



# INSTYTUT DENDROLOGII

## POLSKIEJ AKADEMII NAUK

62-035 KÓRNIK, ul. Parkowa 5  
e-mail: idkornik@man.poznan.pl

tel. 61 817 00 33, fax 61 817 01 66  
www.idpan.poznan.pl

dr hab. Tomasz Pawłowski, prof. ID PAN

Kórnik, 10.09.2024

**Ocena pracy doktorskiej mgr Eweliny Stolarskiej pt. „Identyfikacja i charakterystyka genów warunkujących komórkową homeostazę poliamin w starzeniu liści jęczmienia” wykonanej w Zakładzie Fizjologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Ewy Sobieszczuk-Nowickiej (promotor) i dr. Umesha Kumara Tanwara (promotor pomocniczy)**

### Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Stolarskiej było poznanie mechanizmu powiązań metabolizmu poliamin (PA) z procesem starzenia liści jęczmienia. Podjęte badania zostały oparte na genomice funkcjonalnej i skupiły się na identyfikacji genów metabolizmu PA oraz analizie transporterów PA w jęczmieniu. Podjęte badania wynikały z braku lub małej rozpoznawalności informacji dotyczących, odpowiednio, genów metabolizmu i transporterów PA w jęczmieniu. Doktorantka wyodrębniła rodziny genów warunkujących homeostazę PA w komórce (23 geny metabolizmu PA i 13 genów transporterów PA). Dodatkowo przeprowadziła szczegółową charakterystykę zidentyfikowanych genów i ich białkowych produktów, w tym interakcje białko – PA oraz organospecyficzną ekspresję. Warty podkreślenia jest przeprowadzenie badań ekspresji genów homeostazy PA na modelu starzenia liści jęczmienia indukowanego ciemnością (DILS) i wytypowanie genów do badań funkcjonalnych. Doktorantka zidentyfikowała, wyizolowała i scharakteryzowała geny jęczmienia warunkujące komórkową homeostazę PA ich ekspresję zależną od indukowanego starzenia. Wykonanie takich podstawowych badań może być punktem odniesienia kolejnych

badania nad rolą PA w regulacji rozwoju roślin i odpowiedzi na stres. Wybór tematyki pracy z powodu ich tak podstawowego podejścia uważam za bardzo interesujący i zasadny. Badania przeprowadzone w trakcie pracy doktorskiej w znaczącym stopniu wpływają na rozwój dziedziny wiedzy dotyczącej regulacji procesu starzenia. Z tych względów tematykę rozprawy mgr Eweliny Stolarskiej uważam za bardzo aktualną i ważną naukowo.

Strona formalna układu rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa została przygotowana na podstawie trzech artykułów naukowych opublikowanych w *International Journal of Biological Macromolecules*, *Frontiers in Plant Science* and *Critical Review in Plant Science*. Są to czasopisma o ustalonej renomie, publikujące recenzowane prace opisujące wartościowe wyniki naukowe. Mgr Ewelina Stolarska jest pierwszym autorem wszystkich artykułów wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, w jednej współdzieli pierwsze miejsce z innym współautorem. Z dołączonych do pracy oświadczeń współautorów wynika, że miała znaczący udział nie tylko w wykonaniu opisanych w dwu artykułach doświadczeń i analiz bioinformatycznych, ale również w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów do druku. Trzecia praca ma charakter pracy przeglądowej i została wykonana na zaproszenie. Udział w tej pracy dotyczył zaangażowania w układ publikacji i jej napisaniu. Opublikowane prace stanowiące najważniejszą część rozprawy są spójne tematycznie i w pełni odpowiadają jej tytułowi. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy metod bioinformatyki i biologii molekularnej.

Do artykułów naukowych wchodzących w skład ocenianej rozprawy mgr Ewelina Stolarska dołączyła rozdziały napisane po polsku opisujące cały zakres wykonanych badań: Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, Streszczenie, Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Autoreferat (Wprowadzenie, Cel i założenia pracy doktorskiej, Wyniki i ich omówienie, Podsumowanie, Perspektywy, Literatura). Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, Oświadczenia autorki, Oświadczenia współautorów, Sylwetka kandydatki i Wykaz pozostałych osiągnięć naukowych stanowią załączniki pracy.

W Autoreferacie w rozdziale Wprowadzenie, Doktorantka omówiła aktualny stan wiedzy na temat roli jęczmienia w gospodarce, rolnictwie i nauce. Podkreśliła rolę jęczmienia jako modelu do badań zbóż. Mgr Ewelina Stolarska następnie omówiła mechanizm starzenia

się roślin jako proces umożliwiający przetrwanie roślin, wprowadzając do tematu pracy doktorskiej. Opisała mechanizm, nie do końca rozpoznanego jeszcze, częściowo odwracalnego procesu, indukowanego ciemnością starzenia się liści. Następnie opisała wpływ homeostazy poliamin na prawidłowe funkcjonowanie komórki, szczególnie w obliczu narażenia roślin na stres oraz omówiła cykl poliaminowy, biosyntezę PA i katabolizm PA. Opisała wkład zespołu prof. Ewy Sobieszczuk-Nowickiej w opracowaniu modelu działania PA w programie starzenia liści. Pozytywny wpływ zwiększonej ilości PA na opóźnienie starzenia liści może też pozytywnie wpływać na poprawę efektywności plonowania. Na końcu Wprowadzenia Doktorantka podkreśliła ważność badań powiązań metabolizmu poliamin z procesem starzenia jako ważnym zagadnieniem agronomicznym. Doktorantka w sposób zwięzły i logiczny przedstawiła ogólny zarys i tło badanego zagadnienia wyjaśniając podstawę podjętych badań.

Po tym interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr Ewelina Stolarska przedstawiła cel badań. Była nim kompleksowa identyfikacja genów zaangażowanych w homeostazę PA w genomie jęczmienia oraz wstępna ocena ich udziału w przemianach metabolicznych towarzyszących procesom starzenia liści. Zaplanowano trzy zadania badawcze: 1) identyfikacja i analiza genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych zaangażowanych w metabolizm i transport poliamin na podstawie badań homologii i filogenetycznych, 2) charakterystyka funkcjonalna zidentyfikowanych genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych na podstawie analiz *in silico*, 3) ocena ekspresji badanych genów w przemianach metabolicznych towarzyszących starzeniu się liści. Poszczególne zadania badawcze zostały opisane jasno i zwięźle, w sposób czytelny i logiczny wprowadzając do przeprowadzonych eksperymentów obejmujących temat pracy. Na końcu postawiła hipotezę, że w obrębie rodzin genów zaangażowanych w homeostazę PA są geny, których ekspresja jest organospecyficzna (liść) i starzeniowo-zależna. Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w szeroki zakres badań fizjologiczno-molekularnych nad regulacją odporności roślin na stres abiotyczny.

W pracy mgr Ewelina Stolarska opisała także szczegółowe wyniki badań i ich omówienie. Opisała proces identyfikacji jęczmiennych genów metabolizmu PA i genów transportu PA przy wykorzystaniu sekwencji homologicznych i baz danych. W wyniku tych analiz uzyskała wyniki w postaci 36 genów metabolizmu PA (HvPMG), siedem genów importerów i sześć genów eksporterów PA (HvPAT). Wyniki te potwierdziła też w pracy

laboratoryjnej za pomocą sekwencjonowania. Przeprowadziła również analizę filogenetyczną tych białek. Dokonała także charakterystyki funkcjonalnej zidentyfikowanych genów, lokalizacji w genomie, budowy strukturalnej, obecności elementów regulacyjnych i miejsca wiązania miRNA. Przeanalizowała także *in silico* poziom ekspresji genów metabolizmu i transporterów PA jęczmienia i stwierdziła, że poziom ekspresji zmienia się w określonych etapach rozwoju jęczmienia, w wybranych organach lub w odpowiedzi na konkretny stres. Wykonała kompleksową analizę *in silico* przewidywanych produktów białkowych zidentyfikowanych genów, interakcje białko-białko oraz miejsca modyfikacji potranslacyjnych. W celu potwierdzenia możliwości wiązania białek z ligandami PA użyła metody identyfikacji dokowania molekularnego. Wyniki otrzymane z analiz *in silico* dotyczące ekspresji genów potwierdziła laboratoryjnie metodą RT-qPCR w czasie rozwoju siewek oraz na modelu starzejących się liści jęczmienia metodą RNA-seq dla transporterów PA. Osiągnięciem pracy jest scharakteryzowanie trzech genów biosyntezy PA, które mogą być istotne w regulacji procesu starzenia liści jęczmienia (*HvSPDS1*, *HvSPMS1* i *HvSAMDC2*). Zbadała też, że import PA jest nieistotny dla procesu starzenia, oraz cykl poliaminowy może być istotny w remobilizacji azotu i węgla leżącej u podstawy biologii starzenia liści. Porównanie profili ekspresji genów metabolizmu i transportu PA w starzeniu rozwojowym i w indukowanym ciemnością starzeniu liści pokazało odmienny profil tego ostatniego. Wskazuje to na odmienny charakter DILS od procesu starzenia rozwojowego, oraz że cykl PA może pełnić funkcję przełącznika molekularnego pomiędzy zdolnością komórek do przeżycia a ich śmiercią.

Omówienie artykułów kończy rozdział Podsumowanie, w którym mgr Ewelina Stolarska przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Podkreśliła rolę otrzymanych wyników jako punktu odniesienia badań funkcjonalnych wielu zespołów naukowców wyjaśniających mechanizmy molekularnej kontroli przez PA procesów rozwojowych zbóż i ich reakcji na czynniki środowiska. Wskazuje też na potencjał aplikacyjny tych badań tzn. zastosowanie egzogennych PA do podwyższenia produktywności roślin. Podkreśliła, że badania przyczyniają się też do poszerzenia wiedzy na temat śmierci komórki, w tym komórek nowotworowych. Tą część pracy zakończyła opisaniem perspektyw kolejnych badań dotyczących roli PA w indukowanym starzeniu, w oparciu o rośliny ze zmodyfikowanym metabolizmem PA. Chciałbym zwrócić uwagę, że przedstawione w pracy wyniki zostały w zwięzły i czytelny sposób omówione i podsumowane, również w postaci graficznej.

Szczególnym osiągnięciem pracy jest wykazanie sposobu działania PA w indukowanym starzeniu. Po zapoznaniu się z wynikami mogę stwierdzić, że Doktorantka bardzo sprawnie poradziła sobie z realizacją wyznaczonego wcześniej celu pracy oraz zweryfikowała pozytywnie postawioną hipotezę.

Do części poprzedzającej artykuły naukowe dodano także najnowszą dobrze dobraną literaturę naukową, na podstawie której Doktorantka przygotowała omówienie wyników zawartych w opublikowanych pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa przygotowana przez mgr Ewelinę Stolarską spełnia formalnie wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia, w których Doktorantka i współautorzy artykułów naukowych dokładnie opisują swój udział w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wkład Doktorantki w przygotowaniu prac do druku był znaczący i w pełni uzasadnione jest, aby mgr Ewelina Stolarska doktoryzowała się na podstawie tych artykułów. Wszystkie opublikowane prace ukazały się w znanych czasopismach, których redakcje akceptują prace na podstawie recenzji przygotowanych przez pracujących w podobnym temacie naukowców. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

W pracy znalazłem stosunkowo niewiele niedociągnięć, jakieś drobne potknięcia stylistyczne i językowe np. użycie zwrotu „nalewanie ziarna”.

Recenzja pracy nasunęła mi też parę pytań. Czy wyniki badań laboratoryjnych ekspresji genów metabolizmu i transporterów PA były zawsze zgodne z analizami bioinformatycznymi? Czy były obserwowane jakieś różnice? Jeśli tak, to czym je wytłumaczyć? Jaki wpływ może mieć scharakteryzowanie genów zależności PA – starzenie na perspektywy kolejnych badań, np. w aspekcie programowanej śmierci komórki? Jaki praktyczny aspekt badań może być obecnie już wykorzystany?

### **Ocena merytoryczna**

1. Tanwar U.K., Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Mattoo A.K., 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.

Pierwsza praca, która wchodzi w skład ocenianej rozprawy doktorskiej opisuje wyniki badań nad genami szlaku metabolicznego poliamin jęczmienia. Mgr Ewelina Stolarska wykorzystała w tej pracy narzędzia bioinformatyki i genomiki funkcjonalnej do identyfikacji, kompleksowej charakterystyki, ewolucji, rozwoju i wpływu stresu na ekspresję genów szlaku metabolicznego poliamin (*PMG*). Osiągnięciem pracy jest zidentyfikowanie i scharakteryzowanie trzech dekarboksylaz S-adenozylometioniny (*HvSAMDC*), dwóch dekarboksylazy ornityny (*HvODC*), dekarboksylazy argininy (*HvADC*), syntazy spermidyny (*HvSPDS*), dwóch syntaz sperminy (*HvSPMS*), pięć oksydaz aminowych zawierającej miedź (*HvCuAO*) i siedem oksydaz poliaminowych (*HvPAO*). Stwierdziła także, że geny *HvPMG* są rozmieszczone na wszystkich chromosomach jęczmienia. Ocena filogenetyczna i porównawcza wykazała, że szlak metaboliczny PA jest wysoce konserwatywny u roślin. Określiła także dziewięć miejsc docelowych miRNA (*hvu-miR*), 18 interakcji białko-białko i 961 domniemanych elementów regulatorowych w regionie promotora. Wykazała także, że ekspresja genów *HvSAMDC3*, *HvCuAO7*, *HvPAO4* i *HvSPMS1* była widoczna na każdym etapie rozwoju. Osiągnięciem pracy jest zbadanie, że rodzina genów *SPDS/SPMS* jest najbardziej wrażliwa na indukowane starzenie się liści. Badania to stanowią punkt odniesienia dla funkcjonalnego badania mechanizmów molekularnych, które regulują metabolizm poliamin w roślinach jako narzędzie dla przyszłych systemów zarządzania decyzjami hodowlanymi.

2. Stolarska E., Tanwar U.K., 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 Science* 14: 1194737.

W drugiej pracy mgr Ewelina Stolarska skupiła się nad potencjalnym wykorzystaniem poliamin w zwiększeniu wydajności remobilizacji azotu. Osiągnięciem tej pracy jest identyfikacja i charakterystyka transporterów PA jęczmienia. Zidentyfikowała siedem genów z rodziny *PUT* (*HvPUT1-7*) i sześć genów z rodziny *BAT* (*HvBAT1-6*) jako transportery

PA u jęczmienia oraz przedstawiła szczegółową charakterystykę tych genów oraz białek. Dzięki modelowaniu homologicznym badanych transporterów PA określiła ich strukturę trójwymiarową. Dodatkowo, badając dokowanie molekularnego pokazała miejsca wiążące PA, co przyczyniło się do lepszego zrozumienia mechanizmów i interakcji zaangażowanych w transport PA białek HvPUT/HvBAT. Doktorantka określiła również właściwości fizykochemiczne i omówiła funkcję transporterów PA w rozwoju jęczmienia oraz sposób, w jaki pomagają one jęczmieniowi reagować na stres, ze szczególnym uwzględnieniem starzenia się liści. Uzyskane tutaj spostrzeżenia mogą prowadzić do poprawy produkcji jęczmienia poprzez modulację homeostazy poliamin.

3. Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Kumar Tanwar U., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O. IV, Mattoo A.K., Sobieszczuk-Nowicka E. 2023. Polyamines as universal bioregulators across kingdoms and their role in cellular longevity and death. *Critical Reviews in Plant Sciences* 42, 364–384.

W trzeciej pracy mgr Ewelina Stolarska opisała rolę poliamin jako ważnych związków decydujących o długowieczności lub śmierci komórek. Praca ta stanowi ciekawy przegląd literatury dotyczący regulacji metabolizmu PA i jego wpływu na homeostazę komórek. Opisała badania wskazujące, że zwiększony poziom enzymów syntezy PA jest związany z proliferacją komórek, podczas gdy aktywacja szlaku katabolicznego PA zwiększa stres oksydacyjny i prowadzi do starzenia się. Wewnątrzkomórkowy poziom PA jest regulowany na poziomie transkrypcji i translacji genów metabolizmu PA. Działające cis elementy regulacyjne i czynniki transkrypcyjne określają ekspresję genu zależną od tkanki, etapu rozwoju i stresu. Zbadano, że poziom translacji jest regulowany przez miRNA. Wnioskiem z pracy jest stwierdzenie, że PA i ich enzymy metaboliczne odgrywają ważną rolę w fizjologii roślin i zwierząt także poprzez wpływ na kondensację chromatyny, acetylację i deacetylację histonów, transmetylację i interakcje białko-białko.

Wartym podkreślenia w tych pracach jest zastosowanie szeregu analiz bioinformatycznych i molekularnych z wykorzystaniem nowoczesnych metod modelowania, qPCR i RNAseq.

Artykuły są dobrze napisane, wiele aspektów gruntownie zostało przedyskutowanych, w końcowym etapie postawione zostały właściwe wnioski oraz perspektywy dalszych badań.

### **Wnioski końcowe**

Podsumowując, wymienione wyżej uchybienia nie wpływają w istotny sposób na ocenę pracy. Stanowi ona ważny wkład w poznanie mechanizmów kontrolujących starzenie roślin. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że mgr Ewelina Stolarska jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zawiera oczywisty element nowości naukowej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, art. 187 ust. 1-2 Ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Stolarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Tomasz Pawłowski