

Recenzja pracy doktorskiej mgr Eweliny Stolarskiej pt.:
”Identyfikacja i charakterystyka genów warunkujących komórkową homeostazę
poliamin w starzeniu liści jęczmienia”

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Stolarskiej została wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej UAM w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sobieszczuk-Nowickiej (promotor), oraz dr. Umesha Kumara Tanwara (promotor pomocniczy). Badania, których wyniki stanowią prezentowane w dysertacji osiągnięcie naukowe wykonane zostały w ramach projektu Opus pt.:”Poliaminy – nowy przełącznik metaboliczny starzenia liścia jęczmienia. Opracowanie molekularnej podstawy sieciowej regulacji procesu jako cel strategii uprawy zbóż” (UMO-2018/29/B/NZ9/00734) finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki.

Uzasadnienie wyboru tematyki badawczej

Starzenie roślin jest procesem aktywnym i wysoce kontrolowanym, uznawanym za rodzaj strategii obronnej przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Jest ono związane ze zmianami metabolicznymi, prowadzącymi do dezintegracji struktur komórkowych i remobilizacji cennych zasobów, w tym azotu. Indukowane ciemnością starzenie liści (ang. dark-induced leaf senescence - DILS) to zagadnienie podejmowane od wielu lat przez zespół kierowany przez profesor Ewę Sobieszczuk-Nowicką i na którego polu ma on duże osiągnięcia. Na podstawie wcześniejszych badań wysunięto hipotezę, iż utrzymywanie homeostazy poliamin (PA) ma bardzo istotne znaczenie w kontroli procesu indukowanego starzenia liści i przypuszczalnie jest związane z odwracalnością tego procesu. Homeostaza PA w komórce utrzymywana jest na zasadzie sprzężeń zwrotnych na poziomie biosyntezy, katabolizmu, importu i eksportu. Uważa się, iż rozkład poliamin indukuje proces starzenia liści.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej mgr Ewy Stolarskiej miały na celu identyfikację genów metabolizmu (ang. polyamine metabolism genes – *PMG*) oraz transportu (ang. polyamine transporters – *PAT*) poliamin oraz ich przewidywanych produktów białkowych u jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*). Był to etap niezbędny do podjęcia przez Doktorantkę analiz funkcjonalnych prowadzących do zbadania roli genów cyklu poliaminowego w indukowanym ciemnością starzeniu liści.

Podjętą przez Doktorantkę tematykę badawczą uważam za oryginalną oraz istotną, zarówno ze względu na aspekt poznawczy, jak również aplikacyjny. Wybór jęczmienia zwyczajnego jako obiektu badań był trafny i uzasadniony. Szczególne znaczenie miała tu dostępność sekwencji genomowej odmiany Golden Promise, co umożliwiło prowadzenie badań zarówno filogenetycznych, jak i funkcjonalnych. Ponadto, ze względu, iż jest to gatunek diploidalny oraz posiada stosunkowo mały genom uważany jest za roślinę modelową w obrębie traw, włączając w to zboża. Istotne jest również znaczenie jęczmienia zwyczajnego w żywieniu światowej populacji ludzkiej.

Struktura pracy

Pracę doktorską mgr Eweliny Stolarskiej stanowi cykl trzech spójnych tematycznie anglojęzycznych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2022-2023, w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR):

1. Tanwar UK, **Stolarska E**, Paluch-Lubawa E, Mattoo AK, Arasimowicz-Jelonek M, Sobieszczuk-Nowicka E. (2022). Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221:585-603. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006.
2. **Stolarska E**, Tanwar UK, Guan Y, Grabsztunowicz M, Arasimowicz-Jelonek M, Phanstiel O IV, Sobieszczuk-Nowicka E. (2023). Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence. *Frontiers in Plant Sciences*, 14:1194737. doi: 10.3389/fpls.2023.1194737.
3. **Stolarska E**, Paluch-Lubawa E, Grabsztunowicz M, Tanwar UK, Arasimowicz-Jelonek M, Phanstiel O, Mattoo AK, Sobieszczuk-Nowicka E. (2023). Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. Doi:10.1080/07352689.2023.2247886.

Pierwsze dwa to artykuły oryginalne, a trzeci to praca przeglądowa dotycząca roli poliamin jako uniwersalnych bioregulatorów w regulacji żywotności komórek. Włączenie tego artykułu do pracy doktorskiej uważam za uzasadnione, gdyż stanowi on doskonale wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę. Do wydruków publikacji dołączone zostało opracowanie zawierające streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, autoreferat, oświadczenia autorki, oświadczenia współautorów, sylwetka kandydatki oraz wykaz pozostałych osiągnięć naukowych.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania (ang. impact factor – IF), zgodnie z rokiem opublikowania tychże prac wynosi 20,525 a liczba punktów MNiSW – 340 i świadczy o wysokim poziomie naukowym prezentowanych badań. W publikacjach nr 2 i 3 mgr Ewelina Stolarska jest pierwszym autorem, natomiast w publikacji nr 1 posiada autorstwo współdzielone.

Na podstawie analizy oświadczeń Doktorantki oraz współautorów stwierdzam, iż jej indywidualny wkład w powstanie wyżej wymienionych prac był znaczący i tym samym został spełniony wymóg formalny stawiany rozprawom doktorskim. Jednakże, w moim odczuciu opisy w oświadczeniach dotyczących publikacji nr 1 i 2 były zbyt ogólne, co znacząco utrudniło mi ich ocenę. Doktorantka podała, iż w obu publikacjach wykonała część analizy bioinformatycznej, dokonała interpretacji części uzyskanych wyników oraz brała udział w przygotowaniu manuskryptów. Ponadto, w oświadczeniu dotyczącym publikacji nr 1 mgr Ewelina Stolarska napisała, że wykonała pracę eksperymentalną. Z oświadczeń współautorów wynika, że w przypadku obu prac oryginalnych udział w analizie bioinformatycznej miał również dr Umesh Kumar Tanwar. Z tego względu bardzo proszę o podanie które konkretnie analizy bioinformatyczne zostały przez Doktorantkę wykonane.

Autoreferat zawiera następujące rozdziały: wprowadzenie, cel i założenia pracy doktorskiej, wyniki i ich omówienie, podsumowanie, perspektywy oraz literatura. Jest on napisany w sposób logiczny i zwięzły i nie budzi moich zastrzeżeń. Ponadto, Doktorantka umieściła w nim wiele kolorowych rycin i schematów, które zostały bardzo dobrze przygotowane i tym samym ułatwiły zrozumienie treści. Doktorantka przytacza cele, najważniejsze wyniki i wnioski, jak również szczegółowe plany dalszych badań, co świadczy o jej dojrzałości naukowej. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niekompletność wykazu stosowanych skrótów (brakuje takich skrótów jak TFs, BC, TC, RT-qPCR), oraz nieliczne błędy dotyczące stosowanej nomenklatury.

Podsumowując stwierdzam, iż całość dysertacji została dobrze przygotowana, w sposób zgodny z wymogami formalnymi stawianymi pracom doktorskim.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Cele pracy doktorskiej mgr Eweliny Stolarskiej zostały sformułowane w trzech punktach i obejmowały:

1. Identyfikację i analizę genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych zaangażowanych w metabolizm (geny *PMG* – ang. polyamine metabolism genes) i transport poliamin (geny *PAT* – ang. polyamine transporters).
2. Charakterystykę funkcjonalną zidentyfikowanych genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych na podstawie analiz *in silico*.
3. Ocenę ekspresji badanych genów w przemianach metabolicznych towarzyszących starzeniu liści.

Doktorantka postawiła również hipotezę, iż w obrębie rodzin genów zaangażowanych w homeostazę poliamin można znaleźć takie, których ekspresja zachodzi w liściu i jest starzeniowo-zależna. Była ona punktem wyjścia do analiz wybranych genów w celu zbadania ich funkcji w procesie starzenia.

Należy podkreślić, iż przeprowadzone doświadczenia zostały zaplanowane w sposób bardzo przemyślany i logiczny. Doktorantka rozpoczęła badania od identyfikacji całej rodziny genów cyklu aminowego w genomie jęczmienia, a następnie wyodrębniła geny ulegające specyficznej ekspresji w liściu. W kolejnym kroku na podstawie profilowania ekspresji podjęła próbę zidentyfikowania tych genów szlaku poliamin, których potencjalna funkcja była związana z procesem indukowanego ciemnością starzenia liści (DILS).

Identyfikacja genów *HvPMG* i *HvPAT* u jęczmienia została przeprowadzona z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i sekwencji aminokwasowych poszukiwanych genów scharakteryzowanych wcześniej u rzodkiewnika i ryżu. Zidentyfikowano łącznie 36 genów cyklu poliaminowego, w tym 23 geny metabolizmu oraz 13 genów transporterów poliamin. Geny *PMG* zostały sklasyfikowane w 7 rodzinach, a wśród genów *PAT* wyodrębniiono 7 importerów oraz 6 eksporterów. 13 genów *PMG* ulegało specyficznej ekspresji w liściu. Dodatkowo, sekwencje genów *HvPMG* zostały zamplifikowane przy użyciu specyficznych

starterów na matrycy DNA i poddane sekwencjonowaniu. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie dlaczego identyczna analiza nie została przeprowadzona dla genów *HvPAT*.

Przeprowadzona została również kompleksowa analiza *in silico* dotycząca funkcji produktów białkowych genów szlaku poliamin, polegająca na określeniu lokalizacji subkomórkowej, analizie oddziaływań białko-białko, przewidywaniu miejsc modyfikacji potranslacyjnych oraz określeniu możliwości wiązania białek z ligandami poliamin.

Na podstawie analizy profili ekspresji genów szlaku poliamin mgr Ewelina Stolarska wysunęła wnioski dotyczące potencjalnych korelacji ekspresji genów metabolizmu i transportu poliamin z procesem indukowanego ciemnością starzenia liści. Między innymi taki, iż import poliamin nie jest istotny, podczas gdy geny eksporterów poliamin biorą udział w tym procesie. Uważam, że niektóre z nich są za daleko idące i do tej części wyników mam słowo komentarza. W moim odczuciu, wskazane byłoby zbadanie poziomu poliamin w liściach poddanych DILS w poszczególnych punktach czasowych, jak również analiza parametrów fizjologicznych wskazujących na zmiany w procesach metabolicznych towarzyszące temu procesowi. Istotne byłoby określenie poziomu ROS, H₂O₂ czy aktywności systemu antyoksydacyjnego. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie jakie były symptomy starzenia liści i czy obserwowano różnice pomiędzy punktami czasowymi eksperymentu oraz czy można określić funkcję nadtlenu wodoru w indukowanym ciemnością starzeniu liści? Proszę również o komentarz do wykorzystania dwóch odrębnych podejść eksperymentalnych, tj. RT-qPCR (*PMG*) oraz RNAseq (*PAT*) do analizy ekspresji genów *PMG* i *PAT*. Moim zdaniem zastosowanie tej samej metody badawczej ułatwiłoby porównywanie uzyskanych wyników i ich interpretację.

W podsumowaniu mgr Ewelina Stolarska przytacza, że gen dekarboksylazy ornityny ulegał ekspresji wyłącznie w korzeniu jęczmienia. A zatem nasuwa się pytanie czy poliaminy mogą pełnić funkcję podczas starzenia w innych organach.

Jako ostatni punkt autoreferatu Doktoranta przedstawiła perspektywy dalszych badań wspominając o modyfikacjach genetycznych. Interesuje mnie ekspresję, którego z genów metabolizmu bądź transportu poliamin chciałaby Pani zmodyfikować u jęczmienia w pierwszej kolejności i dlaczego? Z punktu widzenia aplikacyjnego wykorzystania uzyskanych wyników proszę o krótkie wyjaśnienie na czym polega egzogenne zastosowanie PA w celu ulepszenia tolerancji roślin uprawnych na czynniki stresowe, głównie abiotyczne takie jak susza czy niska temperatura?

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską mgr Eweliny Stolarskiej oceniam wysoko. W mojej ocenie identyfikacja genów metabolizmu i transportu poliamin u jęczmienia zwyczajnego stanowi najważniejsze osiągnięcie recenzowanej pracy. Prezentowane wyniki są wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak również stanowią doskonały punkt wyjścia do wieloaspektowych badań funkcjonalnych. Doktorantka w sposób przemyślany wykorzystwała dostępne dane (sekwencja genomu i dane RNAseq) doskonale posługując się skomplikowanymi narzędziami bioinformatycznymi.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym i merytorycznym oceniana dysertacja mgr Eweliny Stolarskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone na podstawie art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r., poz. 478. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Eweliny Stolarskiej w dziedzinie nauk biologicznych oraz Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Stolarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Izabela Pawłowicz