżkach biosyntezy

większości związków fenolowych. Natomiast PPO uczestniczy w przemianach związków fenolowych katalizując reakcję utleniania o-fenoli do o-chinonów. Wzrost aktywności PAL i PPO może być kluczem do mechanizmu leżącego u podstaw stymulującego wpływu Kan na poziom związków fenolowych w korzeniach. Doktorant spekuluje, że nagromadzenie fenoli może mieć związek z hamowaniem wzrostu korzenia w obecności Kan ze względu na możliwość interakcji z transportem polarnym auksyn. Jest to interesująca hipoteza, którą wspierają do pewnego stopnia dane dostarczone wskutek lokalizacji flawonoidów. Związki te, w korzeniach siewek traktowanych Kan, akumulowane były w czapeczce, merystemie wierzchołkowym i strefie wydłużania a zatem w obszarach w których polarnie transportowana auksyna kontroluje procesy decydujące o wzroście wydłużeniowym korzenia. Jednak należy pamiętać, że regulacyjny wpływ auksyny na aktywność RAM oraz wzrost korzenia realizowany jest w interakcji z wieloma innymi substancjami zaangażowanymi w komórkowy metabolizm redoks, m.in. z askorbinianem (zupełnie nieobecnym w badaniach), glutationem, tioredoksyną etc.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna wzrastała już po 24 godzinach traktowania siewek kanamycyną, natomiast zwiększenie stężenia związków fenolowych w korzeniach wymagało 72 godzinnej ekspozycji na fitotoksynę, która wywierała efekt wyłącznie w najwyższym 50 μM stężeniu. Zatem prawdopodobnie ochrona przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez Kan raczej nie sprowadza się do akumulacji związków fenolowych. **Jak, zdaniem Doktoranta, należałoby ukierunkować dalsze badania aby uzyskać pełniejszy obraz mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej w warunkach ekspozycji roślin na Kan?**

Podsumowując należy stwierdzić, że **Doktorant z powodzeniem rozwinął wątki obecne w badaniach swojego macierzystego zespołu i doprecyzował wiedzę zgromadzoną w toku wcześniejszych badań.** Za ważne osiągnięcie uważam wykazanie, że obniżenie emisji NO wywołane przez Kan jest spowodowane hamowaniem zależnej od Arg ścieżki biosyntezy tej substancji. Badania mgr Staszka wyjaśniły również, dlaczego wywołana przez Kan akumulacja ONOO⁻ powoduje stres oksydacyjny. Przynajmniej częściowo, jest to spowodowane spadkiem aktywności enzymów antyoksydacyjnych i innych białek wskutek nitracji. Wykazano również, że obrona przed stresem oksydacyjnym spowodowanym działaniem Kan spoczywa na drobnocząsteczkowych antyoksydantach, które są akumulowane w reakcji na tą fitotoksynę. **Doktorant dysponuje także umiejętnością dokonywania syntezy zgromadzonej wiedzy** o czym świadczą artykuły przeglądowe włączone do rozprawy oraz dobrze napisany komentarz autorski. Należy podkreślić, że **mgr Staszek skutecznie zdobywał wsparcie finansowe na prowadzone badania** m.in. z programów PRELUDIUM i DIAMENTOWY GRANT. Środki te stanowiły doskonałą inwestycję w rozwój naukowy młodego badacza. Stwierdzam, że **mgr Paweł Staszek wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i doskonalenia warsztatu w**

zakresie biologii eksperymentalnej roślin. Doktorant jest współautorem łącznie dziewięciu prac opublikowanych w czasopiśmie międzynarodowych, współautorem prac popularyzatorskich, rozdziałów w monografiach oraz licznych doniesień konferencyjnych. Jego dorobek wykracza poza wymagania kierowane pod adresem osób na tym etapie kariery naukowej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wysoko oceniam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oraz stwierdzam, że w pełni spełnia ona wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669). Dlatego też z pełnym przekonaniem przedkładam wniosek do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr Pawła Staszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość prowadzonych badań, w tym różnorodność zastosowanych metod badawczych, inicjatywę w zakresie pozyskiwania środków na badania naukowe, walory poznawcze uzyskanych wyników opublikowanych w renomowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, wnioskuje o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jarosław Tyburski