



dr hab. Małgorzata Pietrowska-Borek, prof. UPP
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Katedra Biochemii i Biotechnologii
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań
tel. 61-848-72-01
e-mail: malgorzata.pietrowska-borek@up.poznan.pl

Poznań, 14.07.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Duszyn
pt. „Rola cyklicznego GMP w odpowiedzi na stres biotyczny wywołany
przez *Fusarium pseudograminearum* u kłosownicy dwukłosowej (*Brachypodium distachyon*)”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Adrian Szmidt-Jaworskiej
i promotora pomocniczego dr Brygidy Świeżawskiej-Bonieckiej
w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, prof. dr hab. Wernera Ulricha, z dnia 25 maja 2022 roku informujące mnie o powołaniu na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej na podstawie uchwały Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 20 maja 2022 roku.

Podstawą ubiegania się mgr Marii Duszyn o stopień naukowy doktora są dwa oryginalne i tematycznie powiązane artykuły naukowe opublikowane w renomowanych anglojęzycznych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Są to następujące publikacje:

1. Duszyn, M.; Świeżawska-Boniecka, B.; Wong, A.; Jaworski, K.; Szmidt-Jaworska, A. *In Vitro* Characterization of Guanylyl Cyclase BdPepR2 from *Brachypodium distachyon* Identified through a Motif-Based Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6243 (IF₂₀₂₁ 6,208, IF_{5-letni}6,628; pkt MNiSW 140).
2. Duszyn, M.; Świeżawska-Boniecka, B.; Skorupa, M.; Jaworski, K.; Szmidt-Jaworska, A. BdGUCD1 and Cyclic GMP Are Required for Responses of *Brachypodium distachyon* to *Fusarium pseudograminearum* in the Mechanism Involving Jasmonate. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 2674 (IF₂₀₂₁ 6,208, IF_{5-letni}6,628; pkt MNiSW 140).

Łączny współczynnik oddziaływania (IF 5-letni) wymienionych publikacji wynosi 13,256, co można uznać za bardzo dobry poziom tego parametru oceny bibliometrycznej. Należy podkreślić, że w obu publikacjach mgr Maria Duszyn jest autorem pierwszym i korespondencyjnym, a na podstawie



analizy załączonych oświadczeń wszystkich współautorów publikacji, jednoznacznie można stwierdzić, że wkład Doktorantki w planowanie i wykonanie badań, opracowanie, analizę i interpretację wyników oraz przygotowanie pierwotnych i ostatecznych wersji manuskryptów był wiodący. Poza artykułami i oświadczeniami współautorów publikacji naukowych, w skład rozprawy doktorskiej wchodzi również: oświadczenia Promotora, Promotora pomocniczego i Autora rozprawy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 18-stronicowe opracowanie w języku polskim zawierające wprowadzenie w zagadnienie roli cyklicznych nukleotydów w reakcji roślin na biotyczny czynnik stresowy jak również opis stanu aktualnej wiedzy na temat cyklaz guanylanowych u roślin, hipotezy i cele badawcze, podsumowanie i wnioski, najważniejsze wyniki oraz liczącą 47 pozycji bibliografię. W rozprawie zamieszczono informację o finansowaniu badań z projektu PRELUDIUM pt. „cGMP jako cząsteczka koordynująca procesy sygnalizacyjne uruchamiane w komórkach *Brachypodium distachyon* na skutek infekcji *Fusarium pseudograminearum*” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr 2018/29/N/NZ9/00812), którego Doktorantka była kierownikiem.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Marii Duszyn wpisuje się w aktualne badania dotyczące identyfikacji roślinnych enzymów syntetyzujących cykliczne nukleotydy i zaangażowania tych nukleotydów, a w szczególności cGMP, w liczne procesy fizjologiczne u roślin. Stwierdzam, że temat pracy doktorskiej mgr Marii Duszyn jest oryginalny, a wyniki uzyskane podczas jej realizacji stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia zatem wymóg oryginalności podjętej tematyki badawczej. Doktorantka w sposób kompleksowy i wnikliwy analizuje otrzymane wyniki, konfrontując je z najnowszymi danymi literaturowymi dotyczącymi poruszanych zagadnień wskazując na wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej w zakresie prowadzonych badań. Z oświadczeń współautorów publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora wynika, że mgr Maria Duszyn brała udział w przygotowaniu koncepcji artykułów naukowych realizowała doświadczenia, analizowała i interpretowała otrzymane wyniki oraz przygotowała manuskrypty. Mogę tu śmiało stwierdzić, że Doktorantka posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Doktorantka zarówno we Wstępach publikacji, jak i we Wprowadzeniu polskojęzycznej części rozprawy, przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat enzymów syntetyzujących cGMP oraz opisała funkcje jakie pełni ten nukleotyd sygnałny w komórkach roślinnych. Nadmienić tu należy, że pierwszą rośliną cyklazą guanylanową opisaną w roku 2003 było białko AtGC1 z *Arabidopsis thaliana*. Białko to, jako jedno z siedmiu, zostało wytypowane na podstawie analiz bioinformatycznych znanych sekwencji cyklazy guanylanowej z cyjanobakterii oraz z niższych i wyższych organizmów eukariotycznych. Analizy te pozwoliły określić 14-aminokwasowy region centrum aktywnego domeny katalitycznej. Dalsze badania *in silico* nad wytypowaniem białek o potencjalnej aktywności cyklazy



guanylanowej i weryfikacja tych danych *in vitro*, doprowadziła do scharakteryzowania kolejnych białek o takiej właśnie aktywności, głównie w *A. thaliana*. Jak do tej pory u roślin jednoliściennych zostały scharakteryzowane dwie cyklazy guanylanowe. Badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Marii Duszyn doprowadziły do poszerzenia wiedzy z tego zakresu o kolejne dwa białka o aktywności cyklazy guanylanowej w tej grupie roślin. Białkami tymi są: PepR2 (publikacja 1, Duszyn i wsp. 2021) i GUCD1 z *Brachypodium distachyon* (publikacja 2, Duszyn i wsp. 2022). W mojej opinii jest to bardzo istotny wkład w poszerzenie wiedzy z zakresu białek zaangażowanych w syntezę jednej z cząsteczek sygnałnych jaką jest cGMP. Ponadto Doktorantka wykazała, że patogen, jakim jest *Fusarium pseudograminearum*, wywołujący choroby zbóż, wpływa na ekspresję genów kodujących powyższe białka i modyfikuje poziom molekuł sygnałnych, takich jak nukleotydy cykliczne czy fitohormony.

W pierwszej publikacji składającej się na rozprawę doktorską (Duszyn i wsp. 2021) zawarte są wyniki badań dotyczących analizy sekwencji BdPepR2, charakterystyki kinetycznej reakcji katalizowanych przez badane białko, oraz analizy mutacji w 14-aminokwasowym centrum katalicznym białka BdPepR2. W trakcie lektury publikacji 1 (Duszyn i wsp. 2021) rozprawy doktorskiej mgr Marii Duszyn nasunęło mi się kilka pytań, na które nie znalazłam odpowiedzi, ani w polskojęzycznym opisie badań, ani w publikacji. Dlatego proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do poniższych kwestii.

- 1) Na Figurze 2 przedstawiono aktywność BdPepR2 jako cyklazy guanylanowej w zależności od stężenia GTP, jonów Mn^{2+} i/lub jonów Mg^{2+} oraz porównano aktywność tego białka jako cyklazy guanylanowej i adenylanowej. Natomiast na Figurze 5A możemy zobaczyć, że cGMP może powstawać w mieszaninie reakcyjnej bez udziału białka BdPepR2 (szara linia chromatogramu). Czy może to być efektem zanieczyszczenia handlowo dostępnego preparatu GTP? Czy podczas obliczeń aktywności cyklazy guanylanowej brano pod uwagę tę ilość? I jaka ilość cGMP zawarta jest w przedstawionym pikcie?
- 2) Na Figurze 2B przedstawiono aktywność BdPepR2 jako cyklazy guanylanowej w obecności jonów Mn^{2+} i/lub Mg^{2+} . Jak widać, obecność obu jonów metali jednocześnie w mieszaninie reakcyjnej hamuje szybkość reakcji. Poproszę Doktorantkę o próbę zinterpretowania tego wyniku.
- 3) W publikacji 1 wyznaczono wartości K_m i V_{max} dla BdPepR2. Proszę o doprecyzowanie zakresu stężeń GTP, jak i punktów czasowych podczas wyznaczania wyżej wymienionych parametrów. Czy te oznaczenia były w zakresie od 0,5 do 2 mM GTP i tylko w jednym punkcie czasowym, tj. w 15 minut? I według jakiej metody wyznaczono wartości K_m i V_{max} ?
- 4) Doktorantka w publikacji 1 podaje dane literaturowe dotyczące wartości V_{max} innych roślinnych cyklaz guanylanowych. Czy autorzy publikacji dotyczących aktywności innych białek, jako



cyklaz guanylanowych, podają również wartości K_m ? Jeśli tak, to można byłoby w tym miejscu podyskutować o specyficzności substratowej badanych cyklaz wobec GTP.

- 5) Kontynuując wątek specyficzności substratowej, ciekawym w mojej opinii, byłyby również wartości K_m dla substratu GTP badanych mutantów BdPepR2M1066A i BdPepR2M1006R. Skoro zaobserwowano spadek aktywności tych białek jako cyklazy guanylanowej, to być może mają one mniejsze powinowactwo do GTP.
- 6) Mam też pytanie dotyczące zakresu ilości cGMP, jaki posłużył do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Na Figurze 3C w opisie osi X widnieje zakres do 600 pmoli cGMP, natomiast w legendzie - do 0,58 pmoli. Zatem, czy na osi X nie powinna być jednostka „fmole”?
- 7) Niejasnym dla mnie jest sformułowanie na stronie 7 (linia 22-23) publikacji 1, mówiące o wpływie mutacji aminokwasowych na aktywność badanego białka jako cyklazy adenylanowej. Mianowicie, Autorka podaje, że mutanty wykazywały niższą aktywność jako cyklazy adenylanowe, a w następnym zdaniu podaje, że mutacja w pozycji 14 nie miała wpływu na aktywność AC. Czy mogę prosić o wyjaśnienie tej sprzeczności?
- 8) W niniejszej pracy badano również wpływ GTP i cGMP na aktywność kinazową formy dzikiej i dwóch białek z mutacją aminokwasową. Na stronie 8 i Figurze 6A pokazano, że zarówno GTP jak i cGMP obniżają aktywność kinazową. Mam tutaj pytanie – czy oznaczano ilość cGMP w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 1,5 mM GTP? Zważywszy na to, że efekt cGMP badano przy jego stężeniu 1 μ M (czyli 1500 razy niższym niż GTP) można przypuszczać, że może to być efekt powstałego cGMP.
- 9) Czy badano poziom cAMP w mieszaninach reakcyjnych dla oznaczeń aktywności kinazowej badanych białek?

Druga publikacja wchodząca w zakres rozprawy doktorskiej (Duszyn i wsp. 2022) zawiera wyniki badań wskazujące, że rekombinowane białko GUCD1 z *Brachypodium distachyon* wykazuje aktywność cyklazy guanylanowej. Ponadto Doktorantka wykazała, że traktowanie kłosownicy dwukłosowej *Fusarium pseudograminerum* wpływa na ekspresję genów kodujących dwa białka, które właśnie zostały opisane przez Doktorantkę, o aktywności cyklazy guanylanowej, zawartość cGMP i fitohormonów takich jak kwas jasmonowy, salicylowy i abscysynowy.

Również mam kilka pytań do wyników zaprezentowanych w tej publikacji:

- 1) Na Figurze 1A ścieżka 2 przedstawia analizę przeprowadzoną metodą Western blot z użyciem przeciwciał anti-GST. Prążek o masie około 55 kDa to, jak podaje Doktorantka, GST-BdGUCD1. Prążek poniżej to, jak się domyślam, GST. W części publikacji opisującej zastosowane metody, jak i w legendzie do tej Figury 1 podano, że mieszanina reakcyjna zawierała 5 μ g białka. Poproszę zatem o doprecyzowanie informacji, czy do oznaczania



aktywności stosowano frakcje przedstawione na Figurze 1A ścieżka 2? Jeśli tak, dlaczego nie pokuszono się na odcięcie i „odpłukanie” GST?

- 2) Kolejną kwestią, którą proszę doprecyzować jest aktywność badanego białka jako cyklazy adenylanowej i guanylanowej zaprezentowanej na Figurze 1B, C i D. Czy wyraźnie niższa aktywność BdGUCD1 jako cyklazy guanylanowej i adenylanowej, pokazana na Figurze 1B, niż aktywność widoczna na Figurze 1C i 1D wynika z tego, że mieszanina reakcyjna (część B) zawierała jednocześnie 1 mM GTP i 1 mM ATP?
- 3) Proszę również o uszczegółowienie danych dotyczących wyznaczania V_{max} i K_m zarówno dla GTP i ATP. W jakim zakresie stężeń substratów i w ilu punktach czasowych oznaczano ilość powstałych produktów?
- 4) Na stronie 4 publikacji 2 Doktorantka podaje, że badane białko BdDUCD1 ma większe powinowactwo do GTP niż ATP. Jednakże wartości K_m dla GTP wynosi 0,73 mM, a dla ATP 0,32 mM. Wartości te mówią jednak o większym powinowactwie do ATP. Poproszę o komentarz Doktorantki – jakie dane były brane pod uwagę wysuwając taki wniosek?
- 5) Pierwszym punktem czasowym jaki brano pod uwagę podczas badań nad wpływem infekcji *Fusarium*, był punkt po 24 godzinach od infekcji. Zarówno ilość cGMP, ekspresja genów obu badanych cyklaz guanylanowych, jak i poziom kwasu jasmonowego i salicylowego był najwyższy. Czy brano pod uwagę krótszy termin traktowania roślin patogenem, np. po 12 godzinach? Wyniki te mogłyby dostarczyć informacji na temat szybkiej odpowiedzi na badany czynnik stresowy.
- 6) W publikacji 2, czy też w polskojęzycznym opracowaniu, zabrakło mi podsumowania np. w postaci uproszczonego schematu na którym Doktorantka uwzględniłaby dane literaturowe i badane elementy szlaku transdukcji sygnału wywołanego w odpowiedzi na *Fusarium pseudograminarium* u *Brachypodium distachyon* i jednocześnie podsumowanie to wskazywałoby na rolę cyklicznego GMP w odpowiedzi na stres biotyczny wywołany przez *Fusarium pseudograminearum* u kłosownicy dwukłoskowej. Zachęcam Doktorantkę do takiego podsumowania podczas publicznej obrony.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Marii Duszyn oceniam bardzo wysoko, a pytania czy drobne zastrzeżenia które sformułowałam w niniejszej recenzji w żadnej mierze nie umniejszają wysokiej wartości naukowej zaprezentowanych wyników, lecz są elementem naukowej dyskusji, która zapewne w pełni będzie mogła być zrealizowana podczas publicznej obrony ocenianej pracy. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marii Duszyn spełnia ustawowe wymogi określone dla prac doktorskich stanowiąc bardzo ważną pozycję w badaniach nad identyfikacją białek roślinnych o aktywności cyklaz guanylanowych. Wnoszę tym samym do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki



Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Marii Duszyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje ponadto do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Marii Duszyn stosowną nagrodą. Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie.

1. Badania prowadzone przez mgr Marię Duszyn doprowadziły do identyfikacji dwóch białek (BdPepR2 i BdGUCD1) o aktywności cykazy guanylanowej u *Brachypodium distachyon* (publikacja 1 i 2). Jak do tej pory, u roślin jednoliściennych znane były tylko dwa białka o aktywności cykazy guanylanowej. Zatem zidentyfikowanie dwóch kolejnych białek jest znaczącym wkładem w naszą wiedzę o roślinnych cyklazach.
2. Dzięki badaniom z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i przeniesieniu ich rezultatów do badań *in vitro*, poszerzono wiedzę na temat składu aminokwasowego centrum aktywnego odpowiedzialnego za syntezę cGMP u kinazy BdPepR2 należącej do klasy transmembranowych receptorów LRR-RLK (publikacja 1). Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają wskazać kinazę BdPepR2 jako białko o podwójnej aktywności – znanej wcześniej kinazowej i opisaniej przez Doktorantkę – cykazy guanylanowej.
3. Obie wyżej wymienione cykazy scharakteryzowano pod kątem kinetycznym katalizowanych reakcji syntezy cGMP (publikacja 1 i 2).
4. Doktorantka dowiodła, że stres biotyczny wywołany przez *Fusarium pseudograminearum* powoduje zmiany w ekspresji genów kodujących BdPepR2 i BdGUCD1.
5. O wysokiej randze uzyskanych wyników świadczy współczynnik oddziaływania (IF) publikacji, który łącznie dla dwóch artykułów wynosi 13,256.

Małgorzata Pietrowska-Borek