



Warszawa, 15.05.2024r

dr hab. Anna Wawrzyńska  
Pracownia Homeostazy Białek Roślinnych  
Instytut Biochemii i Biofizyki  
Polskiej Akademii Nauk  
ul Pawińskiego 5a  
02-106 Warszawa  
email: blaszczyk@ibb.waw.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr JĘDRZEJA DOBROGOJSKIEGO**

**pod tytułem:**

**„Rola dinukleozydopolifosforanów (N<sub>p</sub>N') i nukleozydo 5'-fosforamidów (NH<sub>2</sub>-pN) w transdukcji sygnału i regulacji szlaku fenylopropanoidowego u winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) i rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Jędrzeja Dobrogojskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, wykonana została pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Pietrowskiej-Borek w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Podstawą do opracowania recenzji jest pismo z dnia 26 marca 2024r. od prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka, Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z informacją o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Jędrzeja Dobrogojskiego.

Pan mgr Jędrzej Dobrogojski ukończył studia pierwszego stopnia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stacjonarne studia magisterskie odbył na kierunku biotechnologia tej samej uczelni. Ukończył je w dniu 16 czerwca 2018 roku z oceną końcową dobry plus. W przedstawionych dokumentach brak informacji czy Doktorant starał się wcześniej o nadanie stopnia doktora, zatem uznaję, że jest to jego pierwszy przewód doktorski. Aktualnie jest doktorantem V roku Stacjonarnych Studiów Doktoranckich prowadzonych przy Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, zrealizował program tych studiów i zdał wszystkie wymagane egzaminy.

Problematyka badawcza pracy doktorskiej dotyczy roli nietypowych nukleotydów, do których należą dinukleozydopolifosforany ( $Np_nN'$ ) oraz nukleozydo 5'-fosforamidy ( $NH_2-pN$ ), w przesyłaniu sygnału stresu środowiskowego. Jest to grupa nukleotydów o mało poznanej funkcji u roślin, choć ich występowanie wykazano już bardzo wiele lat temu u zwierząt, bakterii czy drożdży. Zakwalifikowano je nawet do grupy związków nazywanych „alarmonami” ze względu na znaczący wzrost ich poziomu w komórkach poddawanych stresom. Występowanie wspomnianych nukleotydów nietypowych u roślin potwierdzono poprzez identyfikację enzymów zaangażowanych w ich syntezę oraz degradację. Jedną ze strategii obronnych u roślin wyższych w odpowiedzi na stres środowiskowy jest wzmożona synteza produktów szlaku fenylopropanoidowego. Wiadomo, że w aktywację tego szlaku zaangażowane są właśnie nukleotydy nietypowe. Nieznany jest jednak mechanizm ich działania ani białko receptorowe i cała ścieżka przekazywania sygnału. Funkcja nukleotydów oraz regulacja przez nie szlaku fenylopropanoidowego u roślin od lat pozostaje w kręgu zainteresowań naukowych grupy prowadzonej przez dr hab. Małgorzatę Pietrowską-Borek, promotorkę Doktoranta.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest oparta na czterech publikacjach, które ukazały się w ciągu ostatnich 3 lat:

- 1./ Pietrowska-Borek M., **Dobrogojski J.**, Sobieszczuk-Nowicka E., Borek S. 2020. New insight into plant signaling: extracellular ATP and uncommon nucleotides. *Cells*, 9, 345.
- 2./ Pietrowska-Borek M., Wojdyła-Mamoń A., **Dobrogojski J.**, Młynarska-Cieślak A., Baranowski MR., Dąbrowski JM., Kowalska J., Jemielity J., Borek S., Pedreño MA., Guranowski A. 2020. Purine and pyrimidine dinucleoside polyphosphates differentially affect the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell suspension cultured cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 125-132.

- 3./ Pietrowska-Borek M., **Dobrogojski J.**, Wojdyła-Mamoń AM., Romanowska J., Gołębiowska J., Borek S., Murata K., Ishihara A., Pedreño MÁ., Guranowski A. 2021. Nucleoside 5'-phosphoramidates control the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* suspension-cultured cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 13567.
- 4./ **Dobrogojski J.**, Nguyen V.H., Kowalska J., Borek S., Pietrowska-Borek M. 2023. The plasma membrane purinoreceptor P2K1/DORN1 is essential in stomatal closure evoked by extracellular diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 16688.

Recenzowana rozprawa doktorska została pozytywnie zweryfikowana przez system oceny antyplagiatowej JSA. Jej układ jest zgodny z normami dla tego typu opracowań. Przedłożona rozprawa składa się z 11 rozdziałów, z czego treści merytoryczne zajmują 33 strony (od rozdziału V do IX). Składa się na nie: Wykaz skrótów, Wprowadzenie, Hipotezy i cele badań, Omówienie uzyskanych wyników, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia obejmująca 67 pozycji. Pozostałe rozdziały zawierają wymagane ustawą elementy, m.in. Streszczenia w języku polskim i angielskim, Oświadczenia współautorów prac oraz Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy. Układ pracy jest czytelny i minimalistyczny w formie. Cztery oryginalne prace opublikowane w specjalistycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym czynniku wpływu (Impact Factor) 22,678, stanowią podstawę rozprawy. Jedna z prac jest pracą przeglądową. Za ledwie w jednej pracy Doktorant jest pierwszym autorem. Jednakże Jego wkład w powstanie wszystkich prac jest znaczący i nie budzi to zastrzeżeń, chociaż nie wskazano konkretnie w procentach udziału Doktoranta w poszczególnych publikacjach. Z przedstawionych oświadczeń wynika, że brał udział zarówno w etapie projektowania niektórych eksperymentów, jak i ich przeprowadzeniu, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Skład autorski przedstawionych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, które prezentowane są w przedstawionej do oceny rozprawie. Autorem korespondencyjnym wszystkich prac jest Promotor dr hab. Małgorzata Pietrowska-Borek. Wszystkie trzy prace doświadczalne będące przedmiotem rozprawy prezentują powiązane tematycznie oryginalne podejście do zarysowanego problemu naukowego. Ich wspólnym mianownikiem było wykazanie roli nukleotydów nietypowych jako cząsteczek sygnałnych.

Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały napisane właściwie. Obejmują uzasadnienie podjętej problematyki badawczej, cele pracy, krótki opis uzyskanych rezultatów oraz najważniejsze wnioski ze zrealizowanych badań.

Rozprawa mgr Jędrzeja Dobrogojskiego rozpoczyna się od teoretycznego Wprowadzenia, gdzie Doktorant opisał syntetycznie aktualny stan wiedzy. Dużo informacji znajduje się też w Publikacji nr 1 Autora rozprawy, która jest pracą przeglądową z 2020r. Wprowadzenie stanowi dobre wprowadzenie do problematyki rozprawy, jest klarowne i zwięzłe, nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Jak dla mnie zabrakło ilustracji, np. obrazujących budowę nukleotydów nietypowych - dinukleozydopolifosforanów i nukleozydo 5'-fosforamidów oraz szlak fenylopropanoidowy z jego enzymami i poszczególnymi metabolitami. Te ilustracje pojawiają się wprawdzie w omawianych pracach, ale umieszczenie ich bezpośrednio we Wprowadzeniu ułatwiło by jego odbiór. Drobne zastrzeżenia dotyczą błędów edytorskich, np. na str. 13 „Podobny efekt zaobserwowano pod wpływem przepuszczalnych dla błon komórkowych...” powinno być: „Podobny efekt zaobserwowano pod wpływem przepuszczalnych **przez** błony komórkowe...”; na str. 14 „Coraz więcej badań nad udziałem w odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe dotyczą...” powinno być: „Coraz więcej badań nad udziałem w odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe **dotyczy...**”. **We Wprowadzeniu Doktorant wspomina, że pod wpływem nukleotydów nietypowych dochodzi w Arabidopsis do wzmożonej syntezy kwasu salicylowego. Czy wiadomo coś o wpływie tych nukleotydów na poziomy innych fitohormonów?**

Hipotezy i cele badań sformułowano jasno i jednoznacznie, są one zgodne z tematyką rozprawy. Autor rozprawy sformułował aż 7 celów szczegółowych, ale wszystkie składają się na jeden nadrzędny cel podkreślający spójny charakter przeprowadzonych badań.

Zabrakło mi rozdziału opisującego techniki stosowane w pracy, gdzie Doktorant powinien wymienić i opisać główne metody, które wykorzystał do uzyskania wyników. Odzwierciedlały by one zakres badań zaprezentowany w artykułach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i świadczyły o opanowaniu przez Doktoranta właściwego warsztatu badawczego.

Wyniki opisane w publikacjach, które stanowią podstawę rozprawy mgr Jędrzeja Dobrogojskiego, zostały przedstawione w rozdziale Omówienie uzyskanych wyników. Opisane są jasno i precyzyjnie, stanowią streszczenie trzech publikacji wynikowych. Poprzedzone są krótkim wprowadzeniem i hipotezą badawczą przedstawioną w Publikacji nr 1, pokazującą szlak transdukcji sygnału wywołanego przez  $Np_nN'$  i  $NH_2-pA$  u roślin prowadzący do modyfikacji ekspresji genów szlaku fenylopropanoidowego i syntezy kwasu salicylowego. Właśnie tę hipotezę Doktorant weryfikuje w swoich badaniach. Uzyskane przez Doktoranta wyniki opisane w trzech kolejnych publikacjach są bardzo ciekawe. Publikacja nr 2 i Publikacja nr 3 są bardzo do siebie podobne w schemacie doświadczeń. Pan mgr Jędrzej Dobrogojski opisał w nich wpływ nukleotydów nietypowych na szlak fenylopropanoidowy w kulturach zawieszinowych winorośli właściwej. Winorośl została tu wybrana jako gatunek modelowy ze względu na wysoką zawartość

fenylopropanoidów. W Publikacji nr 2 opisano wpływ egzogennie podanych nukleotydów purynowych (Ap<sub>3</sub>A i Gp<sub>3</sub>G), pirymidynowych (Up<sub>3</sub>U i Up<sub>4</sub>U) oraz puryno-pirymidynowej hybrydy (Ap<sub>3</sub>U) na wzrost ilości trans-resweratrolu i trans-piceidu, czyli związków należących do grupy stilbenów. Skorelowane to było ze wzrostem ekspresji wybranych genów kodujących enzymy szlaku fenylopropanoidowego. Co ciekawe, inne badane nukleotydy pirymidynowe (Cp<sub>3</sub>C, Cp<sub>4</sub>C) i purynowo-pirymidynowy Ap<sub>4</sub>C silnie hamowały ekspresję genów kodujących enzymy szlaku fenylopropanoidowego, co korelowało z obniżoną akumulacją stilbenów w komórkach jak i w pożywce. Wskazuje to na odmienny mechanizm w jaki nukleotydy zawierające różne purynowe lub pirymidynowe nukleozydy modyfikują szlak fenylopropanoidowy. Publikacja nr 3 w podobny sposób prowadzi czytelnika poprzez analizy wpływu na szlak fenylopropanoidowy kolejnych badanych przez Doktoranta nukleotydów. Tym razem są nimi purynowe i pirymidynowe nukleozydo 5'-fosforamidy. I tu najbardziej skutecznym w indukcji genów kodujących enzymy szlaku fenylopropanoidowego okazał się być nukleotyd NH<sub>2</sub>-pC. Największy wzrost ekspresji genów odnotowano po 72 godzinach od podania nukleotydów. Natomiast największą akumulację stilbenów w komórkach zadziwiająco wykazano po 24 i 48 godzinach, podczas gdy po 72 godzinach ich zawartość była już równa kontroli. **Prosiłabym Doktoranta o wyjaśnienie mechanizmu tego fenomenu. Dlaczego w komórkach kontrolnych odnotowany został tak znaczny wzrost zawartości stilbenów po 24 godzinach od rozpoczęcia badania skoro nie było żadnej zmiany w ekspresji genów tego szlaku?** Uzyskane wyniki badań wyraźnie uwydatniają udział egzogennie dodanych Np<sub>n</sub>N' i NH<sub>2</sub>-pN w kontroli aktywności szlaku fenylopropanoidowego, a zatem wskazują, że są to cząsteczki sygnałne. **Jaki Doktorant zaproponowałby mechanizm działania dinukleozydopolifosforanów i nukleozydo 5'-fosforamidów w indukcji syntezy stilbenów? Jak hipotetycznie przebiegałaby ścieżka sygnałna prowadząca do zmian transkrypcyjnych? I jak ewentualnie eksperymentalnie potwierdzić te przewidywania teoretyczne?** W Publikacji nr 4 opisana jest właśnie taka ścieżka sygnałna prowadząca do efektu fizjologicznego jakim jest zamykanie aparatów szparkowych. Tym razem jako roślinę modelową użyto *Arabidopsis thaliana*. Ponieważ dobrze opisanym u roślin receptorem nukleotydu purynowego, eATP, jest błonowa kinaza białkowa P2K1/DORN1, słusznie zauważono, iż może ona też być receptorem dla purynowych dinukleozydopolifosforanów. Wykazano, że egzogennie podane Ap<sub>4</sub>A i Cp<sub>4</sub>C indukują zamknięcie aparatów szparkowych, a w przypadku Ap<sub>4</sub>A ten proces jest zależny od receptora P2K1/DORN1. Prawdopodobnie, nukleotydy pirymidynowe, są wiązane przez inny typ receptorów. **I tu mam do Doktoranta pytanie – czy są znane jakieś pirymidyno-receptory, które ewentualnie mogłyby wiązać Cp<sub>4</sub>C?** Następnie dowiedziono, że w proces zamykania aparatów szparkowych przez Ap<sub>4</sub>A i Cp<sub>4</sub>C są zaangażowane wolne rodniki tlenowe. Ap<sub>4</sub>A wyraźnie był zaangażowany w indukcję

ekspresji kluczowych genów, kodujących np. oksydazę RBOHF, kinazy MAP, kinazy SnRK, zaangażowanych w procesy obronne przed stresami środowiskowymi. Ciekawym aspektem jest, że Cp4C nie wywoływał indukcji ekspresji tych genów, co sugeruje istnienie innej ścieżki sygnałowej dla nukleotydów pirymidynowych. **Prosiłabym Doktoranta o interpretację wyniku umieszczonego na Figurze 5 w Publikacji nr 4, dotyczącego zmian ekspresji genów. Dlaczego puryny powodują indukcję ekspresji genów m.in. dla oksydazy RBOHF, kinazy MAP, kinaz SnRK, skoro transdukcja sygnału polega tu raczej na szybkich reakcjach fosforylacji/defosforylacji poszczególnych białek w kaskadzie sygnałowej?**

Podsumowaniem rozprawy są trzy główne wnioski, dla każdej publikacji oddzielny, poparte wyszczególnionymi najważniejszymi wynikami z prac. Autor starał się konsekwentnie odpowiedzieć na pytania i wyjaśnić kwestie służące realizacji celu postawionego na wstępie pracy. Wnioski są sformułowane prawidłowo i podkreślają najistotniejsze osiągnięcia pracy.

**I na koniec pytanie dotyczące metabolizmu siarkowego roślin, a więc mojego spektrum zainteresowań. Substratem do syntezy nukleozydo 5'-fosforamidów jest adenozylo 5'-fosfosiarazan, pierwszy produkt na ścieżce redukcji siarczynu do siarczku (APS). Czy możliwe jest, że nukleozydo 5'-fosforamidy jako tak ściśle powiązane z APS mogą uczestniczyć w sygnalizacji deficytu siarkowego? Albo być sygnałem ogólnej dostępności siarki?**

I na koniec jeszcze dwie drobne poprawki edytorskie, które udało mi się znaleźć:

- na str. 7 w Streszczeniu rozprawy doktorskiej: „...mutanta *dorn1-3* typu knock-out posiadającym insercję T-DNA” powinno być „...mutanta *dorn1-3* typu knock-out posiadającym insercję T-DNA”
- na str. 21 w Omówieniu uzyskanych wyników: „... po 24 godzinach trwania eksperymentu” powinno być „... po 24 **godzinach** trwania eksperymentu”

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest pracą oryginalną o wysokiej wartości naukowej. Cykl doświadczeń wykonanych w ramach tej pracy, którego celem było określenie roli wybranych nukleotydów nietypowych w transdukcji sygnału i regulacji szlaku fenylopropanoidowego u winorośli właściwej i rzodkiewnika pospolitego, został dobrze przemyślany, poprawnie wykonany i opisany, a przede wszystkim wyniki zostały już poddane krytycznej ocenie przez niezależnych recenzentów, ekspertów z dziedziny, którzy docenili wartość merytoryczną prezentowanych wyników. Autor dysertacji bazując na uzyskanych wynikach potwierdził postawione przez siebie 3 hipotezy badawcze.

Poza opisanymi w rozprawie publikacjami Doktorant jest także współautorem 6 innych anglojęzycznych publikacji naukowych, jak wynika z załączonego Wykazu osiągnięć naukowych.

Nie zostały one ujęte w przedstawionej rozprawie, gdyż dotyczą innej tematyki, którą Doktorant zajmował się podczas wykonywania pracy licencjackiej i magisterskiej w Zakładzie Fizjologii Roślin Wydziału Biologii Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu, a także podczas stażu w ramach programu Erasmus+ odbytego na University of Natural Resources and Life Sciences w Wiedniu. Pan mgr Jędrzej Dobrogojski jest współautorem 20 doniesień konferencyjnych, w tym 5 zaprezentowanych zagranicą. Odbył 2 staże naukowe w ośrodkach krajowych oraz 3 staże naukowe w różnych ośrodkach europejskich. Jest to dość znaczący dorobek, jak na ten etap kariery naukowej. Te udokumentowane naukowe aktywności Doktoranta świadczą o niezwyklej pracowitości i zaangażowaniu w prace związane z poruszaną tematyką i umiejętności pracy zespołowej.

### WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam wysoko. Pan mgr Jędrzej Dobrogojski wykazał się dużą wiedzą z zakresu tematyki prowadzonych badań, umiejętnością planowania i wykonywania doświadczeń oraz formułowania wniosków i ich dyskusji, co jest niezbędne u dojrzałych naukowo badaczy. Rozprawa zawiera szereg elementów nowości naukowej i stanowi bardzo użyteczny wkład do wiedzy o nukleotydach nietypowych jako cząsteczkach sygnałnych. Rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2023r. poz. 742). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Jędrzeja Dobrogojskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i **popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora**. Mając na uwadze zakres, poziom i wagę przeprowadzonych badań oraz wysoką aktywność naukową Doktoranta, wnioskuję także o **wyróżnienie** jego pracy stosowną nagrodą.



*dr hab. Anna Wawrzyńska*