

Dr hab. Urszula Krasuska, prof. SGGW  
Katedra Fizjologii Roślin  
Instytut Biologii  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa  
e-mail: urszula\_krasuska@sggw.edu.pl

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

Prawidłowy wzrost i rozwój roślin wymaga sprawnych reakcji na zmieniające się warunki otoczenia. Istotnym elementem komunikacji roślina-środowisko są wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe, wykorzystujące szereg cząsteczek stanowiących przekaźniki informacji, do których zalicza się również cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan (cGMP). Związek ten powstaje z guanozynotrójfosforanu (GTP) w wyniku reakcji katalizowanej przez cyklazy guanylowe (GC). Enzymy te powszechnie dzieli się na dwie grupy: rozpuszczalne GC, zlokalizowane w cytozolu oraz błonowe GC, różniące się między sobą budową i mechanizmami aktywności katalitycznej. Pomimo, że GC biorą udział w syntezie cGMP, to ich funkcje fizjologiczne są odmienne, właśnie ze względu na różnicę w lokalizacji i uruchamianiu odmiennych ścieżek sygnałowych. Przekazywanie informacji poprzez cGMP jest przerywane w wyniku aktywności fosfodiesteraz cyklicznych nukleotydów. U ssaków, metabolizm tego wtórnego przekaźnika jest dobrze scharakteryzowany. Z kolei u roślin (wyższych) wymaga dokładnego poznania, co również wiąże się z izolacją enzymów o aktywności homologicznej do zwierzęcych odpowiedników cyklaz. U roślin wykazano obecność białek posiadających funkcjonalny motyw aminokwasowy (sekwencja 14 aminokwasów) centrum katalitycznego ssaczych GC wraz z potwierdzeniem ich aktywności katalitycznej. Pomimo, że roślinne homologi ssaczych GC różnią się znacząco, dowiedziono, że reszta aminokwasowa w pozycji 1 centrum aktywnego tego enzymu odpowiada za formowanie wiązania wodorowego z

guaniną, za zachowanie specyficzności substratowej dla GTP odpowiada reszta aminokwasowa w pozycji 3, a za stabilizację stanu przejściowego z GTP do cGMP - reszta aminokwasowa w pozycji 14. Dodatkowo, licząc w kierunku C-końca peptydu, 2-3 aminokwasy dalej poza motywem, kolejna reszta aminokwasowa odpowiada za oddziaływania z jonami  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ . Zidentyfikowane roślinne GC są zaangażowane w różne procesy fizjologiczne, związane ze wzrostem i rozwojem oraz w reakcje na stresowe czynniki biotyczne (atak patogenu). Biorąc pod uwagę wzrost zainteresowania działaniem cGMP u roślin (cząsteczka sygnałowa) oraz niewielką ilość danych literaturowych, podjęcie badań lub kontynuacja badań związanych z tym tematem są całkowicie uzasadnione.

### Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch eksperymentalnych, monotematycznych publikacji naukowych, opublikowanych w specjalistycznym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym – International Journal of Molecular Science (MDPI). Prace opublikowano w latach 2021- 2022, sumaryczny tzw. współczynnik wpływu (impact factor) tych publikacji wynosi 12,234, a całkowita wartość według kryteriów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania, stanowi 280 punktów. Oryginalne prace wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej są pracami wieloautorskimi.

Artykuł I (5 współautorów): Duszyn i wsp., 2021. In Vitro Characterization of Guanylyl Cyclase BdPepR2 from *Brachypodium distachyon* Identified through a Motif-Based Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6243. <https://doi.org/10.3390/ijms22126243>.

Artykuł II (5 współautorów): Duszyn i wsp., 2022. BdGUCD1 and Cyclic GMP Are Required for Responses of *Brachypodium distachyon* to *Fusarium pseudograminearum* in the Mechanism Involving Jasmonate. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2674. <https://doi.org/10.3390/ijms23052674>.

Mgr Maria Duszyn jest pierwszym autorem każdej z prac i jednocześnie autorem korespondencyjnym (istotny nadzór nad procesem publikacyjnym). Zgodnie z załączonymi oświadczeniami wszystkich autorów obu publikacji, udział Doktorantki oszacowano na 50 % (I artykuł) i 65 % (II artykuł). Istotność udziału Autorki nie budzi wątpliwości. Znaczącym wkładem w opublikowanie prac mgr Marii Duszyn było przygotowanie koncepcji pracy, realizacja doświadczeń, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, a także przygotowywanie manuskryptów do publikacji. Podstawą finansowania badań, których wyniki tworzą istotę niniejszej rozprawy doktorskiej był projekt Narodowego Centrum Nauki (PRELUDIUM 2018/29/NZ9/00812) pt.

„cGMP jako cząsteczka koordynująca procesy sygnalizacyjne uruchamiane w komórkach *Brachypodium distachyon* na skutek infekcji *Fusarium pseudograminearum*”. Doktorantka była kierownikiem projektu.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej ściśle wiąże się z badaniami realizowanymi pod kierunkiem prof. dr hab. Adrian Szmida-Jaworskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została opatrzona w komentarz w języku polskim, na który składa się wprowadzenie, podsumowanie i wnioski, spis najważniejszych wyników uzyskanych w czasie badań oraz bibliografia (47 pozycji literaturowych dobranych prawidłowo). Cytowane prace pochodzą z różnych lat, również Doktorantka uwzględniła najnowszą literaturę naukową. Dobre opanowanie z fachową literaturą potwierdza fakt, że mgr Maria Duszyńska jest współautorką (i jednocześnie pierwszym autorem) pracy przeglądowej, związanej z działaniem cyklicznych nukleotydów, opublikowanej w 2019 r w *Journal of Plant Physiology*. Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera również streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, kopie opublikowanych artykułów naukowych i oświadczenia współautorów dotyczące procentowego udziału w danej publikacji. We wprowadzeniu, Doktorantka zawarła główny cel prac naukowych stanowiących podstawę opisywanych badań w niniejszej rozprawie. Biorąc powyższe informacje pod uwagę, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami (Dziennik Ustaw 2017, poz. 1789, art. 13, punkt 4).

### **Ocena merytoryczna**

Temat niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy udziału cGMP w reakcji kłosownicy dwukłoskowej (*Brachypodium distachyon*) na stres biotyczny wywołany przez *Fusarium pseudograminearum*. Doktorantka w swoich badaniach porusza istotny problem związany z mechanizmami reakcji obronnych roślin jednoliściennych, wynikających z porażania przez patogeny i prowadzących do rozwoju choroby fuzaryjnej zwanej zgorzelą węzła krzewienia. Choroba ta jest szczególnie dotkliwa, również dla ludzi, gdyż prowadzi do strat plonu w uprawach zbóż. Doktorantka podjęła się odpowiedzi na pytanie o rolę GC w reakcji kłosownicy dwukłoskowej na stres. Interpretacja danych uzyskanych podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej pozwoliła Autorce określić lokalizację analizowanych GC (rozpuszczalna, cytozolowa BdGUCD1 i błonowa BdPepR2), funkcję cyklicznych nukleotydów i zależności przyczynowo - skutkowe pomiędzy

cyklazami, cyklicznymi nukleotydami i wybranymi hormonami stresowymi. Wykorzystany w badaniach materiał doświadczalny spełnia funkcje rośliny modelowej („modelowa trawa”), ponieważ kłosownica dwukłoskowa, poza tym że ma krótki cykl życiowy i niewielkie rozmiary, charakteryzuje się stosunkowo małym genomem jądrowym, o niewielkiej zawartości sekwencji powtarzalnych i składzie genów zbliżonym do tych, które posiadają istotne gatunki zbóż i traw o charakterze użytkowym. Ponadto, wykazano, że zmiany w transkryptomie kłosownicy dwukłoskowej mają podobny profil do zmian obserwowanych u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*). Doktorantka powiązała reakcję obronną badanej rośliny na porażenie patogenem z kontrolną funkcją cGMP. Mgr Maria Duszyn podjęła się charakterystyki białka BdPepR2, które należy do klasy transbłonowych receptorów zawierających powtórzenia bogate w leucynę (LRR) typu kinazy (LRR-RLK), jest ortologiem białka wyizolowanego z rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) AtPepR1 i ze zwartnicy (*Hippeastrum hybridum*). Aktywność *in vitro* rekombinowanego białka BdPepR2, odpowiadającą aktywności znanych CG zweryfikowano eksperymentalnie. W niniejszej pracy Doktorantka skupiła swoją uwagę na 14-sto aminokwasowym regionie centrum katalitycznego tego enzymu, a konkretnie na składzie reszt aminokwasów domeny katalitycznej. Sekwencja aminokwasowa tego regionu u eksperymentalnie przetestowanych GC (uzyskanych z różnych gatunków roślin) jest przedstawiana następująco: [RKS][YFW][CTGH][VIL][FV]X[DNA]X[VIL]X{4}[KR], z kolei Autorka w rozprawie doktorskiej (strona 9) przedstawiła jako: [RKS][YFW][CTGH][VIL][FV]G[DNA]X[VIL]X{4}[KR]. Proszę o wyjaśnienie różnicy w sekwencjach podanych powyżej, w odniesieniu do wprowadzenia konkretnego aminokwasu w miejsce oznaczane jako X.

W artykule I Doktorantka dowiodła, że BdPepR2 wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej z białkiem rzodkiewnika AtPepR2 (38,17 %) i AtPepR1 (36,26 %), które mają potwierdzoną aktywność GC. Ponadto, w pozycji 14 motywu GC, odpowiedzialnej za wiązanie grupy acylowej GTP i stabilizację procesu przekształcenia substratu do cGMP występuje metionina (Met, M). Jest to nowatorskie odkrycie. Biorąc pod uwagę wyniki niniejszej pracy, aminokwas ten może być uwzględniany jako potencjalnie występujący w centrum katalitycznym enzymu, podczas analiz związanych z identyfikacją nowych GC. W celu weryfikacji czy M w pozycji 14 centrum katalitycznego BdPepR2 ma istotne znaczenie dla aktywności enzymu, zaprojektowano następujące białka: BdPepR2M1066A i BdPepR2M1066R, zastępując M1066 arginina (Arg, R) lub alaniną

(Ala, A). Stosując technikę LC-MS/MS w celu określenia zawartości powstającego cGMP, wytwarzanego przez białko dzikie jak i mutanty, wykazano, że BdPepR2M1066A charakteryzowało się zdecydowanie obniżoną aktywnością w stosunku do kontroli. Z kolei aktywność BdPepR2M1066R różniła się zaledwie w niewielkim stopniu porównując z kontrolą. Jak wspomniano w artykule I, dodatni ładunek reszt aminokwasowych lizyny (K) i R mają znaczenie w katalizie. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić potencjalne, biologiczne znaczenie wprowadzenia M (niepolarna reszta) w pozycję 14 domeny katalitycznej GC? Na czym polegają różnice w mechanizmie molekularnego dokowania GTP w centrum GC, które zawiera M a nie K? Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić skąd bierze się wyższa aktywność GC zawierającej M w stosunku do białka zawierającego wzorcowe centrum katalityczne?

Wykazano również, że M w białku BdPepR2 nie zmienia typowej aktywności GC, a GTP jest preferencyjnie wykorzystywany jako substrat w stosunku do ATP. W dalszej części artykułu mgr Maria Duszyn dowiodła, że za oddziaływania, głównie z jonami  $Mn^{2+}$  odpowiada reszta kwasu asparaginowego poza 14-aminokwasowym konserwatywnym motywem centrum katalitycznego BdPepR2. Inne białka rekombinowane GC, takie jak AtWAKL-10, AtBRI1, At PNP-R1 czy HpPepR1 wykazują wyższą aktywność w obecności  $Mg^{2+}$  niż  $Mn^{2+}$ . Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić zmiany w preferencjach tych jonowych kofaktorów u GC izolowanych z różnych gatunków roślin?

Wspomniano, że aktywność GC BdPepR2 jest niższa niż PnGC1 i HpGC1, co najprawdopodobniej wiąże się z lokalizacją analizowanego białka i ewentualnym występowaniem jako multidomenowy kompleks białkowy (białka wielofunkcyjne – „moonlighting proteins”). Czy Doktorantka mogłaby zaproponować potencjalne funkcje fizjologiczno-biochemiczne BdPepR2 poza wykazaną aktywnością GC (i kinazy) u kłosownicy dwukłoskowej w reakcjach roślin innych niż na stres biotyczny?

BdPepR2 charakteryzuje również aktywność kinazy serynowo/treoninowej, co czyni to białko cząsteczką dwufunkcyjną. Czy Doktorantka mogłaby wskazać jakie potencjalne znaczenie fizjologiczne ma hamowanie aktywności kinazowej przez cGMP u kłosownicy dwukłoskowej?

Z kolei wyniki badań opublikowanych w drugim artykule pozwoliły zweryfikować hipotezę badawczą dotyczącą udziału dwóch cyklaz (BdGUCD1 oraz BdPepR2) jak i cGMP w reakcji kłosownicy dwukłoskowej na infekcję *Fusarium pseudograminearum*. Brakuje mi jednoznacznego określenie, jaka część rośliny była analizowana, poproszę o komentarz. Jeżeli cała roślina, to czy

mogło mieć to wpływ na uzyskane wyniki? Czy Doktorantka reakcje na stres biotyczny analizowała w aspekcie reakcji nadwrażliwości (HR), czy reakcji systemicznej (SIMR)?

Doktorantka jako cel obrała sobie potwierdzenie funkcji cGMP, który stanowi cząsteczkę uruchamiającą kaskadę obronną i aktywuje szlak oddziaływań powiązany z fitohormonami, takimi jak jasmoniany (JA), kwas salicylowy (SA) i kwas abscysynowy (ABA). BdGUCD1 (Guanylyl Cyclase Domain Containing 1) wykazuje wysokie podobieństwo swojej sekwencji aminokwasowej z innymi GC roślin jednoliściennych (np. jęczmienia czy pszenicy). Analiza sekwencyjna tego białka wykazała, że nie zawiera ono charakterystycznego, 14-aminokwasowego motywu (wykazanego dla BdPepR2) w centrum aktywnym i nie jest to odosobniony przypadek w świecie roślin. Podobny brak wyżej opisanej sekwencji w strukturze wykazano dla białek wilca wielkokwiatowego PnGC1 i zwartnicy HpGC1. Białka te scharakteryzowano wcześniej, w wyniku badań prowadzonych w zespole Doktorantki, prowadzonych w aspekcie reakcji roślin na patogen oraz w reakcji na sygnał świetlny. Brak takiego 14-aminokwasowego motywu u BdGUCD1 potwierdza hipotezę, że u roślin istnieją inne (różne) białka posiadające domeny odpowiadające za typową aktywność GC, co z kolei może znacząco wpłynąć na planowanie eksperymentów dotyczących tego zagadnienia. W drugiej pracy Doktorantka opisała aktywność BdGUCD1 jako cyklazy, zarówno w obecności GTP/ATP oraz  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ . W przypadku zastosowania jednocześnie tylko jednego substratu (tylko GTP lub ATP) enzym ten wykazywał wyższą aktywność GC. Jednak, jeżeli w mieszaninie reakcyjnej były wykorzystane oba substraty to aktywność cyklazy adenylowej (AC) była zdecydowanie niższa. Doktorantka zjawisko to wytłumaczyła dualnością katalizowanych reakcji BdGUCD1, z wyższą preferencją substratową w stosunku do GTP. Ponadto aktywność GC BdGUCD1 wymaga obecności  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ , podczas gdy aktywność AC tylko jonów  $Mn^{2+}$ . Czy Doktorantka wie jaki wpływ ma reakcja roślin na stres biotyczny w aspekcie zmian stężenia w komórkach ww. jonów?

Ponadto, mgr Maria Duszyn skupiła się w swoich badaniach na wykazaniu roli cyklicznych nukleotydów oraz BdGUCD1 i BdPepR2 w reakcjach na stres (biotyczny). Zmiany poziomu transkryptów genów kodujących te białka jak i stężenie cGMP i cAMP były mierzone w różnych punktach czasowych po zainfekowaniu rośliny *F. pseudograminearum*. Doktorantka wykazała zmiany stężenia cGMP u kłosownicy, co powiązała z rolą tego związku w reakcjach obronnych badanej rośliny (udział cGMP w fazie alarmu reakcji na stres). W dalszej części rozprawy doktorskiej, w części Podsumowanie i wnioski, mam wrażenie, że doszło do pomyłki lub opisu zbyt

daleko idącego skrótu myślowego (str. 16). „Aby potwierdzić fakt, że za odnotowane zmiany odpowiadają cykazy nukleotydów purynowych testowałam zmiany w poziomie dwóch enzymów syntetyzujących cGMP *BdPepR2* oraz *BdGUCD1*.” Proszę wyjaśnić, czy analizowany był poziom transkryptów kodujących te białka czy zawartość/iłość konkretnych enzymów? W artykule drugim nie znalazłam informacji o stężeniu tych białek w materiale roślinnym, za to opis bardzo ciekawych wniosków dotyczących zmian poziomu transkryptów w tkankach po infekcji *F. pseudograminearum*.

Doktorantka zbadala zmiany stężenia hormonów takich jak ABA, JA i SA i wykazała znaczny, ale i przejściowy wzrost ABA po trzecim dniu od infekcji. Czy Doktorantka mogłaby określić mechanizm potencjalnego zaangażowania ABA w zmiany potencjału redoks w swoim modelu doświadczalnym? W jaki sposób cGMP mógłby oddziaływać ze szlakiem JA, czy coś wiadomo Doktorantce na ten temat?

**Podsumowując** stwierdzam, że wyniki badań Doktorantki stanowią kontynuację i istotne uzupełnienie tematyki badawczej swojego macierzystego zespołu. Mgr Maria Duszyn w toku realizacji swojej pracy doktorskiej scharakteryzowała GC o unikatowym składzie aminokwasów centrum katalicznego, z grupy białek wielofunkcyjnych. Ponadto wykazała aktywność GC i AC kolejnego białka (*BdGUCD1*), biorącego udział w reakcji rośliny na stres biotyczny. Powiązała zmiany w stężeniu cGMP ze zmianami zawartości fitohormonów stresowych, zwłaszcza wpływ tego cyklicznego nukleotydu na JA. Dorobek naukowy Doktorantki świadczy o posiadanej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i wskazuje na stałe doskonalenie warsztatu w zakresie biologii (biotechnologii) eksperymentalnej roślin.

### **Uwagi szczegółowe**

Recenzowaną rozprawę doktorską pod kątem merytorycznym oceniam bardzo dobrze. Wprowadzenie, podsumowanie i wnioski zostały napisane w zasadzie poprawnym językiem. Jednakże, Autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów, niezręczności językowych i drobnych potknięć redakcyjnych. Błędy edytorskie zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej nie umniejszają całkowitej wartości pracy, ale chciałabym dodać, że również liczy się forma, a nie tylko treść. Brakowało polskich nazw wymienianych w rozprawie doktorskiej roślin.

Przytoczę tylko kilka przykładów innych potknięć redakcyjnych:

- brak konsekwencji stosowania pełnej nazwy związku po raz pierwszy, a po wprowadzeniu skrótu używanie tych skrótów w dalszej części pracy;
- zastąpienie terminu „poziom”, bardziej odpowiednim terminem „stężenie”, zwłaszcza w przypadku analizowanych hormonów czy metabolitów;
- w regulacji kiełkowania nasion *Arabidopsis*, a nie „u *Arabidopsis*” (str. 6);
- Błąd gramatyczny – ostatnie zdanie pierwszego akapitu na str. 9;
- nie można porównać centrum katalitycznego do danych literaturowych (str. 13).
- „co może sugerować na różnice” (str. 14);
- „analiza kinetyki enzymu” (str. 15).

Z drugiej strony, chciałabym podkreślić istotne fakty wpływające na całokształt oceny rozprawy doktorskiej mgr Marii Duszyn. Uzyskanie finansowania badań, które są podstawą rozprawy doktorskiej, przez NCN oraz opublikowanie uzyskanych wyników wiązało się z procesem wnikliwej, ale pomyślniej recenzji wielu różnych recenzentów. Istotność tematu, realizacja celów i weryfikacja postawionych hipotez, zastosowanie technik analitycznych oraz przeprowadzenie analizy statystycznej nie budzą wątpliwości, że badania te są nowatorskie, potrzebne, a ich kontynuacja – wskazana. Doktorantka stale podnosi swoje kompetencje naukowe o czym świadczą publikacje, których jest współautorką, a współudział w opublikowaniu prac przeglądowych świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, pozytywnie oceniam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Marii Duszyn, powstałą w oparciu o monotematyczne publikacje naukowe oraz stwierdzam, że w pełni spełnia ona wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669). Wyniki badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej są nowatorskie i bardzo interesujące. Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej





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

Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną prowadzonych badań, w tym dobór technik badawczych, nakład pracy Doktorantki w pozyskanie finansowania badań i opublikowanie uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Warszawa, dnia 30. 06. 2022r.

Urszula Krasuska

**Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Instytut Biologii  
Katedra Fizjologii Roślin  
Dr hab. Urszula Krasuska, prof. SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa  
+48 22 59 325 10  
urszula\_krasuska@sggw.edu.pl  
www.sggw.pl