



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

dr hab. Krzysztof Jaworski, prof. UMK  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń  
e-mail: jaworski@umk.pl

Toruń, 2024.05.10

## Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Jędrzeja Dobrogojskiego

**pt. „Rola dinukleozydopolifosforanów (N<sub>p</sub>nN')** 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.)”

wykonanej pod promotorstwem dr hab. Małgorzaty Pietrowskiej-Borek, prof. UPP w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

### Wprowadzenie

Komórka, jak i cały wielokomórkowy organizm, jest układem zamkniętym posiadającym pewien stan uporządkowania. Informacje docierające do komórki zarówno zewnątrz, jak i te będące konsekwencją pojawienia się czynników wewnętrznych, wymuszają zmianę aktualnego stanu stacjonarnej komórki w odniesieniu do wybranych procesów. Dzięki obecności mechanizmów regulujących, komórka rozpoznaje i specyficznie odpowiada na każdy bodziec, który niosąc swoją informację, zmienia stan aktualnie panujący. Za odbiór i analizę sygnałów odpowiadają wyspecjalizowane białka receptorowe, które przekazują i kierują informację do właściwych, stępujących, elementów efektorowych w komórce formujących produkt finalny jako odpowiedź komórki. Docelowo prowadzi to do zmian w ekspresji genów, reorganizowania cytoszkieletu czy modyfikacji aktywności białek.

Przeniesienie informacji zawartej w bodźcu do miejsca uczestniczącego bezpośrednio w inicjacji procesu swoistej odpowiedzi fizjologicznej zachodzi za pośrednictwem kaskady zdarzeń, które formują szlak transdukcji sygnału, angażując szereg białkowych i niebiałkowych cząsteczek sygnałnych takich jak jony wapnia, tlenek azotu czy różne formy nukleotydów, które muszą się pojawić w komórce w określonym czasie by prawidłowo sformułować odpowiedź.

Wyjaśnienie szlaków transdukcji sygnału od lat jest nadrzędnym celem wielu badań naukowych. Niezależnie od obszaru badacze starają się odkryć i poznać elementy tych układów, ustalić ich kolejność w szlaku, wyjaśnić ich rolę i mechanizm działania w przekazywaniu informacji.

Uzupełnienie wiedzy w tej tematyce jest nadrzędnym celem przedstawionej mi do oceny dysertacji, w której Pan mgr Jędrzej Dobrogojski podjął udany wysiłek, ugruntowania pozycji dinukleozydopolifosforanów (N<sub>p</sub>nN') oraz nukleozydo 5'-fosforamidów (NH<sub>2</sub>-pN), przedstawicieli tzw. nukleotydów nietypowych, jako cząstek sygnałnych Wykorzystując winorośl właściwą i rzodkiewnika



pospolitego jako model badawczy, określił rolę tych nukleotydów w regulacji szlaku fenylopropanoidowego, kluczowego etapu w odpowiedzi roślin na stres, a także w transdukcji sygnału. Biorąc pod uwagę wzrost zainteresowania nukleotydami jako cząstkami sygnałnymi u roślin, zwłaszcza cyklicznymi nukleotydami, oraz niewielką ilość danych literaturowych, podjęcie czy kontynuacja badań związanych z tym tematem są całkowicie uzasadnione.

### Ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr Jędrzeja Dobrogojskiego, stanowi spójny tematycznie cykl publikacji, na który składają się cztery oryginalne prace anglojęzyczne, opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Jeden artykuł opublikowany w czasopiśmie *Cells* (MDPI) ma charakter przeglądowy, trzy pozostałe to prace eksperymentalne, opublikowane w *Plant Physiology and Biochemistry* (Elsevier) oraz *International Journal of Plant Science* (MDPI). Sumaryczny impact factor (zgodny z rokiem wydania) wynosi 22,678, zaś całkowita wartość według kryteriów MNiSW stanowi 480. Mgr Jędrzej Dobrogojski jest pierwszym autorem jednej pracy eksperymentalnej a w pozostałych jest na drugim lub trzecim miejscu. Zważywszy, że artykuły są wieloautorskie, pozycja doktoranta świadczy o znaczącym udziale w powstałe prace.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ, typowy dla prac doktorskich stanowiący zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Została opatrzona w kilkunastostronicowy komentarz podzielony na części. Całość otwiera wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Kolejne części obejmują streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie teoretyczne do analizowanego problemu, przyjęte hipotezy badawcze oraz cel główny badań i wykonane cele szczegółowe. Najobszerniejszą część stanowią, zrelacjonowane w zwięzły sposób zwięzły, po których autor dokonał podsumowania i wyciągnął wnioski. W mojej ocenie ten punkt lepiej by się prezentował, gdyby był rozbity na dwa osobne rozdziały z wyraźnie zaznaczonymi wnioskami lub prezentujący tylko wnioski. Całość rozprawy kończy spis wykorzystanej literatury fachowej, oświadczenia współautorów oraz kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Ogólnie do tej części oceny nie mam zastrzeżeń. Całość czyta się dobrze. Autor w sposób kompaktowy, logiczny i chronologiczny, a w mojej ocenie przejrzysty, opisał aktualny stan wiedzy i swoje osiągnięcia. Pomimo ogólnie dobrze napisanej pracy w opracowaniu pojawia się kilka niefortunnych wyrazów i sformułowań. np. zamiast sformułowania „co ciekawe” lepiej użyć „godne podkreślenia” czy „interesujące”. Doktorant używa też parokrotnie zwrotu, że „dany gen był kilkakrotnie indukowany” np., „Uzyskane dane wykazały, że gen *4CL1* ulegał ok. 10-krotnej indukcji pod wpływem  $\text{NH}_2\text{-pC}$ ”. Owszem można tak zrobić i taka sytuacja może się wydarzyć, ale w tych konkretnych przypadkach domniemam, że doktorant indukował badany gen jednokrotnie osiągając 10-krotny wzrost jego ekspresji.

### Ocena merytoryczna

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej ściśle wiąże się z badaniami nad nietypowymi nukleotydami u roślin, realizowanymi od wielu lat przez Panią promotor, dr hab. Małgorzatę Pietrowską-Borek, prof. UPP. W ramach przeprowadzonych badań mgr Jędrzej Dobrogojski skoncentrował się na



realizacji dwóch problemów badawczych. Pierwszy obejmował wskazanie sygnałowej roli pełnionej przez purynowe i pirymidynowe dinukleozydopolifosforany ( $Np_nN'$ ) oraz nukleozydo 5'-fosforamidy ( $NH_2-pN$ ), w reakcji obronnej roślin poprzez pośrednie uczestnictwo w regulację poziomu transkrypcji kluczowych enzymów szlaku fenylopropanoidowego prowadzącego do produkcji enzymów odpowiedzialnych za syntezę obronnych metabolitów wtórnych takich jak flawonoidy, ligniny czy stilbeny w odpowiedzi na działanie zarówno biotycznych, jak i abiotycznych czynników stresowych. Drugi z problemów miał na celu potwierdzenie, że oba typy nukleotydów stanowią istotny element szlaku prowadzącego do zamykania się komórek szparkowych, a białko receptorowe LecRK-I.9 (P2K1/DORN1) jest elementem niezbędnym do zajścia tego procesu.

Jako model badawczy posłużyły doktorantowi: użytkowa winorośl właściwa (*Vitis vinifera* L.) i ruderalny rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.).

Wyniki swoich prac doktorant przedstawił w 3 pracach. Dwa pierwsze artykuły zawierają wyniki badań nad udziałem  $Np_nN'$  i  $NH_2-pN$  jak cząstek sygnałowych w kontroli aktywności szlaku fenylopropanoidowego.

W pierwszym artykule zatytułowanym (Purine and pyrimidine dinucleoside polyphosphates differentially affect the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell suspension cultured cells) doktorant dowiódł, że w komórkach winorośli traktowanych dinukleozydopolifosforanami dochodzi do odmiennego mechanizmu regulacji szlaku fenylopropanoidowego, a zależność ta jest wynikiem odmiennej budowy nukleotydu, w którym kluczową rolę odgrywa purynowy lub pirymidynowy nukleozyd. Ten wniosek Doktorant wyciągnął obserwując, iż dinukleotydy adeninowe, guaninowe i urydynowe ( $Ap_3A$ ,  $Gp_3G$ ,  $Up_3U$  i  $Up_4U$ ) ale nie cytydynowe ( $Cp_3C$  i  $Cp_4C$ ), już w pierwszych 24h wpływały na wzrost akumulacji stilbenów, *trans*-resweratrolu i *trans*-piceidu w pożywkach w porównaniu do kultur kontrolnych. Wzrost ten korelował z podwyższoną ekspresją genu (*ABCG44*) kodującego białko ABCG44 odpowiedzialne za transport *trans*-resweratrol na zewnątrz komórki, a także wzmożoną ekspresją dwóch genów *C4H1* oraz *STS1* kodującego enzym katalizujący syntezę *trans*-resweratrolu. W obecności nukleotydów z cytydyną w cząsteczce dochodziło do wyraźnego zmniejszenia ekspresji powyższych genów, co wpływało na ilość badanych stilbenów zarówno w komórkach jak i w pożywce. Doktorant wykazał, iż wyciszeniu ekspresji genów szlaku syntezy *trans*-resweratrolu, towarzyszył natomiast kilkukrotny wzrost poziomu transkryptów genów *PAL1*, *4CL1* oraz *CCR2* prowadzących do syntezy lignin, jednego z odgałęzień szlaku syntezy fenylopropanoidów.

W drugim artykule (Nucleoside 5'-phosphoramidates control the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* suspension-cultured cells) doktorant zastosował analogiczne podejście koncepcyjno-eksperymentalne badając tym razem wpływ nukleozydo 5'-fosforamidów ( $NH_2-pN$ ). Autor wykazał, że podobnie jak dinukleotydy ( $Np_nN'$ ),  $NH_2-pN$  również regulują szlak fenylopropanoidowy w komórkach winorośli zależnie od typu nukleotydu. Doktorant wykazał, że każdy z testowanych  $NH_2-pN$ , w sposób zróżnicowany, powodował akumulację *trans*-resweratrolu oraz *trans*-piceidu w komórkach winorośli i medium hodowlanym, a także zwiększał ekspresję genu (*VvABCG44*) transportera *trans*-resweratrolu. Wszystkie badane nukleotydy, pośrednio wpływały na ekspresję genów (*PAL1*, *C4H1*, *4CL1*, *STS1*) szlaku biosyntezy stilbenów i lignin, przy czym najsilniejszy efekt doktorant zanotował pod wpływem nukleotydu cytydyno 5'-fosforamidu ( $NH_2-pC$ ).

Nieodłącznym i najważniejszym etapem działania cząsteczki sygnałowej jest jej percepcja przez właściwy receptor. Próbę znalezienia receptora dla badanych nukleotydów mgr Jędrzej Dobrogojski opisał w trzecim artykule (The plasma membrane purinoreceptor P2K1/DORN1 is essential in stomatal



closure evoked by extracellular diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) in *Arabidopsis thaliana*). Doktorant oparł swoje badania na poznanym i dobrze opisanym u roślin receptorze zewnątrzkomórkowego nukleotydu purynowego (eATP) - P2K1/DORN1, którego aktywacja prowadzi do zamykania się aparatów szparkowych. Ten fizjologiczny proces jest zarazem modelowym systemem umożliwiającym badania nad transdukcją sygnałów w komórce w odpowiedzi na czynnik stresowy. W następstwie badań doktorant wykazał, że również dinukleotydy, ale tylko adeninowy i cytydynowy (Ap<sub>4</sub>A i Cp<sub>4</sub>C), również wpływają na zamykanie się aparatów szparkowych, a szlak transdukcji przebiega w sposób podobny jak w przypadku eATP, angażując reaktywne formy tlenu (RFT) jako pośrednie cząsteczki sygnałowe. Opierając się ponadto na wynikach badań przeprowadzonych na komórkach zwierzęcych, pokazujących, że różne nukleotydy, w tym eATP i Ap<sub>4</sub>A, mogą być wiązane przez te same grupy receptorów, doktorant postanowił sprawdzić czy taki mechanizm jest uniwersalny i może występować w przypadku zamykania się aparatów szparkowych u roślin. Prowadząc obserwacje fizjologiczne i porównawcze badania molekularne na roślinach posiadających nieaktywny receptor eATP (mutant *dorn1-3*) doktorant wykazał, że receptor P2K1/DORN1 jest kluczowym elementem w percepcji i transdukcji sygnału wywołanego również przez Ap<sub>4</sub>A i może funkcjonować jako jego receptor. Pokazał ponadto, że szlak transdukcji może przebiegać przez wspólne elementy, gdyż podobnie jak eATP, Ap<sub>4</sub>A wpływa na ekspresję tych samych genów (geny kodujące izoformy kinaz SnRK, MAPK6 czy białka kanałów zależnych od cyklicznych nukleotydów; CNGC2) i nie wywołuje zmian w aperturze aparatów szparkowych w mutancie *dorn1-3*. Wykluczył jednocześnie by proces przebiegał analogicznie dla nukleotydu Cp<sub>4</sub>C.

Uzupełnieniem powyższych osiągnięć eksperymentalnych, jest artykuł przeglądowy, współautorstwa mgr Jędrzeja Dobrogojskiego, opisujący obecny stan wiedzy na temat tej grupy elementów sygnałowych, nietypowych nukleotydów roślinnych.

W tym miejscu, wykorzystując przywilej recenzenta prosiłbym by doktorant ustosunkował się do poniższych pytań:

1. W publikacjach sygnalizuje Pan, iż do chwili obecnej nie oznaczono nukleotydów nietypowych w roślinnych. Gdzie wg Pana, tkwi przyczyna braku możliwości oznaczenia endogennego poziomu badanych przez Pana nukleotydów? Czy podejmował Pan próby oznaczenia poziomu tych nukleotydów?
2. W pierwszym artykule, na figurze 2 (str. 68), przedstawiającej poziom *trans*-piceidu w pożywce, widać wyraźne wahania tego glikozydu w próbach kontrolnych, niezależnie od traktowania nukleotydem. Czy mógłby doktorant wytłumaczyć przyczynę takiego stanu rzeczy?
3. Jak wytłumaczy Pan, że receptor eATP (P2K1/DORN1) jest również receptorem dla dinukleotydu Ap<sub>4</sub>A? Czy można pokusić się już o stwierdzenie, że jest to receptor uniwersalny dla nukleotydów z adeniną w cząsteczce, a jednocześnie selektywny względem pozostałych? Czy idąc tym tokiem jest możliwe, że ten receptor może wiązać również NH<sub>2</sub>-pA?
4. Czy podjął Pan próbę symulacji *in silico* dokowania nukleotydów ATP i Ap<sub>4</sub>A z receptorem celem potwierdzenia wyciągniętych wniosków?
5. Z przedstawionej metodyki wynika, że doświadczenia prowadzone na kulturach komórkowych winorośli były prowadzone w ciemności. Czy może Pan wytłumaczyć czemu przyjął Pan taki wariant eksperymentalny?
6. Czy na podstawie tego, co Pan przedstawił w swojej rozprawie, do której grupy cząstek sygnałowych zaliczy Pan badane nukleotydy, do ligandów czy wtórnych przekaźników informacji?



## Podsumowanie

Po analizie dysertacji doktorskiej oraz artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego mgr Jędrzeja Dobrogojskiego stwierdzam, że wyniki przedstawione w tych pracach w pełni realizują założenia rozprawy. Doktorant przedstawił oryginalne, ciekawe i wartościowe dane dostarczając nowych informacji wyjaśniających funkcje sygnałne dinukleozydopolifosforanów i nukleozydo 5'-fosforamidów oraz wskazując potencjalnie elementy transdukcji sygnału przez nie wywołane, w szczególności identyfikując potencjalny receptor. Po lekturze tych pracy, jak również analizując pozostałe osiągnięcia doktoranta, jestem przekonany, że mgr Jędrzej Dobrogojski jest dobrze ukształtowanym badaczem, gotowym do samodzielnego przeprowadzania eksperymentów, oceny uzyskanych wyników, jak również ich prezentacji w świetle aktualnego stanu wiedzy.

## Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Praca przyczyniła się do znacznego wzbogacenia wiedzy na temat nukleotydów jako cząstek sygnałnych w komórkach roślinnych, potwierdza ogólną wiedzę doktoranta oraz jego umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Jędrzeja Dobrogojskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wartość naukową uzyskanych wyników wnioskuję do Wysockiej Rady o możliwość wyróżnienia pracy odpowiednią nagrodą.