



Poznań, 19 lipca 2021r.

1

Opinia na temat wniosku o nadanie dr Beatrycze Nowickiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Przebieg studiów i kariery zawodowej

Dr Beatrycze Nowicka w 2007r. ukończyła studia na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego - uzyskała tytuł zawodowy magistra biologii obroniwszy wykonaną pod kierunkiem Prof. dr hab. Kazimierza Strzałki pracę maderską „Wpływ aktywności epoksydazy zeaksantyny na skład barwników karotenoidowych, cykl ksantofilowy i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego w czterech liniach *Arabidopsis thaliana*”. W latach 2007 - 2013 pozostawała związana z macierzystym Wydziałem w formie udziału (umowy o dzieło) w projektach badawczych wykonywanych w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin. W przedziale 2013-2016 pracowała w charakterze asystenta naukowego w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin - początkowo w ramach współfinansowanego przez EU stażu podoktorskiego w projekcie SET (Społeczeństwo-Technologia - Środowisko), później zaś w ramach projektu „Udział antyutleniaczy z grupy lipidów prenylowych w odpowiedzi zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* na stres wywołany metalami ciężkimi oraz w oddziaływaniach allelopatycznych”. W okresie zatrudnienia na etacie asystenta naukowego wykonała i obroniła pracę doktorską na temat „Badania funkcji antyoksydacyjnych oraz szlaków biosyntezy chinonów prenylowych u roślin” (promotor: Prof. dr hab. Jerzy Kruk). W marcu 2017r. została zatrudniona w charakterze adiunkta w wymiarze pełnego etatu naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin i w tej jednostce pozostaje zatrudniona do dziś.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań

NIP 777 00 06 350, REGON 000001293

<http://www.staff.amu.edu.pl/~ibedyr/ZFR>



Ocena wskazanego przez Kandydatkę osiągnięcia naukowego wynikającego z Art. 291 Ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce „Jednokomórkowa zieleńca *Chlamydomonas reinhardtii* jako modelowy organizm fotosyntetyczny do badań nad odpowiedzią na toksyczne stężenia jonów metali ciężkich oraz związki allelopatyczne. Badania nad rolą mechanizmów ochronnych ze szczególnym uwzględnieniem antyoksydantów należących do prenylolipidów” w formie pięciu artykułów powiązanych tematycznie.

Habilitantka definiuje jako cel nadrzędny wspomnianych publikacji

- 1) poznanie roli szerokiego spektrum lipidowych antyutleniaczy w odpowiedzi jednokomórkowej zieleńcy *Chlamydomonas reinhardtii* na krótko- (Nowicka i wsp. 2016a) i długoterminowy (Nowicka i wsp. 2016b) stres wywołany obecnością w pożywce pięciu metali ciężkich - Cu, Cr (tzw. metale redoks-aktywne) oraz Cd, Hg i Pb (tzw. metale redoks-nieaktywne)
- 2) zbadanie odpowiedzi *C. reinhardtii* na długoterminowy stres wywołany przez Cr i Cd w warunkach zahamowania syntezy dwóch lipidowych antyutleniaczy: α - tokoferolu oraz plastochinonu przez pirozalon (inhibitor dioksygenazy kwasu p-hydrokysfenylopirogronowego, enzymu uczestniczącego w syntezie kwasu homogentyzynowego - prekursora obydwu wspomnianych antyutleniaczy) (Nowicka i wsp., 2020)
- 3) zbadanie udziału lipidowych antyutleniaczy w odpowiedzi *C. reinhardtii* na juglon - jeden z najszerzej badanych związków allelopatycznych, produkowany w naturze przez różne organy, w tym korzenie, roślin z rodzaju orzech (*Juglans* sp.) (Nowicka i wsp., 2017)
- 4) omówienie praktycznych aspektów pomiarów parametru NPQ u *C. reinhardtii* z wykorzystaniem fluorymetrii PAM (Nowicka, 2019)

Publikacje Nowicka i wsp., (2016a,b), Nowicka i wsp., (2020) oraz Nowicka i wsp., (2017) zawierają wyniki uzyskane z wykorzystaniem następujących podejść metodycznych: oznaczanie w ekstrakcie z komórek *C. reinhardtii* (za pomocą HPLC) poziomu antyutleniaczy: α -tokoferolu, γ -tokoferolu, platochromanolu-8, plastochinonu (PQ), plastochinolu (POH_2), PQ_{tot} (= PQ + POH_2) oraz produktów

3

utleniania tych antyutleniaczy przez $^1\text{O}_2$ (pomiar fluorymetryczny), oznaczanie poziomu hydroksynadtlenków lipidów (LOOH), oznaczanie poziomu ekspresji (za pomocą Real-Time PCR) czterech genów kodujących enzymy uczestniczące w zmiataniu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz pojedynczego genu związanego z biosyntezą α -tokoferolu, γ -tokoferolu, plastochromanolu-8 i i plastochinolu, pomiar intensywności fotosyntezy i oddychania ciemnościowego (za pomocą elektrody Clarka), parametrów fluorescencji chlorofilu *a in vivo* (fluorymetria PAM), oznaczanie aktywności enzymatycznej enzymów uczestniczących w zmiataniu ROS, oznaczanie poziomu antyutleniaczy innych niż lipidowe (np. kwasu askorbinowego), etc.

Publikacja Nowicka (2019) odbiega zasadniczo od pozostałych. Nie jest oryginalną pracą badawczą ale czymś w rodzaju notatki technicznej („technical focus” według nomenklatury obowiązującej w czasopiśmie *Physiologia Plantarum*, tzn. miejscu publikacji). Co jednak ważniejsze, publikacja ta nie wykazuje żadnego opisanego w Ustawie powiązania tematycznego z pozostałymi czterema publikacjami, bo trudno za powiązanie tematyczne uznać fakt, iż publikacja odnosi się także do *C. reinhardtii*, w sytuacji gdy nie ma żadnej innej korespondencji merytorycznej. Dlatego wyłączam publikację Nowicka (2019) z zestawu składającego się na osiągnięcie naukowe wynikające z Art. 291 Ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce i przenoszę ją do zbioru innych osiągnięć naukowych Habilitantki.

Pozbawiony publikacji Nowicka (2019) zestaw prezentuje się ilościowo raczej skromnie w porównaniu z zestawami innych Habilitantek/Habilitantów których dokonania naukowe miałem okazję oceniać. Co się zaś tyczy wartości merytorycznej tego zestawu to oceniam ją umiarkowanie pozytywnie. Wyniki zawarte w publikacji Nowicka i wsp. (2016a) pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że antyutleniacze lipidowe biorą udział w odpowiedzi komórek *C. reinhardtii* na krótkoterminową (7.5h) ekspozycję na metale redoks-aktywne i redoks-nieaktywne. Wykazano mianowicie, że w takich warunkach w sposób istotny statystycznie spada poziom α -tokoferolu, γ -tokoferolu i



plastochromanolu-8, a spadek ten - będący zdaniem Habilitantki skutkiem udziału tych antyutleniaczy w zmiataniu ROS generowanych przez jony metali - przebiegał najbardziej intensywnie w obecności jonów metali redoks-aktywnych (Cu i Cr) a także jonów Ag. Z kolei pula PQ_{tot} ulegała ewidentnemu utlenieniu, a PQ powstający w wyniku utlenienia PQH_2 był dalej degradowany. Elementem (niezbyt skutecznym jak się okazuje) strategii odpowiedzi na spadek poziomu antyutleniaczy lipidowych była stymulacja akumulacji mRNA genu (*VTE3*) genu kodującego metylotransferazę zaangażowaną w szlak biosyntezy wszystkich badanych antyutleniaczy lipidowych. Skala tej stymulacji była zbliżona do skali stymulacji ekspresji kilku genów kodujących enzymy (takich jak np. katalaza czy peroksydaza askorbinianowa) uczestniczące w zmiataniu ROS gromadzących się w wyniku działania jonów badanych metali. Odnotowano ponadto wzrost poziomu LOOH - tj. zbioru produktów peroksydacji lipidów - szczególnie wyraźny w przypadku ekspozycji na jony Ag, Cu i Hg. Zupełnie inną sytuację Habilitantka zaobserwowała w odniesieniu do komórek *C. reinhardtii* eksponowanych na jony metali w długim horyzoncie czasowym - przez 14 dni (Nowicka i wsp. 2016b). Poziom α -tokoferolu, γ -tokoferolu oraz plastochromanolu-8 był po 14 dniach ekspozycji na jony metali wyraźnie wyższy niż w warunkach kontrolnych (hodowla zielenicy bez jonów metali w pożywce), szczególnie dobrze było to widoczne w odniesieniu do ekspozycji na jony Cu, Cr, Hg i Cd (są zatem w tej grupie zarówno metale redoks-aktywne jak i redoks-nieaktywne). Ponadto zaobserwowano wyraźną dawkozależność (chodzi o zastosowaną dawkę jonów metali) skali stymulacji poziomu wspomnianych antyutleniaczy. Niestety wyniki oznaczeń stopnia utlenienia puli PQ oraz poziomu PQ_{tot} są, według mnie, zupełnie niekonkluzywne, ponieważ wzorzec zmian badanych wartości był skrajnie zmienny, w zależności od tego na jony jakiego metalu eksponowano komórki badanej zielenicy. Poza wzrostem poziomu niektórych antyutleniaczy lipidowych za odpowiedź komórek *C. reinhardtii* na chroniczny stres wywołany obecnością jonów metali w pożywce można uznać 1) wzrost wartości NPQ wraz z upływem czasu ekspozycji, obserwowany w komórkach zielenicy w odpowiedzi na obecność w pożywce większości jonów badanych metali



(wzrost NPQ zapobiegałby zgubnym skutkom indukowanej przez metale nierównowadze energii wzbudzenia elektronowego docierającej do centrów reakcji PSII i energii możliwej do zutylizowania w formie fotosyntetycznego transportu elektronów), oraz 2) stymulację pod działaniem jonów metali akumulacji mRNA genu *VTE3*, choć rangę tej obserwacji obniża fakt, że wspomniana stymulacja była obserwowana w sposób konsekwentny jedynie w odniesieniu do obecności jonów Ag w pożywce - wyniki uzyskane w badaniach nad ekspozycją zielenicy na jony innych metali są bardzo heterogenne. Uzupełnieniem wyników opisanych w publikacji Nowicka i wsp. (2016b) jest praca Nowicka i wsp. (2020). Habilitantka dowodzi w niej, że dodatek do pożywki pirozalonu likwiduje efekt wzrostu poziomu wszystkich badanych antyutleniaczy lipidowych w warunkach długoterminowej (14 dni) ekspozycji komórek *C. reinhardtii* na jony Cd i Cr. Dalsze wyniki wskazują, że w warunkach traktowania pirozalonem komórki zielenicy eksponowane na jony Cd i Cr wdrażają antystresową strategię adaptacyjną kompensującą spadek poziomu antyutleniaczy lipidowych, polegającą na stymulacji akumulacji niskocząsteczkowych hydrofilnych antyutleniaczy - proliny, kwasu askorbinowego oraz rozpuszczalnych tioli. Ostatnia z publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne Kandydatki - Nowicka i wsp. (2017) nie zawiera żadnych wyników odnoszących się do stresu powodowanego przez ekspozycję komórek *C. reinhardtii* na jony metali. Celem pracy jest natomiast zbadanie ewentualnego powiązania antyutleniaczy lipidowych z odpowiedzią komórek *C. reinhardtii* na juglon - szeroko badany związek allelopatyczny. Uzyskane wyniki wskazują na to, że wspomniane antyutleniacze rzeczywiście uczestniczą w odpowiedzi komórek na juglon. Jak się okazuje juglon wywoływał w komórkach badanej zielenicy stres oksydacyjny, wyrażający się m.in. wzrostem poziomu LOOH (dotyczyło to zwłaszcza najdłuższego czasu traktowania komórek juglonem - 7.5h). Towarzyszył temu spadek poziomu α -tokoferolu, γ -tokoferolu i PQ_{tot} w stosunku do kontroli (hodowla na pożywce bez juglonu). Habilitantka zauważyła, że prooksydacyjny efekt juglonu może zostać znacznie wzmocniony jeśli komórki traktowane juglonem są eksponowane na światło o wysokim natężeniu.

6

Wyniki zawarte w czterech omówionych powyżej publikacjach zawierają szereg elementów które oceniam krytycznie. Jak już wspomniałem (patrz wyżej) część wyników uważam za niekonkluzywne, ergo nie nadające się do wyciągnięcia ważnych wniosków biologicznych. Wywód Habilitantki bywa zupełnie nieprzekonywujący, np. próba nadania jakiegoś wspólnego mianownika bardzo niespójnym wynikom oznaczania stopnia utlenienia puli PQ oraz poziomu PQ_{tot} w komórkach długoterminowo traktowanych jonami metali (Nowicka i wsp., 2016b, 10 pierwszych linijek od góry na stronie 144) jest raczej przysłowiowym „robieniem dobrej miny do złej gry” niż rzetelną dyskusją naukową. Dodajmy do tego, że zarówno rozdziały „Wyniki” jak i rozdziały „Dyskusja” wszystkich czterech omawianych publikacji są miejscami niejasne a wywód Habilitantki trudny do śledzenia. Przypomnijmy, że uważam także iż osiągnięcie Habilitantki ma raczej skromny wymiar ilościowy.

W mojej ocenie osiągnięcie naukowe Habilitantki broni się jednak oryginalnością zgromadzonych wyników. W sytuacji gdy literatura światowa praktycznie nie zawiera żadnych doniesień w obszarze roli antyutleniaczy lipidowych w odpowiedzi roślin na stres wynikający z ekspozycji na jony metali oraz na związki allelopatyczne, każda nowa publikacja w tym obszarze jest niemal na wagę złota. A publikacje Habilitantki mają ponadto walor pełnej wiarygodności prezentowanych wyników (mimo niekonkluzywności części materiału). Metody jakimi posługiwała się Habilitantka są nowoczesne i doskonale opisane - nie mam do nich najmniejszych zastrzeżeń. Wszystko to sprawia, że mimo pewnego krytycyzmu osiągnięcie Habilitantki oceniam umiarkowanie pozytywnie, to znaczy uznaję że spełnia ono ustawowy wymóg wniesienia znacznego wkładu w rozwój dyscypliny: nauki biologiczne.

Podsumowując: **umiarkowanie pozytywnie oceniam wskazane przez Kandydatkę osiągnięcie naukowe wynikające z Art. 291 Ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce „Jednokomórkowa zielenica *Chlamydomonas reinhardtii* jako modelowy organizm fotosyntetyczny do badań nad odpowiedzią na toksyczne stężenia jonów metali ciężkich oraz**



związki allelopatyczne. Badania nad rolą mechanizmów ochronnych ze szczególnym uwzględnieniem antyoksydantów należących do prenololipidów”.

Ocena innych osiągnięć naukowych Kandydatki oraz Jej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

Poza publikacjami włączonymi do cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych które Habilitantka definiuje jako swoje osiągnięcie naukowe wynikające z Art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym Habilitantka dysponuje pokaźnym pozostałym dorobkiem naukowym (= osiągnięciami) obejmującym współautorstwo 9 oryginalnych prac badawczych, 12 prac przeglądowych, jednej noty technicznej (którą Habilitantka umieściła wśród publikacji składających się na osiągnięcie naukowe wynikające z Art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym), czterech rozdziałów w książkach oraz pięciu rozdziałów w przewodnikach do ćwiczeń laboratoryjnych. Co się tyczy aspektu ilościowego dorobek ten należy określić jako bardzo dobry. Wśród dziewięciu oryginalnych prac badawczych na szczególnie wysoką ocenę zasługują artykuły odnoszące się do odpowiedzi różnych gatunków roślin wyższych i glonów na ekspozycję na światło o wysokim natężeniu (pozostałe publikacje z tej grupy także oceniam pozytywnie).

W publikacji Nowicka i Kruk (2015) porównywano aktywność kilku lipidowych antyutleniaczy jako czynników zmiatających mechanizmem chemicznym tlen singletowy powstający - w trakcie ekspozycji komórek *C. reinhardtii* na światło o wysokim natężeniu - w centrach reakcji PSII jako wynik tzw. wstecznego transportu elektronów. Ustalono, co należy uznać za wynik interesujący i nowy dla nauki, że PQ/PQH₂ są konsumowane bardziej efektywnie w trakcie trwającego 2h stresu świetlnego niż α -tokoferol, co sugeruje że PQ/PQH₂ są bardziej aktywne jako chemiczne wygaszacze tlenu singletowego w porównaniu z α -tokoferolem (z kolei PQH₂ jest bardziej aktywny niż PQ). Ponadto

8

dowodzono, co także jest wynikiem ciekawym i nowatorskim, że stabilność poziomu α -tokoferolu, nieodwracalnie utlenianego przez tlen singletowy do α -tokoferolchinonu, może w opisywanych warunkach zapewniać (poza resyntezą) także zwrotne, nieenzymatyczne przekształcenie 8 α -hydroperoksy- α -tokoferonu do α -tokoferolu (8 α -hydroperoksy- α -tokoferon to produkt pośredni utleniania α -tokoferolu przez tlen singletowy). Z kolei w publikacji Dłużewska i wsp. (2015) opisano dwa nowe dla nauki metabolity lipidowych antyutleniaczy do powstania których dochodzi w trakcie zarówno krótko - jak i długoterminowej ekspozycji roślin *Arabidopsis thaliana* na światło o wysokim natężeniu. Te metabolity to zredukowana forma plastochinonu C oraz plastochinon B. Plastochinon C jest znanym już wcześniej produktem chemicznego wygaszania tlenu singletowego przez PQH₂ jednak dotąd nie stwierdzano obecności jego zredukowanej formy u *A. thaliana*. Plastochinon B z kolei jest estrem kwasów tłuszczowych i plastochinonu C, powstającym, jak sugerują autorzy drogą enzymatycznej estryfikacji plastochinonu B. Obydwie omawiane publikacje - tzn. Nowicka i Kruk (2015) oraz Dłużewska i wsp. (2015) należy uznać za wnoszące znaczny wkład w rozwój wiedzy w obszarze funkcji i metabolizmu lipidowych antyutleniaczy w warunkach ekspozycji roślin i glonów na światło o wysokim natężeniu.

W pracy Kuczyńska i wsp. (2020) autorzy, wśród nich Habilitantka, poddają szczegółowej analizie konsekwencje indukcji cyklu VAZ do jakiej dochodzi w komórkach okrzemki *Phaeodactylum tricornutum* pod działaniem światła o wysokim natężeniu. Cykl VAZ w tych warunkach nakłada się na cykl DD, funkcjonujący także w warunkach kontaktu okrzemek ze światłem o niskim natężeniu. Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik biofizycznych (różnicowa kalorymetria skaningowa oraz anizotropia fluorescencyjna) w odniesieniu do jedno- lub wielowarstwowych liposomów DPPC z wbudowanymi epoksydowanymi ksantofilami (diatoksantyna lub zeaksantyna) ustalono, że uruchomienie cyklu VAZ zmienia właściwości fizyczne błon tylakoidowych badanych okrzemek w stosunku do sytuacji kiedy działa jedynie cykl DD. Zmiana właściwości fizycznych



zapewne ułatwia wygaszanie tlenu singletowego i poprawia efektywność ochrony błon tylakoidowych przed uszkodzeniami ze strony ROS. To kolejne ważne i znaczące dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne odkrycia i sugestie.

Podsumowując: pozytywnie oceniam inne osiągnięcia naukowe Habilitantki i uznaję je za wnoszące znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.

Co się tyczy aktywności naukowej Habilitantki realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej to **należy ją ocenić wysoko**. Habilitantka intensywnie współpracuje z następującymi instytucjami naukowymi zewnętrznymi w stosunku do Uniwersytetu Jagiellońskiego: Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Uniwersytet Łódzki, Instytut Biologii Węgierskiej Akademii Nauk w Szeged, Uniwersytet im. Palackiego w Ołomuńcu (Republika Czeska), Uniwersytet w Manchester (Anglia) oraz Instytut Maxa Plancka (Niemcy). Efektami tej współpracy są liczne publikacje. Z kolei współpraca z Akademią Górniczo-Hutniczą w Krakowie oraz Instytutem Maxa Plancka (Niemcy) przyjęła także formę wspólnego projektu finansowanego przez MNiSzW w latach 2012-2014. Jeszcze inna forma współpracy wiąże Habilitantkę z grupą uczelni warszawskich, w tym Uniwersytetem Warszawskim - Habilitantka co roku (od 2016r.) recenzuje streszczenia części komunikatów przysyłanych na Międzyuczelniane Sympozja Biotechnologiczne organizowane przez uczelnie warszawskie.

W mojej opinii **aktywność naukowa Habilitantki, realizowana w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej spełnia oczekiwania ustawodawcy.**

Konkluzja: Działając na podstawie art. 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym, uwzględniając wywód przedstawiony powyżej, stwierdzam że

1. przedstawiony do oceny zestaw powiązanych tematycznie publikacji zatytułowany „**Jednokomórkowa zielenica *Chlamydomonas reinhardtii* jako modelowy organizm fotosyntetyczny do badań nad odpowiedzią na toksyczne stężenia jonów metali ciężkich oraz wiązki allelopatyczne. Badania nad rolą mechanizmów ochronnych ze szczególnym uwzględnieniem antyoksydantów należących do prenololipidów**” stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne
2. pozostałe osiągnięcia naukowe Habilitantki także stanowią znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne
3. Habilitantka wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej

W związku z tym **oceniłam pozytywnie wnioski o nadanie p. dr Beatrycze Nowickiej stopnia doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Prof. dr hab. Grzegorz Jackowski

