



ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centrala 61 6550200, sekretariat 61 6550255, E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl

Dr hab. Agnieszka Kielbowicz-Matuk
Zakład Regulacji Ekspresji Genów
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, 10 lipca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Małgorzaty Marczak

**pod tytułem „Charakterystyka mechanizmu degradacji proteasomalnej syntazy
ACC typu III-ACS7 u *Arabidopsis thaliana*“**

Podstawy formalne wydania recenzji

Recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Marczak opracowano na podstawie uchwały rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 25 listopada 2022 r., jak również pisma Dziekana Wydziału Biologii Pani prof. UAM dr hab. Beaty Messyasz z dnia 5 maja 2023 r.

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Panią mgr Małgorzatę Marczak wykonana została w Pracowni Biotechnologii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików przy wykorzystaniu środków finansowych pochodzących z czterech różnych źródeł. Część zaprezentowanych w rozprawie wyników badań została już opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie naukowym *Cells* o współczynniku oddziaływania wynoszącym 6,60 (zgodnie z rokiem opublikowania), w którym Doktorantka jest autorem wiodącym (pierwszym).

Przedmiot rozprawy doktorskiej i celowość podjęcia tematu badawczego

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Marczak jest zgłębienie mechanizmu regulującego stabilność syntazy ACS7 (jedyne przedstawiciela syntaz ACC grupy III u *A. thaliana*), jak również poznanie roli negatywnych regulatorów sygnalizacji ABA, jakimi są fosfatazy białkowe PP2C z grupy A w tym procesie.

Syntazy ACC to rodzina białek enzymatycznych katalizujących kluczową reakcję procesu syntezy etylenu tj. fitohormonu będącego zarówno stymulatorem, jak i inhibitorem wzrostu i rozwoju roślin, zaangażowanego w odpowiedź roślin na stres. Regulacja aktywności białek ACS poprzez modyfikacje potranslacyjne w tym katalizowaną przez fosfatazy białkowe defosforylację, ma kluczowe znaczenie w kontrolowaniu biosyntezy etylenu. Do tej pory zidentyfikowano i scharakteryzowano liczne białka zaangażowane w regulację stabilności syntaz ACC typu I i typu II u *A. thaliana*. Tymczasem komponenty mechanizmu odpowiedzialnego za prawidłowy balans między wytwarzaniem białka ACS7 – jedynego reprezentanta syntaz ACC typu III, a jego degradacją, nadal pozostają zagadką. W swojej pracy Doktorantka podjęła się zadania poznania mechanizmu degradacji syntazy ACS7 u *Arabidopsis thaliana* i roli trzech fosfatyz białkowych 2C należących do grupy A w tym szlaku. Z całą pewnością tematyka niniejszej dysertacji jest ważna i dobrze wpisuje się w aktualny nurt badań realizowany w grupie badawczej Pani prof. Agnieszki Ludwików. Niewątpliwie pogłębienie wiedzy o mechanizmach kontrolujących biosyntezę etylenu jest bardzo istotne z punktu widzenia poprawy odporności roślin na niekorzystne warunki środowiska. Co więcej, poznanie zależności między szlakami sygnalizacji etylenu i kwasu abscysynowego, pozwoli lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy leżące u podstaw interakcji pomiędzy tymi dwoma podstawowymi hormonami roślinnymi.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem obejmującym 106 stron tekstu w języku polskim, ilustrowanego 21 rysunkami i zawierającego 14 tabel. Struktura pracy jest typowa dla dysertacji doktorskich i obejmuje następujące rozdziały: Streszczenie (w języku polskim i angielskim) poprzedzające słowa kluczowe i wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję. Całość zamyka zwięzłe Podsumowanie, w którym mgr Małgorzata Marczał zestawiała kluczowe wyniki uzyskane podczas realizacji pracy i stosunkowo obszerny (obejmujący 202 pozycje) spis literatury. Dodatkowo, końcowa część pracy została wzbogacona o Suplement obejmujący dwie ryciny, obrazujące kontrole dla analiz mBiFC i mBiFC-FRET-FLIM. Tytuł dysertacji został sformułowany poprawnie, a problematyka badawcza przedstawiona w pracy jest adekwatna do jej tytułu. Przyznam, że praca przyniosła pewien niedosyt w zakresie braku hipotezy badawczej, która korespondowałaby z celem nakreślonym do realizacji, jak również wniosków końcowych, zdefiniowanych w oparciu o uzyskane wyniki.

Praca została napisana prawidłowo pod względem językowym. Zdania są sformułowane poprawnie z zachowaniem ciągłości logicznej, co sprawia, że lektura pracy jest przyjemnością. Na podkreślenie zasługuje staranna edycja i szata graficzna tekstu. Zdarzają się tylko nieliczne błędy literowe i wyrażenia potoczne będące wynikiem stosowania żargonu laboratoryjnego, np. na str. 12 zwrot „receptory CTR1 bezpośrednio fosforylują EIN2” powinien być zamieniony na „kinaza białkowa CTR1 bezpośrednio fosforyluje EIN2”, na str. 24 skrót „CPK11” to „CDPK11”, sformułowanie „kwalencyjne przyłączenie ubikwityny pełni szeroki zakres funkcji” jest nieprecyzyjne (str. 20), a zdanie „miejsca proteolityczne znajdują się w cylindrze i o aktywności podobnej do kaspazy, trypsyny oraz chymotrypsyny” jest niekompletne (str. 22). Na str. 32 termin „hodowla roślin” należy zmienić na „uprawa roślin”, z kolei określenie „plazmid czynnika płciowego F” (str. 36) to „plazmid zawierający czynnik płciowy F”, a sformułowanie „elektroforeza na żelu agarozowym” powinno być zastąpione przez „elektroforeza w żelu agarozowym” (str. 42). W tekście na str. 42 dotyczącym przygotowania odpowiedniego fragmentu DNA za pomocą reakcji

PCR, powinno być odwołanie do Rozdziału 3.3.8, a nie do Rozdziału 3.3.1, na str. 47 w fragmencie nawiązującym do składu mieszaniny reakcyjnej powinno być odwołanie do Tabeli 3 (zamiast do Tabeli 6), natomiast procedura transformacji komórek chemikompetentnych *E. coli* znajduje się w Rozdziale 3.3.5, a nie jak wskazuje Doktorantka w Rozdziale 2.3.5. Dodatkowo, na str. 65 fragment $\Delta 3$ białka ACS7 obejmuje subdomenę 2 transferazy zależnej od fosforanu pirydoksalu, a nie subdomenę 1, natomiast na str. 72 w opisie Rysunku 19 wprowadzono substytucję seryny w pozycji 85, a nie w pozycji 485. Pragnę podkreślić, że wskazane usterki, nie wpływają na moją pozytywną ocenę formalną pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Oceniając rozprawę pod względem merytorycznym stwierdzam, że zarówno zaplanowane zadania badawcze, jak i ich realizacja, dobór metod badawczych i dyskusja nad uzyskanymi wynikami nie budzą wątpliwości.

Krótki, osiemnastostronicowy Wstęp zawiera niezbędne informacje służące wprowadzeniu czytelnika w problematykę pracy. Została w nim przedstawiona ogólna charakterystyka fitohormonu gazowego jakim jest etylen, jego wielofunkcyjna natura w roślinach, szlak biosyntezy etylenu i abiotyczne czynniki środowiskowe wpływające na jego stymulację. Doktorantka opisała również kanoniczny szlak percepcji etylenu, jako dominującą kaskadę sygnalizacyjną i napomniwała o istnieniu nieliniowych szlaków alternatywnych. Z uwagi na nowatorskość niniejszego zagadnienia uprzejmie proszę Doktorantkę o krótką charakterystykę dotychczas poznanych szlaków alternatywnych, jak również o wyjaśnienie w jaki sposób zamiany konformacyjne w kompleksie receptor-kinaza białkowa CTR1 wywołane związaniem etylenu, wpływają na aktywność funkcjonalną białka CTR1? W dalszej części Wstępu mgr Małgorzata Marczał, sięgając po najnowsze doniesienia literaturowe, w przejrzysty sposób opisała interakcje między etylenem a elementami szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego (ABA). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka scharakteryzowała trzy klasy syntaz ACC u *A. thaliana*, odnosząc się do ich istotnej roli w biosyntezie etylenu oraz omówiła zagadnienia związane z regulacją stabilności tych białek. W tym miejscu dużym ułatwieniem byłaby tabela zestawiająca białka wpływające na stabilność różnych typów syntaz ACC ze wskazaniem na ich pozytywny bądź negatywny charakter regulacji. Co więcej przyznam, że w tej części rozprawy zabrakło mi zwięzłego opisu rodziny białek, jakimi są fosfatazy białkowe PP2C u *A. thaliana*, odnosząc się przede wszystkim do przedstawicieli z grupy A, jako negatywnych regulatorów sygnalizacji ABA, którym Doktorantka poświęciła dużą część swoich badań. Niewątpliwie przedstawione we Wstępie informacje w sposób przekonujący uzasadniają celowość podjętych przez Doktorantkę badań, wskazują na Jej obszerną wiedzę w zakresie zgłębianej tematyki i dojrzałość w dokonywaniu właściwej selekcji pod kątem realizowanych zagadnień.

Cel pracy został precyzyjnie sformułowany. Zawiera on uzasadnienie podjętych badań oraz skrupulatnie wyznaczone cztery zadania badawcze, których realizacja przybliżyła Doktorantkę do jego osiągnięcia.

W Rozdziale „Materiały i metody” mgr Małgorzata Marczał opisuje materiał roślinny i mikrobiologiczny wykorzystywany w badaniach, zastosowaną metodykę badawczą, odczynniki i roztwory oraz wektory plazmidowe wraz z konstruktami genowymi i ich przeznaczeniem. Struktura tego rozdziału jest typowa dla prac doktorskich. Na uwagę zasługuje różnorodność i nowatorskość metod badawczych, które zostały opanowane i zastosowane przez Doktorantkę

podczas realizacji zadań badawczych, włączając metody związane z przygotowaniem konstruktów plazmidowych, z wykorzystaniem białek i metody mikroskopowe. Na podkreślenie zasługuje również bogactwo zastosowanych w badaniach skonstruowanych przez siebie wektorów niosących sekwencje kodujące białka fuzyjne, fragmenty delecyjne syntazy ACS7 i sekwencje zmutowanych kierunkowo białek tj. fosfatazy białkowej ABI1 i syntazy ACS7. Nie zgadzam się jedynie ze stwierdzeniem, że drugim etapem klonowania Gateway jest reakcja ligacji do wektora pENTR (str. 42).

Kolejny rozdział „Wyniki” przedstawiono w trzech podrozdziałach, obejmujących badania: (i) oddziaływania białka ACS7 z fosfatazami białkowymi PP2C z grupy A, (ii) wpływu tych fosfataz na stabilność ACS7 oraz (iii) identyfikacji reszt aminokwasowych jako potencjalnych miejsc ubikwitynacji zaangażowanych w degradację proteasomalną białka ACS7. Każdy opisany podrozdział rozpoczyna wskazanie celowości przeprowadzenia tego typu badań, co ułatwia zrozumienie wybranej przez Doktorantkę drogi doświadczalnej, a kończy krótkie podsumowanie uzyskanych rezultatów. Skrupulatny opis badań wzbogacony 9 rysunkami jest wyczerpujący i nie budzi zastrzeżeń.

Pytania i uwagi dotyczące Wyników rozprawy:

1. Analizując mechanizm oddziaływania syntazy ACS7 i fosfatazy białkowej ABI1 Doktorantka przygotowała zmutowane warianty białka ABI1, w których aminokwasy kluczowe dla oddziaływania z syntazą ACS7, takie jak tryptofan w pozycji 300 i izoleucynę w pozycji 298 zastąpiono alaniną. Tymczasem badania wykazały, że zarówno ABI1, jak i oba zmutowane warianty oddziałują z homodimerem ACS7. Bazując na uzyskanych przez Doktorantkę wynikach, nie mogę zgodzić się z wyciągniętym wnioskiem, że obecność tryptofanu oraz izoleucyny jest istotna dla tworzenia kompleksu z homodimerem ACS7 (str. 67).
2. Badając wpływ fosfataz białkowych 2C na stabilność syntazy typu III ACS z wykorzystaniem metody pozakomórkowej degradacji białka *in vitro*, rekombinowane białko GST-ACS7 inkubowano z ekstraktami białkowymi pochodzącymi z roślin WT Col-0, *abild*, *abi2* i *hab1*. Zastanawiająca jest ogromna różnica w poziomie białka GST-ACS7 w ekstraktach białkowych nietraktowanych inhibitorem proteasomu z roślin WT Col-0 i mutantów, zwłaszcza mutantu *hab1*. Moim zdaniem może to wpływać na tempo degradacji białka GST-ACS7. Zakładając, że stężenie białka rekombinowanego GST-ACS7 było takie samo we wszystkich próbach w czasie 0, jak Doktorantka wytłumaczy taką dysproporcję (Rysunek 18A)?
3. Dane literaturowe (Liu et al. 2022) wskazują, że u *A. thaliana* w grupie A PP2C występuje 10 przedstawicieli. Obecnie wiadomo, że co najmniej sześciu spośród nich, włączając białka ABI1, ABI2, AHG3, AHG1, HAB1 i HAB2 uczestniczy w regulacji sygnalizacji ABA. Co zadecydowało o wyborze trzech fosfataz białkowych ABI1, ABI2 i HAB1 jako kluczowych regulatorów zaangażowanych w mechanizm degradacji syntazy ACS7? Czym Doktorantka kierowała się wybierając do badań mutanty *abild*, *abi2* i *hab1*, a nie mutanty innych fosfataz białkowych z tej grupy?
4. Jak wytłumaczyć prawie dwukrotnie krótszy okres półtrwania zmutowanego wariantu białka GST-ACS7^{K174R} w porównaniu do natywnej formy zrekombinowanego białka GST-ACS7?

Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższych uwag i udzielenie odpowiedzi na zadane pytania podczas publicznej obrony.

Niewątpliwie za najważniejsze osiągnięcia uzyskane przez Doktorantkę należy uznać:

1. Potwierdzenie oddziaływania syntazy ACS7 z negatywnymi regulatorami ścieżki sygnałnej ABA, takimi jak fosfatazy białkowe 2C: ABI1, ABI2 i HAB1, zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytozolu przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej i techniki mBiFC.
2. Zidentyfikowanie tryptofanu w pozycji 300 i izoleucyny w pozycji 298 w białku ABI1 jako istotnych reszt aminokwasowych zaangażowanych w tworzenie kompleksu ABI1-ACS7.
3. Wykazanie, że fosfatazy białkowe ABI1, ABI2 i HAB1 biorą udział w regulacji biosyntezy etylenu, poprzez wpływ na tempo degradacji syntazy ACS7 w badaniach pozakomórkowej degradacji *in vitro*.
4. Wykazanie, że reszty serynowe w pozycji 48 i 85 w sekwencji białka ACS7 mogą być potencjalnymi miejscami defosforylacji przez fosfatazę ABI1, a zatem mogą determinować stabilność białka ACS7.
5. Wykazanie, że lizyny w pozycji 238 i 384 w sekwencji białka ACS7 mogą być kluczowe dla przyłączenia cząsteczki ubikwityny jako sygnału do degradacji przez proteasom 26S w badaniach pozakomórkowej degradacji *in vitro*, a zatem mogą determinować stabilność białka ACS7.

Rozdział „Dyskusja” jest napisany rzeczowo. Doktorantka szczegółowo omawia własne wyniki i obserwacje, krytycznie zestawia je z osiągnięciami innych naukowców i właściwie konferuje, co świadczy o doskonałej orientacji w zgłębianej tematyce.

Podsumowując, wartość merytoryczną przedłożonej pracy oceniam bardzo wysoko. Projekt rozprawy doktorskiej jest przemyślany i poprawnie zrealizowany, a postawione przez mgr Małgorzatę Marczak cele badawcze, zostały osiągnięte.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Marczak stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kielbowicz-Matuk Agnieszka
dr hab. Agnieszka Kielbowicz-Matuk