

Warszawa, 17.07.2025 r.

prof. dr hab. Tomasz Sarnowski

Kierownik

Pracowni Regulacji Ekspresji Genów

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

tsarn@ibb.waw.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Perkowskiej
pt. „Elucidating the role and mechanism of the regulatory network of
genes encoding dioxygenases potentially involved in plant adaptation to
terrestrial environments”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Izabeli Perkowskiej pt. „**Rola i mechanizm regulacji ekspresji genów kodujących dioksygenazy w adaptacji roślin do wzrostu i rozwoju w warunkach panujących na lądzie**” została wykonana w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed (Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej (promotor) i dr Anny Ihnatowicz (promotor pomocniczy).

Ocena formalna

Rozprawa składa się z wykazu projektów, z których finansowane były badania w niej ujęte, spisu treści, streszczeń w języku angielskim i polskim wykazu skrótów, autoreferatu (32 strony) podzielonego na wstęp, cele, omówienie wyników, podsumowanie i spis literatury oraz kopii trzech artykułów (opublikowanych w latach 2021-2024), w których przedstawiono wyniki a także kopii dwóch nierecenzowanych manuskryptów będących w trakcie przygotowania, jak również oświadczeń współautorów publikacji i życiorysu Doktorantki. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim.

Rezultaty będące przedmiotem dysertacji ujęto w następujących pracach opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR):

1. Perkowska, I., Siwinska, J., Olry, A., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021). Identification and Quantification of Coumarins by UHPLC-MS in *Arabidopsis thaliana* Natural Populations. *Molecules*, 26(6), 1804
2. Perkowska, I., Potrykus, M., Siwinska, J., Siudem, D., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021). Interplay between coumarin accumulation, iron deficiency and plant resistance to *Dickeya* spp. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6449
3. Ihnatowicz, A., Siwinska, J., Perkowska, I., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Olry, A. (2024). Genes to specialized metabolites: accumulation of scopoletin, umbelliferone and their glycosides in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 806

oraz dwóch nieopublikowanych manuskryptach oznaczonych w dysertacji odpowiednio nr 4 i nr 5:

4. Perkowska, I., Olry, A., Barrit, T., Dobek, A., Magot, F., Charles, C., Januchowska, A., Siwinska, J., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2025a) Elucidating the role and regulatory mechanism of *Arabidopsis thaliana* DOXC21-A, its NAT and DOXC21-B in plant adaptation to terrestrial conditions

5. Perkowska, I., Siwinska, J., Dobek, A., Magot, F., Grosjean, J., Hehn, A., Olry, A., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2025b) Arabidopsis UGT79B9-mediated crosstalk between secondary metabolism, root exudation and plant responses to osmotic stress and iron deficiency.

Manuskrypty te zostały dość niefortunnie oznaczone datami 2025a i 2025b, co mylnie może zostać zinterpretowane przez czytelnika jako prace opublikowane. Dodatkowo sugerują to ostatnie akapity streszczeń w języku angielskim i polskim a przecież nie wiadomo jak potoczy się los tych manuskryptów i kiedy zostaną opublikowane.

W związku z ujęciem nieopublikowanych manuskryptów rozprawa jest do pewnego stopnia przygotowana w sposób niestandardowy i stanowi hybrydę pomiędzy monografią a rozprawą prezentującą cykl prac opublikowanych w czasopismach naukowych, jej długość (242 strony) odbiega znacząco od długości standardowych rozpraw doktorskich z tej dziedziny. **Rozprawa zawiera wszystkie elementy niezbędne do jej oceny.**

Pracę nr 1 opublikowano w czasopiśmie z kwartyłu drugiego, natomiast prace 2 i 3 opublikowane zostały w czasopismach z pierwszego kwartyłu według rankingu JCR, są to prace eksperymentalne wieloautorskie. W dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej istotny wkład w ich powstanie, a w publikacji nr 3 jest trzecim autorem. Prace są spójne tematycznie.

Spis literatury prezentuje prace, które zostały prawidłowo dobrane a większość cytowanych publikacji pochodzi z ostatnich 10 lat.

Rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Perkowskiej dotyczy bardzo istotnego zagadnienia- mechanizmów adaptacji roślin lądowych do niekorzystnych warunków środowiskowych takich jak stres biotyczny i abiotyczny w kontekście regulacji metabolizmu wtórnego. W pracy Doktorantka zastosowała bardzo szerokie podejście łączące genetykę, metabolomikę, transkryptomikę, filogenetykę oraz analizę fenotypową mające na celu lepsze zrozumienie roli biosyntezy kumaryn i regulacji szlaku biosyntezy fenylopropanoidów w odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiska. Takie podejście jest wartościowe a uzyskane wyniki mają dużą wagę merytoryczną i są istotne w kontekście badań podstawowych a także mają duży potencjał aplikacyjny.

Mgr. Perkowska sformułowała cztery następujące główne cele badawcze swojej pracy:

1) To investigate the correlation between accumulation of coumarins, plant genotypes (natural accessions and mutants), and environmental stress factors (including Fe availability and pathogen defense) to gain deeper insights into the metabolic adaptations and stress response in *Arabidopsis thaliana*. **2)** Comprehensive analysis of the regulatory network controlling the switch between coumarin and lignin biosynthesis in *A. thaliana* under osmotic and low pH stress using integrative transcriptomic and metabolomic approaches. **3)** Functional characterization of two *A. thaliana* dioxygenases DOXC21-A, its NAT, and DOXC21-B potentially involved in ortho-hydroxylation of coumarin and lignin precursors. **4)** Characterization of *A. thaliana* UDP-glucosyltransferase 79B9 involved in Fe deficiency and osmotic stress response.

Pierwszy cel badawczy został osiągnięty poprzez wykazanie korelacji pomiędzy akumulacją kumaryn, genotypami roślin i czynnikami stresowymi z wykorzystaniem modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*. Wyniki badań opublikowane zostały w trzech publikacjach naukowych.

W pracy nr 1 wykazano zmiany w obecności kumaryn w 28 naturalnych populacjach *Arabidopsis* co pozwoliło na odkrycie zależności pomiędzy metabolizmem, zróżnicowaniem genetycznym i czynnikami środowiskowymi.

Publikacja nr 2 dotyczyła zależności pomiędzy dostępnością żelaza i akumulacją kumaryn a odpornością *Arabidopsis* na zakażenie patogenem. Badania te doprowadziły m.in. do identyfikacji zależności funkcjonalnej pomiędzy metabolizmem wtórnym- biosyntezą kumaryn, dostępem pożywienia i reakcją obronną *Arabidopsis* na stres biotyczny.

W publikacji nr 3, Doktorantka badała zawartość kumaryn w trzech odmianach *Arabidopsis* pochodzących z różnych warunków środowiskowych w kontekście specyficzności tkankowej oraz warunków wzrostu a także uczestniczyła w identyfikacji czynników genetycznych odpowiedzialnych za obserwowane różnice w występowaniu kumaryn.

Badania realizowane w ramach celu badawczego nr 1 uważam za bardzo wartościową część pracy znacząco rozszerzającą wiedzę a także otwierającą możliwości prowadzenia dalszych badań związanych z realizacją pozostałych założeń rozprawy doktorskiej, tym bardziej, że uzyskane wyniki zostały opublikowane w trzech publikacjach naukowych.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji pozostałych trzech celów badawczych nie zostały jeszcze opublikowane i w rozprawie zaprezentowane są w postaci dwóch manuskryptów oraz krótkiego podsumowania.

W ramach realizacji celów nr 2 i 3 Doktorantka skupiła się na identyfikacji molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za kontrolę równowagi pomiędzy biosyntezą kumaryn i lignin w warunkach stresu abiotycznego a także na charakterystyce dwóch dioksygenaz: DOXC21-A (i jej naturalnego transkryptu antysensownego NAT) oraz DOXC21-B, które potencjalnie są zaangażowane w orto-hydroksylację prekursorów kumaryn. W badaniach wykorzystano analizy transkryptomiczne, fenotypowe oraz metabolomiczne. Badania doprowadziły do lepszej charakterystyki funkcjonalnej tych enzymów oraz NAT jednego z nich a także, jak doktorantka napisała na stronie 28, eksploracji molekularnego mechanizmu regulacji zależnego od NAT w który wchodzi „transcriptional interference, RNA splicing modulation, and chromatin remodeling”. Remodeling chromatyny w tym kontekście zainteresował mnie szczególnie. **W związku z tym bardzo proszę Doktorantkę o rozszerzenie zagadnienia i informację w jaki sposób remodeling chromatyny jest zaangażowany w zależną od NAT regulację.**

Bardzo proszę również o komentarz dotyczący braku aktywności dioksygenazowej rekombinowanych DOXC21-A i DOXC21-B co zostało opisane w części 7.2 manuskryptu nr 4 str. 145 a w szczególności o przedyskutowanie jaka może być rzeczywista rola tych białek w kontekście uzyskanych wyników, gdyż próba dyskusji tego intrygującego i ciekawego wyniku na str. 148 w mojej ocenie nie jest wystarczająca.

Manuskrypt nr 4 jest niezwykle obszerny i w mojej ocenie powinien zostać podzielony na dwie części. Najprawdopodobniej pozwoli to na sprawniejszą publikację tych wartościowych danych.

Ostatni cel rozprawy dotyczył charakterystyki funkcjonalnej domniemanej UDP-glikozylotransferazy 79B9, która we wcześniejszych badaniach została wytypowana jako enzym mogący brać udział w biosyntezie kumaryn. W badaniach wykorzystany został szeroki repertuar metod i pomiarów a także linie z mutacjami jak i linie z nadekspresją oraz komplementacją mutacji. **Bardzo proszę Doktorantkę o komentarz na temat sposobu weryfikacji poprawności linii skomplementowanej UGT79B9. Czy poza analizą obecności transkryptu była przeprowadzona szczegółowa charakterystyka fenotypowa potwierdzająca komplementację mutacji *ugt79b9*?**

Zaintrygował mnie brak zmian w zawartości kumaryn po inaktywacji UGT79B9 zarówno w warunkach kontrolnych jak i u roślin poddanych działaniu stresu. Bardzo proszę o stosowny

komentarz szczególnie w kontekście proponowanej zależności pomiędzy biosyntezą kumaryn i odpowiedzią na stres.

Proszę również Doktorantkę o przedyskutowanie powodów niemożności określenia aktywności enzymatycznej nadeksprymowanego białka UGT79B9, co zostało w sposób lakoniczny zaznaczone w manuskrypcie nr 5 jako „data not shown”.

Badania prezentowane w manuskrypcie nr 5 w mojej ocenie mają duży potencjał i najprawdopodobniej zostaną opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie, jednakże w opisie tej części osiągnięcia Doktorantki na str. 30 zabrakło rysunku podsumowującego osiągnięcie, który wizualizowałby założenia i podejście badawcze, jak to miało miejsce w przypadku opisów pozostałych celów badawczych.

Podsumowując, w mojej ocenie Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione sobie cele badawcze a oceniana rozprawa doktorska stanowi wartościowe opracowanie poszerzające wiedzę na temat zależności pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym, odpowiedzią na stres środowiskowy i kontrolą metabolizmu u *Arabidopsis*.

Uwagi oraz pozostałe pytania do rozprawy

Trzy z przedstawionych w rozprawie artykułów zostały już opublikowane co oznacza, że były one poddane krytycznej ocenie recenzentów, których uwagi zostały w sposób satysfakcjonujący wyjaśnione. Jednakże, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie **jaki może być wpływ sacharozy na szlak biosyntezy kumaryn i akumulację ich metabolitów a także na odpowiedź *Arabidopsis* na stres biotyczny w kontekście metabolizmu wtórnego.**

Natomiast po lekturze dwóch nieopublikowanych manuskryptów nasunął mi się szereg pytań:

Manuskrypt nr 4

1. Rys nr 5 str. 27 oraz opis metod w manuskrypcie nr 4 wskazuje na to, że próbki, które zostały poddane analizie transkryptomicznej i metabolomicznej zbierane były w różnych punktach czasowych. Jaka była przesłanka do takiego zaprojektowania tego eksperymentu i jaki to może mieć wpływ na integrację danych z obu tych analiz? Czy obserwowane zmiany transkryptomiczne były weryfikowane w punkcie czasowym odpowiadającym przeprowadzonej analizie metabolomicznej?

2. Przeprowadzona analiza transkryptomyczna doprowadziła do identyfikacji znaczącej liczby genów o zmienionej ekspresji. Bardzo proszę Doktorantkę o zarysowanie głównych szlaków regulacyjnych zależnych od *nat1*, *nat2*, *doxc21-a* w warunkach kontrolnych, tj. bez działania stresu? Jaka jest rola DOXC21-B w kontroli tych szlaków?

3. Jakie mogą być przyczyny niepowodzenia oceny aktywności białek DOXC21-A i DOXC21-B? Czy możliwa jest utrata aktywności wynikająca z warunków izolacji (m.in. renaturacja)?

Manuskrypt nr 5

4. Opis wyników analizy metabolomicznej jest niekompletny str. 216 „The data are not shown and are currently being processed”. **Bardzo proszę o stosowny komentarz.**

5. Uwaga dotyczy manuskryptów nr 4 i 5: dane, które nie są istotne statystycznie nie powinny stanowić podstawy do stwierdzenia, że wskazują one na zmianę cechy, która jest analizowana np. str. 127, 219.

6. Dyskusja manuskryptu nr 5 jest ascetyczna, bardzo proszę o rozwinięcie z uwzględnieniem nowych dróg badań wyznaczonych przez prezentowane wyniki.

7. Manuskrypty nieopublikowane są wieloautorskie a w rozprawie nie zostało wyraźnie zaznaczone, które eksperymenty zostały wykonane przez Doktorantkę. W oświadczeniach jest wyłącznie ogólna informacja o wkładzie Doktorantki. **Bardzo proszę o stosowny komentarz.**

Praca przygotowana jest w sposób staranny jednakże Doktorantka nie ustrzegła się szeregu literówek np. w manuskrypcie nr 5 str. 229 „Supplementary data”, oraz pewnych problemów z formatowaniem (str. 144 rozdział nr 8 a podrozdziały mają nr 7.1 i 7.2). W podpisie do ryciny nr 2 zabrakło wyjaśnienia co oznaczają kolory strzałek.

Bardzo pomocny byłby podsumowujący schemat końcowy w części 7. „Conclusion” na str. 31 z zaznaczeniem najważniejszych osiągnięć Doktorantki, ich znaczeniem i wskazaniem potencjalnych dalszych kierunków badań/dróg wykorzystania. W pracy zabrakło jednoznacznych, wyraźnie sformułowanych wniosków końcowych a przecież doktorant musi umieć sformułować takie wnioski. To bardzo ważne przy prezentacji wyników i aplikacji o przyszłe finansowanie.

Wniosek końcowy

Pomimo szeregu uwag i pytań rozprawę doktorską mgr Izabeli Perkowskiej jednoznacznie oceniam wysoko. Wyniki uzyskane w ramach ocenianej rozprawy zostały opublikowane w trzech artykułach

naukowych a także są ujęte w dwóch manuskryptach, które z pewnością będą opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Cele pracy zostały określone a odpowiednio dobrane metody pozwoliły na ich osiągnięcie. Dodatkowo, Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w tematyce pracy o czym świadczy dobrze opracowany wstęp do rozprawy.

Dane ujęte w rozprawie w znaczącym stopniu rozszerzają wiedzę na temat metabolizmu, biosyntezy kumaryn oraz odpowiedzi *Arabidopsis* na warunki stresowe a rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Podsumowując, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Izabeli Perkowskiej spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed (Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

