



UNIwersytet Jagielloński
Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Kraków, 3 lipca 2023

Prof. dr hab. Halina Gabrys
Zakład Biotechnologii Roślin
Tel.: (12) 66 46 340
E-mail: halina.gabrys@uj.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Marczak
pod tytułem "Charakterystyka mechanizmu degradacji proteasomalnej syntazy ACC
typu III-ACS7 u *Arabidopsis thaliana*"

Informacje ogólne

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Marczak ma tradycyjną formę i liczy 106 stron, łącznie z materiałem ilustracyjnym w postaci 21 rycin, z których kilka ma złożony charakter i zawiera obrazy mikroskopowe, oraz 14 tabel. Praca została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, w Pracowni Biotechnologii, kierowanej przez prof. UAM dr hab. Agnieszkę Ludwików, która jest promotorem rozprawy. Problemy, których rozwiązania podjęła się Doktorantka, określone w tytule i rozdziale 2. *Cel pracy* wpisują się w tematykę badań prowadzonych przez członków zespołu badawczego od ponad dekady. Część wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w *Cells* w 2020 r. w artykule „Protein Phosphatases Type 2C Group A Interact with and Regulate the Stability of ACC Synthase 7 in *Arabidopsis*”, której Doktorantka jest pierwszą autorką. Pozostały dorobek naukowy Doktorantki obejmuje współautorstwo trzech prac eksperymentalnych i jednej przeglądowej, opublikowanych w poczytnych czasopismach *Frontiers in Plant Science* i *Bioprotocol*. Badania wykonane w ramach rozprawy zostały sfinansowane z czterech grantów.

Etylen jest nietypowym, drobnocząsteczkowym, lotnym fitohormonem, którego działanie stale budzi duże zainteresowanie nie tylko ze względów poznawczych lecz także z powodu istotnych zastosowań praktycznych. Jest on hormonem wielofunkcyjnym, z jednej strony kontrolującym wzrost i rozwój rośliny, w szczególności procesy dojrzewania i starzenia, z drugiej strony sterującym reakcjami na stresy biotyczne i abiotyczne. Głównym powodem aplikacyjnego znaczenia etylenu jest sprawowanie przezeń kontroli nad dojrzewaniem owoców. Istotne znaczenie ma także jego wpływ na odporność roślin uprawnych na czynniki stresowe. Z powyższych powodów bardzo istotne jest szczegółowe poznanie procesów regulujących aktywność jednej z syntaz bezpośredniego prekursora etylenu, kwasu aminocyklopropano-karboksylowego (ACC). Wybór tematu pracy doktorskiej uważam zatem za wyjątkowo trafny.

Część szczegółowa recenzji

Wstęp

Wstęp liczący 17 stron, ilustrowany pięcioma doskonałymi schematami, jest bardzo dobrym, zwięzłym i rzeczowym wprowadzeniem do zaprezentowanych w pracy badań. Autorka przedstawiła szlak biosyntezy etylenu, aktualny model jego ścieżki sygnałowej i powiązania pomiędzy sygnalizacją etylenu i kwasu abscysynowego. Omówiła także szczegółowo syntazy ACC i mechanizmy kontroli ich stabilności. Osobny podrozdział poświęciła mechanizmom degradacji białek.

Cel pracy

Autorka postawiła sobie za cel dokonanie charakterystyki mechanizmu degradacji jednej z syntaz ACC, należącej do III grupy syntazy ACS7, ze szczególnym uwzględnieniem roli fosfataz białkowych PP2C z grupy A w regulacji jej stabilności. Cel ogólny rozpisany został na cztery zadania badawcze. Nie do końca szczęśliwe jest sformułowanie zadania nr 2, które staje się w pełni zrozumiałe dopiero po przeczytaniu w rozdziale *Wyniki*, że ACS7 tworzy homodimer.

Materiały i Metody

Metodyka zastosowana w pracy została opisana na 30 stronach, jest to zatem najdłuższy rozdział pracy. Pośród stosowanych metod dominują techniki biologii molekularnej. Stąd najwięcej miejsca w rozdziale zajmują schematy stosowanych wektorów, procedury używane w inżynierii genetycznej. Osobny podrozdział poświęciła Autorka metodom izolacji i analizy białek oraz nadekspresji białek roślinnych w systemie bakteryjnym. W pracy wykonano także szereg nowoczesnych analiz mikroskopowych przy użyciu modelu protoplastów izolowanych z liści *Arabidopsis thaliana*, transfekowanych z użyciem PEG. Techniki te zastosowano do określenia subkomórkowej lokalizacji białek, a także do badań oddziaływania białek metodami bimolekularnej komplementacji fluorescencji (mBIFC) oraz rezonansowego transferu energii Förstera (FRET) i obrazowania czasu życia fluorescencji (FLIM). Opisy metod są przejrzyste i szczegółowe, pozwalają na powtórzenie eksperymentów przedstawionych w pracy.

Wyniki

W tej części ujawnia się największa zaleta pracy, którą jest moim zdaniem logika i konsekwencja w planowaniu eksperymentów. Dzięki temu Doktorantka zrealizowała wszystkie założone cele pracy.

Pierwszym etapem pracy było wytypowanie partnerów syntazy ACS7 spośród fosfataz białkowych PP2C z grupy A, działających w przekazie sygnału kwasu abscysynowego: ABI1, ABI2, HAB1. Zadanie to zostało wykonane poprzez kolokalizację badanych białek w

protoplastach metodą mBIFC. Następnie Doktorantka przeprowadziła charakterystykę oddziaływań ACS7 z fosfatazami białkowymi metodą FRET - FLIM. Stosując formy delecyjne białka ACS7 przeprowadziła próbę wyznaczenia potencjalnych miejsc oddziaływania pomiędzy tą syntazą i ABI1, która niestety nie zakończyła się powodzeniem. Natomiast powiodło się wyznaczenie aminokwasów fosfatazy ABI1, kluczowych dla tworzenia kompleksu z ACS7. Po wyprodukowaniu białek w systemie bakteryjnym Doktorantka użyła metody pozakomórkowej degradacji białka *in vitro* i wykazała, że wszystkie zbadane fosfatazy białkowe PP2C regulują stabilność ACS7.

Spośród uzyskanych wyników za najważniejsze uważam następujące ustalenia poczynione przez Autorkę:

- Syntaza ACS7 oddziałuje z fosfatazami PP2C, ABI1, ABI2 oraz HAB1.
- ABI1 oraz ABI2 i HAB1 przyspieszają degradację syntazy ACC typu III – ACS7.
- Zidentyfikowano reszty seryn (seryny w pozycji 48 oraz 85) oraz lizyn (lizyny w pozycji 238 oraz 384) zaangażowanych w regulację stabilności białka ACS7.
- Wytypowano aminokwasy w sekwencji ABI1 (tryptofan w pozycji 300 oraz izoleucyna w pozycji 298) biorące udział w formowaniu kompleksu białkowego homodimer ACS7-ABI1.

Do tej części pracy mam kilka uwag:

Podstawową wątpliwość budzą wyniki lokalizacji z użyciem mikroskopii konfokalnej. W pracy nie podano sposobu uzyskania obrazów z mikroskopu konfokalnego. Nie wiadomo czy przedstawione na rycinach 12,13,14 i 16 obrazy są pojedynczymi przekrojami czy złożeniami kilku przekrojów optycznych. W pierwszym przypadku w obrazach uzyskanych w świetle przechodzącym powinno być widoczne jądro komórkowe. W drugim przypadku należy podać metodę złożenia, liczbę przekrojów optycznych oraz odległość w osi Z.

Autorka stwierdza jednoznacznie, że badane kompleksy ACS7 z poszczególnymi fosfatazami lokalizowały się w jądrze komórkowym i cytoplazmie. Cytoplazmatyczna lokalizacja białek, zwłaszcza na podstawie rycin 12 i 13, jest dyskusyjna. Przy takiej lokalizacji zazwyczaj widoczna jest fluorescencja przy błonie komórkowej, w postaci obwódki protoplastu. Jeszcze więcej wątpliwości budzi lokalizacja jądrowa gdyż fluorescencja GFP nie pokrywa się jednoznacznie z fluorescencją CBP20. Na podstawie większości przedstawionych obrazów można wnosić, że badane białka zlokalizowane są poza jądrem komórkowych. Oddziaływania ACS7 z fosfatazami, przedstawione na rycinie 13, wydają się zachodzić w pobliżu jądra komórkowego, być może w retikulum endoplazmatycznym.

Ponadto zdjęcia protoplastów zamieszczone w pracy nie są dobrze wybrane: wiele protoplastów wygląda na splazmolizowane lub wręcz martwe. Analiza tych obrazów nasunęła mi ogólniejsze pytanie: Czy zdaniem doktorantki jakieś elementy wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych białek mogą ująć uwagę eksperymentatora ze względu na użycie protoplastów a nie fragmentów tkanki? Innymi słowy proszę o krytyczną ocenę zastosowania protoplastów do badania lokalizacji i oddziaływań białek.

Pozostałe uwagi:

Na str. 67 Autorka stwierdza, że zaobserwowano istotne zmniejszenie czasu trwania fluorescencji donora w kompleksach dimerów ACS7 ze zmodyfikowanymi fosfatazami ABI1 w stosunku do wariantu niezmutowanego. Tymczasem na rycinie 17B zaznaczono jedynie dość oczywiste różnice pomiędzy dimerem ACS7 w obecności i przy braku akceptora, nie zaś pomiędzy czasami trwania fluorescencji dla akceptora natywnego (2.17 ns) i form zmutowanych (2,19 i 2,20 ns). Czy te różnice są rzeczywiście istotne?

Badania mechanistyczne, zreferowane na str. 71, przeprowadzono dla fosfatazy ABI1. Jakich wyników można by się spodziewać dla ABI2 i HAB1?

Na wykresach 18B, 19B i 20B brakuje oznaczenia siatki, tj. linii pomocniczej dla 50% poziomu białka GST-ACS7. Obecność takiej linii znacznie ułatwiłaby odczyt wartości okresów półtrwania. Ponadto wykresy 19B i 20B przedstawiają przebieg czasowy degradacji białek, a nie okresy ich półtrwania, jak podano w opisie tych wykresów.

Dyskusja

Ten 10-stronicowy rozdział dobrze podsumowuje główne tezy rozprawy i przedstawia je na szerokim tle ostatnich doniesień literaturowych. Przejrzysty schemat zamieszczony na str. 85 przedstawia zaproponowany w pracy mechanizm regulacji stabilności białka ACS7.

Na stronie 81 znalazłam uwagę nt. wpływu światła na syntazy ACC, które są stabilne w ciemności i „ulegają degradacji dopiero na świetle”. Z tego powodu, jak stwierdza Autorka, eksperymenty zmierzające do określenia czasu półtrwania białka ACS7 w całkowitych ekstraktach białkowych izolowanych z siewek Arabidopsis były prowadzone w warunkach świetlnych. Proszę o rozwinięcie tych uwag, np. podanie jakie światło (o jakim natężeniu i długości fali) wywołuje degradację syntaz ACC według danych literaturowych, oraz jakie warunki świetlne i do której fazy eksperymentu zastosowano?

Uwagi redakcyjne

Praca jest napisana w sposób klarowny i ogólnie poprawny stylistycznie.

W części metodycznej przeszkadza ciągle mieszanie trybu dokonanego i niedokonanego w opisie procedur. Wprawdzie nie wpływa to krytycznie na zrozumienie procedury, ale dobrze byłoby wiedzieć czy dany fragment doświadczenia był wykonany raz, czy też powtarzano go kilka razy. Poza tym tekst ujednolicony pod względem logicznym byłby znacznie bardziej elegancki.

W pracy zauważyłam ok. 20 tzw. literówek i drobnych błędów gramatycznych bądź stylistycznych; na str. 47 podano błędny nr tabeli przedstawiającej skład mieszaniny reakcyjnej do mutagenезы ukierunkowanej.

W tekście pracy prawie nie ma wyrażen żargonowych i anglicyzmów oprócz „tipsa” (str. 33), „białek z tagiem” (Tab.13) oraz „promowania” (degradacji, reakcji ubikwitynacji bądź

specyficznych interakcji), które ma w języku polskim kilka znaczeń ale żadne z nich nie ma sensu w kontekstach w jakich użyto je w pracy; powinno być zastąpione np. przez „wywołuje”.

Na str. 41 zastosowano przestarzały zapis stężeń; powinno być np. $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Ilustracje, w większości złożone, schematy i diagramy są przejrzyste, staranne i dobrze opisane.

Pomimo różnych uwag krytycznych pracę doktorską pani mgr Małgorzaty Marczak oceniam jako bardzo dobre opracowanie. Przedstawione badania świadczą o dobrym warsztacie badawczym Doktorantki, zwłaszcza w obszarze technik biologii molekularnej. Rzetelnie udokumentowane wyniki mają dużą wartość poznawczą. Praca jest nowatorska i wnosi nowe, ważne informacje na temat mechanizmów leżących u podstaw przekazu sygnałów hormonalnych w roślinach. Lektura rozprawy przekonuje, że Doktorantka jest dojrzałą badaczką, dobrze przygotowaną do dalszej pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021, poz. 478. Wnioskuje zatem o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Marczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabrys

