

Warszawa, 27. 05. 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jędrzeja Dobrogojskiego pt. "Rola dinukleozydopolifosforanów (Np_nN') i nukleozydo 5'-fosforamidów (NH_2-pN) w transdukcji sygnału i regulacji szlaku fenylopropanoidowego u winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) i rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)". Recenzja wykonana na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Pietrowskiej-Borek, prof. UPP.

Ocena formalna

Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

Przenoszenie informacji w komórce (oraz między komórkami) stanowi istotny element funkcjonowania organizmów żywych. Szczególną rolę w transdukcji pełnią wtórne przekaźniki sygnału takie jak nukleotydy, w tym cykliczne nukleotydy jak i nietypowe nukleotydy z grupy dinukleozydopolifosforanów (Np_nN') i nukleozydo 5'-fosforamidów (NH_2-pN). Wyniki badań, przedstawionych przez Doktoranta, stanowią kontynuację i rozwinięcie tematyki badawczej dotyczącej udziału dinukleozydopolifosforanów (określanych też mianem „alarmonów”) jako modulatorów szlaku fenylopropanoidowego w zawieszynie komórek winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) i w siewkach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.).

W zależności od zastosowanego typu nukleotydu, cząsteczki te w sposób zróżnicowany regulują aktywność szlaku fenylopropanoidowego w komórkach winorośli właściwej. Wzrost

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Dr hab. Urszula Krasuska,
prof. SGGW
Instytut Biologii
Katedra Fizjologii Roślin

ul. Nowoursynowska 159
bud. 37, pok. 0/122,
02-776 Warszawa
+48 22 593 25 29
urszula_krasuska@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl



aktywności poszczególnych enzymów tego szlaku jest powszechnie obserwowanym zjawiskiem u roślin, szczególnie jako reakcja na czynniki środowiskowe (biotyczne i abiotyczne). Różne produkty (i produkty pośrednie) szlaku fenylopropanoidowego stanowią wyspecjalizowane metabolity, często o charakterze obronnym np. w reakcji na stres nitrooksydacyjny. Enzymy i metabolity tego szlaku wzbudzają zainteresowanie badaczy, ponieważ wpływają na określone cechy roślin (materiału roślinnego). Wzrost wydajności upraw dzięki modyfikacjom składu metabolitów wtórnych, szczególnie takich o wysokim, biologicznym potencjale (np. *trans-resweratrolu*) stanowi istotny cel w produkcji roślinnej. Inną, fundamentalną reakcją roślin na niekorzystne warunki środowiska (np. niedobór wody) jest zamykanie aparatów szparkowych. Niewiele wiadomo na temat udziału nietypowych nukleotydów w transdukcji sygnału prowadzącego do zmian przewodności szparkowej. Szczególnie ciekawe jest oddziaływanie tych cząsteczek z innymi, których funkcja (zwłaszcza sygnałowa) jest już zdecydowanie lepiej opisana (np. z reaktywnymi formami tlenu (ROS) i azotu (RNS)). Tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta nie jest szeroko rozpowszechniona w świecie naukowym. Dostępne są tylko nieliczne prace opublikowane w czasopiśmie naukowym, dotyczące tej problematyki. Zatem wyniki, które przedstawia Doktorant stanowią istotny wkład w rozwój tego zagadnienia i dostarczają nowych informacji dla współczesnej wiedzy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma formę zwięzłego opracowania, do którego zostały dołączone cztery prace opublikowane w czasopiśmie naukowym znajdujących się na liście JCR:

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., Dąbrowki 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 MA., 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_4A) in *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Molecular Sciences, 24: 16688.

Sumaryczny czynnik wpływu (IF) prac w roku ich opublikowania wynosi: 22,678, a suma punktów według wykazu czasopism MNiSW: 480. Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie, stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Publikacje te są wieloautorskie, co wskazuje na bardzo dobrą i efektywną współpracę wszystkich osób zaangażowanych w badania, w tym samego Doktoranta. Doktorant jest pierwszym autorem tylko w czwartej publikacji i nie pełni funkcji autora korespondencyjnego w wyżej wymienionych publikacjach. Z życiorysu Doktoranta wynika, że aktywnie starał się o finansowanie badań, był uczestnikiem licznych staży naukowych (w tym zagranicznych). Wykazał się aktywnością dydaktyczną i organizacyjną, brał też czynny udział w konferencjach naukowych. W sumie, Doktorant może poszczycić się 10 publikacjami w swoim dorobku naukowym.

Rozprawa doktorska mgr Jędrzeja Dobrogojskiego liczy 157 stron i zawiera spis treści, spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, hipotezy i cele badań, omówienie uzyskanych wyników, podsumowanie i wnioski, a także spis cytowań. Ponadto do pracy zostały dołączone kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów dotyczących udziału w tych badaniach. Zgodnie z opinią promotora, Pani prof. UPP dr hab. Małgorzata Piotrowska-Borek poświadczyła, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki formalne określone w aktualnie obowiązujących aktach prawnych, stąd została dopuszczona do dalszego postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Podobne oświadczenie złożyła Pani kierownik Studiów Doktoranckich, prof. UPP dr hab. Monika Jakubus.

Komentarz naukowy w języku polskim (5 stron) nie został uzupełniony o schematy, co zdecydowanie wzbogaciłoby treść. Zwłaszcza, że jest to praca, w której Doktorant wymienia zarówno metabolity jak i krótko charakteryzuje szlak metaboliczny. Zważywszy, że pierwsza, z wyżej wymienionych prac, zawiera interesujące schematy, wybrane z nich mogłyby być (po np. pewnej, autorskiej modyfikacji) uwzględnione w tej części dysertacji.



Treść wprowadzenia naukowego, wskazuje na bardzo dobrą wiedzę teoretyczną Doktoranta, który skorzystał z 67 pozycji literaturowych. Chciałabym zaznaczyć, że 15 cytowanych publikacji to dorobek naukowy macierzystej grupy badawczej Doktoranta. Doktorant prawidłowo przedstawił hipotezy i cele badań, w tym cele szczegółowe. Również omówienie uzyskanych wyników zostało napisane w sposób klarowny, z odniesieniem do konkretnych wykresów w odpowiednich publikacjach. Z oświadczenia Doktoranta wynika, że techniki badawcze stosowane w celu realizacji celów badań obejmowały: analizę poziomu transkryptów (RT-qPCR) i analizę zawartości *trans*-resweratrolu i *trans*-piceidu (HPLC), ocenę żywotności komórek, określenie stopnia rozwarcia aparatów szparkowych oraz lokalizację *in situ* wybranych ROS (barwienia z wykorzystaniem NBT i DAB). Zaangażowanie Doktoranta w analizę statystyczną dotyczyło tylko 4 publikacji (zgodnie z oświadczeniami).

Mam wątpliwość co do stwierdzenia zawartego w tekście: „Dinukleotydy cytydynamowe indukowały szlak syntezy lignin,...” (str. 19.), „Stwierdzenie to poprzedza „Uzyskane wyniki”, co w tym przypadku dokładnie Doktorant miał na myśli (który wynik?) i czy to są wyniki autorskie? Co do wkładu Doktoranta w oznaczenie zawartości lignin nie ma żadnej deklaracji Pana mgr Jędrzeja Dobrogojskiego. Nie ma też wzmianki o zaplanowaniu (zleceniu?) tych badań.

W części Podsumowanie i wnioski mgr Jędrzej Dobrogojski stwierdził, że zrealizował cele badań, w tym:

1. Potwierdził, że egzogenne Np_nN' regulują szlak fenylopropanoidowy w zawiesinowej kulturze komórkowej *V. vinifera* cv. Monastrell zależnie od typu nukleotydu.
2. Potwierdził, że NH_2-pN regulują szlak fenylopropanoidowy zawiesinowej kultury komórkowej *V. vinifera* cv. Monastrell zależnie od typu nukleozydu.

W tym punkcie mam tylko wątpliwości co do podpunktów dotyczących BenPut i lignin. Nie ma informacji o zaangażowaniu Doktoranta w analizę tych związków.

3. Wykazał, że błonowa, receptorowa kinaza białkowa LecRK-I.9 (P2K1/DORN1) jest kluczowym elementem w percepcji i transdukcji sygnału wywołanego przez Ap_4A .

Wskazanie roślinnego purynoreceptora P2K1/DORN1 jako białka błonowego, uczestniczącego w percepcji sygnału wywołanego przez Ap_4A było szczególnym (unikatowym) osiągnięciem niniejszej pracy.

Artykuł 1.:

Opublikowany artykuł stanowi przegląd literatury dotyczący zewnątrzkomórkowego ATP



(eATP) i nietypowych nukleotydów. W publikacji zamieszczone są bardzo interesujące schematy i tabele. Publikacja ta wskazuje na bardzo dobrą znajomość tematu Doktoranta, a jego udział (zgodnie z oświadczeniem w publikacji) jest znaczący (co nie do końca wynika z oświadczeń Doktoranta i współautorów umieszczonych w złożonej do recenzji pracy).

Artykuł 2.:

Praca o charakterze eksperymentalnym, której wyniki opublikowano w bardzo dobrym czasopiśmie. Również i w tej pracy znajduje się uproszczony schemat, który ułatwia czytelnikowi śledzenie opisu szlaku biochemicznego. Z deklaracji Doktoranta wynika, że jego wkład w pracę dotyczył głównie udziału w części eksperymentów. W części opisującej metodykę brakuje informacji o standardzie wewnętrznym w analizie HPLC. Czy taki wzorzec był stosowany, jeśli tak to jaki? Ponadto w przypadku analizy poziomu transkryptów, czy zastosowano tylko jeden gen referencyjny? Na jakiej podstawie wytypowano ten gen? Czy inne geny (potencjalnie) referencyjne były sprawdzone?

Artykuł 3.:

Publikacja o charakterze eksperymentalnym. Udział Doktoranta w tej publikacji był mniejszy, ale wystarczający do realizacji celów pracy doktorskiej. Również i w tej publikacji znajdują się czytelne schematy, w tym Fig. 10. Niższej jakości są wykresy, choć zakładam, że współautorzy mieli na to mały wpływ. Wyniki niniejszej pracy stanowią kontynuację badań opublikowanych w 2020 r. W przypadku metodyki – moje uwagi pokrywają się z tymi dotyczącymi Artykułu 2.

Artykuł 4.:

Publikacja o charakterze eksperymentalnym. Udział Doktoranta w tej publikacji był wiodący, największy spośród wszystkich czterech artykułów. Przedstawione wyniki w postaci wykresów są zdecydowanie bardziej czytelne, a zaproponowany model (Fig. 6.), dotyczący działania Ap_4A jest bardzo dobrym podsumowaniem wyników analiz.

Uwagi/pytania szczegółowe:

Doktorant wspomniał o tym, że NH_2pA jest najczęściej badaną cząsteczką (Str 12.). Dlaczego akurat ta cząsteczka wzbudza takie zainteresowanie (poza możliwością regulacji szlaku fenylopropanoidowego)?

Czy modyfikacja metabolizmu wtórnego w (dowolnym) materiale roślinnym poprzez nietypowe nukleotydy jest możliwa na większą skalę? Jakie potencjalne korzyści można

uzyskać stosując te nukleotydy?

Czy badano wpływ wyższego niż 5 μ M stężenia nukleotydów purynowych na aktywność szlaku fenylopropanoidowego?

Jaka jest różnica pomiędzy poziomem biochemicznym a molekularnym (Str 18.)?

Jakie znaczenie na poziomie biochemicznym (a może i fizjologicznym) mają zmiany stężenia BenPut?

Czy Doktorant mógłby zaproponować z czego wynikają różnice w zawartości anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru w badanym materiale poddanym działaniu nukleotydów poza ewentualną zmianą aktywności Rboh?

Ocena poprawności redakcyjnej i uwagi szczegółowe

Praca napisana językiem poprawnym, choć z pewnymi, nielicznymi błędami edytorskimi, w tym gramatycznymi lub nieścisłościami językowymi (np. strona 12, 14), które nie umniejszają wartości niniejszej pracy. Nagminnie używanym słowem przez Doktoranta, dotyczącym zawartości konkretnego metabolitu jest „poziom” (ang. „level”), a w zasadzie, zdecydowanie bardziej odpowiednim jest słowo „stężenie” (zawartość danego składnika w jednostce objętości lub masy). Raz nawet to słowo pojawiło się w tekście (str. 14). W części Wprowadzenie Doktorant mógłby zastosować konsekwentnie polskie nazwy rodzajowe i epitety gatunkowe wymienianych roślin i poprawnie zapisywać nazwy łacińskie. Mam wrażenie braku konsekwencji i mieszania w nazewnictwie wymienianych gatunków roślin. Również i ta uwaga nie ma wpływu na merytoryczną wartość tej pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Jędrzeja Dobrogojskiego oraz stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 187 ust. 3 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020, poz. 85 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Jędrzeja Dobrogojskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa dn. 27. 05. 2024 r.

Urszula Krasuska

