

# AUTOREFERAT

Dr Agnieszka Ludwików

---

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Biologii  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Biotechnologii

Poznań 2015

1. Imię i nazwisko: Agnieszka Ludwików

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- |      |  |
|------|--|
| 2001 | dyplom ukończenia studiów magisterskich, na kierunku biologia, w zakresie biologia molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu   |
| 2006 | dyplom doktora w zakresie biologii - biologia molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy „Charakterystyka profilu transkrypcyjnego genomu <i>Arabidopsis thaliana</i> linii Columbia i mutantu <i>abi1</i> w odpowiedzi na stres ozonowy i suszę” |
| 2010 | świadczenie ukończenia studiów Menedżer Projektów Badawczych, Centrum Integracji Europejskiej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  |

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- |              |   |
|--------------|---|
| 2006-obecnie | Adiunkt; Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu |
|--------------|---|

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

**Kierowanie białek do degradacji – identyfikacja i charakterystyka nowego mechanizmu transdukcji sygnału zależnego od fosfatazy białkowej 2C ABI1 u *Arabidopsis thaliana***

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

Osiągnięcie obejmuje cykl trzech prac (dwóch prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej), których łączny współczynnik IF wynosi 15.258; sumaryczna liczba punktów MNiSW - 120. We wszystkich pracach figuruję jako autor korespondencyjny\*.

**Ludwikow A\***, Cieśla A, Kasproicz-Maluśki A, Mituła F, Tajdel M, Gałgański Ł, Ziółkowski PA, Kubiak P, Małecka A, Piechalak A, Szabat M, Górska A, Dąbrowski M, Ibragimow I, and Sadowski J (2014) *Arabidopsis* ABI1 protein phosphatase 2C interacts with type I ACC

synthases and is involved in the regulation of ozone-induced ethylene biosynthesis. *Molecular Plant* 7, 960–976. [IF<sub>2014</sub> 6.337, MNiSW points = 45].

Ludwików A\* (2015) Targeting proteins for proteasomal degradation – a new function of Arabidopsis ABI1 protein phosphatase 2C. *Frontiers in Plant Science* 6: 310. [IF<sub>2014</sub> 3.948, MNiSW points = 40].

Mitula F, Tajdel M, Cieśla A, Kasprowicz-Maluśki A, Kulik A, Babula-Skowrońska D, Michalak M, Dobrowolska G, Sadowski J, and Ludwików A\* (2015) Arabidopsis ABA-activated kinase MAPKKK18 is regulated by protein phosphatase 2C ABI1 and the ubiquitin proteasome pathway. *Plant and Cell Physiology*, doi:10.1093/pcp/pcv146 [IF<sub>2014</sub> 4.931, MNiSW points = 35].

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Proces fosforylacji i towarzysząca jej defosforylacja białek to podstawowy mechanizm sygnalizacji komórkowej. Reakcja ta katalizowana jest przez dwie grupy enzymów: kinazy i fosfatazy białkowe. Kinazy białkowe katalizują przyłączanie reszty fosforanowej do grupy hydroksylowej aminokwasów seryny, treoniny i tyrozyny. Fosfatazy katalizują usuwanie reszty fosforanowej z ufosforylowanych aminokwasów. Ze względu na specyficzność substratową fosfatazy białkowe zostały podzielone na trzy klasy: serynowo-treoninowe (Ser/Thr), tyrozynowe (Tyr) i fosfatazy o podwójnej specyficzności. Natomiast, ze względu na podobieństwo sekwencji i strukturę białka, fosfatazy serynowo-treoninowe podzielono na szereg typów, wyróżniając liczną i zróżnicowaną pod wieloma względami grupę fosfataz białkowych typu 2C (PP2C) (Luan 2003; Schweighofer i in., 2004; Ludwików, 2015). Przedmiotem moich badań są fosfatazy białkowe 2C z grupy A (PP2C grupa A), które stanowią kluczowy element sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA), uczestniczą w regulacji szeregu procesów komórkowych, a także w odpowiedzi na stresowe warunki środowiska (Nishimura i in., 2009; Miyazono i in., 2009). U *Arabidopsis thaliana* w grupie A PP2C wyróżniono dziewięciu członków, ale mianem kluczowych regulatorów w transmisji sygnału ABA uznano fosfatazy białkowe ABI1 i ABI2. Potwierdzono, że białka te funkcjonują jako negatywne regulatory sygnalizacji ABA (Schweighofer i in., 2004; Nishimurai in., 2009;

Miyazono i in., 2009; Fuchs i in., 2013). Zrozumienie mechanizmu ich działania było i wciąż jest priorytetem w badaniach transdukcji sygnału u roślin.

Począwszy od 2009 roku systematycznie publikowane są prace badawcze uszczegóławiające mechanizm transdukcji sygnału ABA z udziałem PP2C z grupy A. Zidentyfikowano rodzinę białek PYR/PYL/RCAR określanych jako receptory ABA, które w odpowiedzi na ABA hamują aktywność fosfatazową PP2C z grupy A umożliwiając transmisję sygnału za pomocą kinaz SnRK2 (Melcher i in., 2009; Miyazono i in., 2009; Miyakawa i in., 2013). Oprócz receptorów ABA, zidentyfikowano także inne czynniki regulujące aktywność fosfatazową PP2C z grupy A. Wśród nich zidentyfikowano nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), który w warunkach *in vitro* odwracalnie hamuje aktywność fosfatazową ABI1 i HAB1 (Meinhard i Grill, 2001; Sridharamurthy i in., 2014). Wiadomo także, że GTPazy Rho-like chronią aktywność fosfatazową ABI1 przed hamującym wpływem receptorów (Li i in., 2012). Ponadto stwierdzono, że peroksydaza glutationowa (GPX3) i kinaza receptorowa FERONIA uczestniczą w regulacji aktywności fosfatazy ABI2 (Miao i in., 2006; Yu i in., 2012).

Ponieważ fosfataza białkowa poprzez swoją aktywność enzymatyczną wydaje się odgrywać nadrzędną rolę w stosunku do innych regulatorów sygnalizacji ABA, wiele grup badawczych skupia swoje badania na identyfikacji partnerów białkowych współdziałających z przedstawicielami PP2C z grupy A w regulacji homeostazy komórkowej. Wśród białek oddziałujących z fosfatazami z grupy A zidentyfikowano czynnik transkrypcyjny (Himmelbach i in., 2002), kinazy białkowe (Guo i in., 2002; Ohta i in., 2003), enzymy szlaku detoksyfikacji reaktywnych form tlenu (Miao i in., 2006), składnik kompleksu remodelującego chromatynę (Saez i in., 2008) oraz kanały jonowe (Brandt i in., 2012). Mnogość partnerów z jakimi oddziałują PP2C podkreśla plejotropowy charakter działania tych fosfataz. Dla części partnerów białkowych PP2C, kontekst w jakim białka oddziałują ze sobą pozostaje niejasny. Pomimo oddziaływania, nie obserwuje się zmian w aktywności enzymatycznej lub biologicznej partnerów białkowych PP2C (Ludwików, 2015). Dlatego w moich badaniach skupiłam się nie tylko na identyfikacji nowych partnerów PP2C, ale przede wszystkim na poznaniu mechanizmów, które prowadzą do składania kompleksów białkowych pełniących istotne biologicznie funkcje. W moich badaniach skupiłam się głównie na analizie funkcjonalnej fosfatazy ABI1.

W nurcie tych badań w pracy *Molecular Plant* (Ludwików i in., 2014) analizowałam rolę fosfatazy białkowej ABI1 w regulacji biosyntezy etylenu u *Arabidopsis thaliana*.

Komunikowanie się sygnalizacji ABA i etylenu podlega szerokim analizom od wielu lat (Ghassemian i in., 2000; Sharp, 2002; Sharp i LeNoble, 2002; Rosado i in., 2006; Ludwików i in., 2009; Trivellini i in., 2011; Thole i in., 2014), natomiast nieznanym był molekularny mechanizm umożliwiający kontrolę biosyntezy etylenu przez ABA. Biosynteza etylenu jest katalizowana przez dwie grupy enzymów: syntazy ACC (ACS) i oksydazy ACC (ACO). Syntazy ACC katalizują konwersję S-adenozylometioniny (SAM) do kwasu 1-aminocyklopropano karboksylowego (ACC). Oksydazy ACC katalizują konwersję ACC do etylenu (Wang i in., 2002). Pomimo, że etylen powstaje podczas prostej dwuetapowej reakcji, jego synteza jest ściśle regulowana na wielu etapach (Liu and Zhang, 2004; Joo i in., 2008; Tsuchisaka i in., 2009; Lyzenga i in., 2012). Analiza transkryptomyczna mutantu typu nokaut w genie *ABI1* (*abi1td*) w warunkach stresu ozonowego, wykonana podczas realizacji mojej pracy doktorskiej ujawniła, że geny, których produkty białkowe zaangażowane są w proces biosyntezy etylenu wykazują spadek poziomu transkrypcji u mutantu *abi1td* w odniesieniu do roślin typu dzikiego (Ludwików i in., 2009). Ta interesująca obserwacja skłoniła mnie do poszukiwania odpowiedzi na pytanie, czy fosfataza *ABI1* w istotny sposób wywiera wpływ na poziom produkcji etylenu w warunkach stresu ozonowego. W toku analiz stwierdziłam, że poziom etylenu u mutantu *abi1td* jest znacząco wyższy niż u roślin typu dzikiego wyłącznie w wyniku działania stresu. Był to zaskakujący wniosek z uwagi na fakt, że mutant *abi1td* nie wykazuje żadnych cech typowych dla roślin charakteryzujących się nadprodukcją etylenu. Wzrostowi emisji etylenu towarzyszył wzrost poziomu kwasu ACC (produkt reakcji katalizowanej przez syntazy ACC) oraz wysoka całkowita aktywność syntaz ACC, która korelowała wyłącznie z aktywnością izoformy ACS6. Otrzymany wynik sugerował, że *ABI1* ingeruje w biosyntezę etylenu na etapie aktywności syntaz ACC.

Ze względu na strukturę C-końcowego fragmentu białka, syntazy ACC podzielono na trzy typy – I-III (Yamagami i in., 2003). Przedstawiciele typu I syntaz ACC, do których należy ACS6, w obrębie C-końcowej domeny białka zawierają sygnały fosforylacji dla kinaz MAP i kinaz zależnych od wapnia (CDPK). Funkcjonalnie, C-końcowa domena jest kluczowa dla regulacji obrotu białkiem. Fosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych ACS6 przez kinazy MAP zwiększa stabilność białka ACS6, a w konsekwencji podnosi także poziom produkcji etylenu (Liu and Zhang, 2004; Joo i in., 2008). Defosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych przez fosfatazy białkowe jest sygnałem do degradacji ACS przez proteasom 26S (Skottke i in. 2011). Znane są czynniki powodujące fosforylację i defosforylację ACS typu I. Należą do nich kinazy MPK3/MPK6 oraz fosfataza PP2A (Liu i

Zhang, 2004; Skottke i in., 2011). Interesował mnie kontekst komunikacji sygnalizacji ABA z etylenem. Postanowiłam zweryfikować czy ABI1, podobnie jak fosfataza PP2A, oddziałuje z syntazami ACC typu I w obrębie domeny C-końcowej. Oprócz izoformy 6 syntazy ACC w analizach uwzględniłam także izoformę 2, która również ulega ekspresji w warunkach stresu ozonowego. Z zastosowaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego, techniki pull-down oraz metod defosforylacji białek *in vitro* wykazałam, że w przypadku ACS6, fosfataza ABI1 oddziałuje i defosforyluje reszty aminokwasowe fosforylowane przez MPK6. Fosfataza ABI1 oddziałuje także z izoformą 2 syntazy ACC, ale poza fragmentem białka regulowanym przez MPK6, wskazując na alternatywny mechanizm regulacji funkcji tej izoformy syntaz ACC przez ABI1. Otrzymane wyniki wskazywały na kluczową rolę ABI1 w regulacji stabilności ACS6, stawiając ją obok MPK3/6 oraz fosfatazy PP2A, jako kolejny czynnik regulujący akumulację białka syntazy ACC. Dlatego w kolejnym etapie prac do oceny wpływu ABI1 na obrót białkiem ACS6 użyłam metody pozakomórkowej degradacji (*cell-free degradation assay*) (Lyzenga i in., 2012). Metoda ta, poprzez zastosowanie inhibitora proteasomu MG132, pozwala sprawdzić czy interesujące nas białka są degradowane przez proteasom 26S. Natomiast poprzez użycie całkowitych ekstraktów białek z roślin różnych genotypów (typ dziki i mutanty), metoda umożliwiła identyfikację czynników wpływających na stabilność białek i porównanie tempa degradacji białka. Metoda pozakomórkowej degradacji jako „system” *in vitro* wymaga przygotowania znacznych ilości rekombinowanych białek do analizy, co w przypadku syntazy ACC6 było wyjątkowo trudne, z uwagi na jej wyjątkową labilność, wynikającą z krótkiego okresu półtrwania tego białka. Przeprowadzone analizy wykazały, że w ekstraktach białkowych pochodzących z mutantu *abi1td* traktowanego, bądź nietraktowanego inhibitorem proteasomu, poziom rekombinowanego białka ACS6 jest stabilny. Inkubacja ACS6 z ekstraktami białkowymi pochodzącymi z rośliny typu dzikiego, powodowała wyraźny spadek poziomu białka ACS6. Zależność ta wskazuje, że fosfataza ABI1 reguluje akumulację białka i w normalnych warunkach ABI1-zależna defosforylacja reszt aminokwasowych zlokalizowanych w C-końcowej domenie ACS6, służy jako sygnał do degradacji za pomocą proteasomu 26S.

Wcześniejsze prace wykazały, że regulacja stabilności syntaz typu I odbywa się także przez regulację aktywności kinazowej MPK6 (Schweighofer i in., 2007; Liu and Zhang, 2004; Joo i in., 2008). Ponieważ w literaturze przedmiotu wykazano już, że ABI1 hamuje aktywność MPK6 (Leung i in., 2006), postanowiłam sprawdzić czy kompleks MPK6-ABI1 uczestniczy w

regulacji stabilności ACS6. Przeprowadzone analizy wykazały, że ABI1 wpływa na poziom ufosforylowania ACS6 przez hamowanie aktywności kinazowej MPK6.

Przeprowadzone w tej pracy badania umożliwiły także odkrycie innego mechanizmu zależnego od aktywności fosfatazy białkowej ABI1. Powszechnie wiadomo, że etylen stymuluje tworzenie reaktywnych form tlenu (Overmyer i in., 2000; Rao i in., 2002; Tuominen i in., 2004). Na kanwie badań prezentowanych w omawianej pracy stwierdziliśmy, że mutant *abi1td* charakteryzuje się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym i skutecznie przeciwdziała skutkom nadmiernej produkcji etylenu. Mechanizm ten prawdopodobnie stanowi wyjaśnienie nietypowego fenotypu mutantu *abi1td* jakim jest wzrost tolerancji na stres ozonowy na późnych jego etapach.

Konfrontując powyższe wyniki (Ludwików i in., 2014) z danymi literaturowymi można wysnuć wniosek, że odkryty przeze mnie mechanizm działania ABI1 w regulacji biosyntezy etylenu jest unikalny i kompleksowy. Fosfataza ABI1 kieruje białko ACS6 do degradacji proteosomalnej na dwa sposoby - bezpośrednio defosforyluje ACS6 w C-końcowej domenie i jednocześnie ogranicza fosforylację syntazy ACC przez MPK6 zachodzącej w tej samej domenie. Dodatkowo, ABI1 reguluje metabolizm reaktywnych form tlenu oraz potencjał redox w komórce. Oba poznane mechanizmy uzupełniają lukę w zrozumieniu czynników kierujących tolerancją roślin na stres i umożliwiają zrozumienie funkcji regulatorów sygnalizacji ABA w tym procesie. W mojej ocenie odkryty mechanizm niesie znaczny potencjał aplikacyjny. Etylen powszechnie jest uważany za hormon stresu, dlatego znajomość mechanizmów kierujących biosyntezą etylenu jest kluczowa dla projektowania roślin odpornych na stres. Innymi słowy manipulując aktywnością fosfatazową ABI1 możemy sterować odpowiedzią roślin na szkodliwe warunki środowiska.

Odkrycie mechanizmu kontrolowanego przez ABI1 związanego z kierowaniem białek do degradacji było inspiracją do przygotowania pracy przeglądowej we *Frontiers in Plant Science* (Ludwików, 2015). W tej pracy podsumowałam stan wiedzy na temat roli degradacji proteosomalnej w transdukcji sygnału ABA. Przytoczyłam aktualne dane dotyczące mechanizmów degradacji regulatorów sygnalizacji ABA. Omówiłam także role ligaz ubikwityny w tym procesie. Analizując zebrany materiał literaturowy poczyniłam dwie ważne obserwacje. Pierwszą z nich była spostrzeżenie, że aktywność biologiczna ogromnej większości regulatorów sygnalizacji ABA, podlegających tego typu degradacji, jest

regulowana przez procesy fosforylacji. Natomiast druga, wyjątkowo istotna obserwacja, dotyczyła faktu, że nieliczna grupa tego typu regulatorów sygnalizacji ABA oddziałuje także z fosfatazą ABI1. Powyższe obserwacje rzucają nowe światło na rozumienie roli i funkcji ABI1 w regulacji sygnalizacji ABA, a także przynoszą zmiany w pojmowaniu znaczenia ABI1 w integracji sygnalizacji komórkowej. W tej pracy wysnułam konkluzję, że negatywna regulacja sygnalizacji ABA przez ABI1 to w zasadzie resetowanie ścieżki sygnalizacyjnej do jej stanu przed działaniem bodźca, poprzez kierowanie efektorów tych ścieżek sygnałowych do degradacji proteasomalnej. Najważniejszym i kluczowym wyzwaniem dla dalszych badań wydaje się być identyfikacja sygnałów umożliwiających rozpoznanie przez ABI1 białek docelowych, które mają być skierowane na tę właśnie ścieżkę degradacji.

Najnowszą publikacją prezentowanego przez mnie nurtu badań funkcjonalnych dotyczących fosfatazy ABI1 jest praca opublikowana w *Plant and Cell Physiology* (Mitula, wsp. i Ludwików, 2015). W tej pracy analizowałam rolę ABI1 w regulacji aktywności wybranej kinazy kaskady MAP – MAPKKK18. Podobnie jak w przypadku syntaz ACC przesłanką do rozpoczęcia badań nad funkcją MAPKKK18, były wyniki uzyskane na podstawie analizy danych mikromacierzowych dla mutantu *abi1td* (Ludwików i in., 2009). Podjęcie tej tematyki wynikało także z ówczesnych światowych trendów badawczych, które stymulowały do poszukiwania pełnych kaskad kinaz MAP nadzorowanych bezpośrednio przez ABA. Kluczowym aspektem tych badań było udokumentowanie, że MAPKKK18 jest regulowana przez ABA. Używając stabilnych transformantów *A. thaliana* niosących konstrukt fragmentu promotora MAPKKK18 w fuzji z genem GUS, analizowałam jego aktywację po stymulacji ABA. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że *MAPKKK18* ulega ekspresji w tkankach charakterystycznych dla regulacji przez sygnalizację ABA. Wykazałam, że aktywność kinazowa MAPKKK18 jest aktywowana przez ABA. Odkryliśmy także, że MAPKKK18 pełni istotne funkcje, nie tylko przy regulacji ruchów aparatów szparkowych, ale także podczas ich rozwoju. Ponieważ uzyskane wyniki wskazywały, że MAPKKK18 działa jako pozytywny regulator w rozwoju aparatów szparkowych postawiłam hipotezę, że ścieżka sygnałowa kontrolowana przez MAPKKK18 jest specyficzna i niezależna od ścieżki nadzorowanej przez inną kinazę MAP, także ważną dla tego procesu – kinazę YODA (Wang i in., 2007; Lampard i in., 2009; Meng i in., 2012). Nie wyklucza to możliwości, że obie ścieżki mogą się komunikować, w mojej ocenie, głównie na późnych etapach rozwoju aparatów szparkowych.



Podczas realizacji naszych badań nad MAPKKK18 opublikowano dwie niezależne prace precyzujące skład kaskady MAP rozpoczynającej się od MAPKKK18 (Matsuoka i in., 2015; Danquah i in., 2015). W pracy Danquah i in. (2015) zaobserwowano także, że istnieje korelacja pomiędzy ekspresją wybranych elementów rdzeniowego kompleksu PYR/PYL/RCAR-SnRK2-PP2C (głównie receptorami ABA i fosfatazą HAB1) a poziomem transkrypcji genu *MAPKKK18*. Wynik ten w zasadzie potwierdza nasze założenia i jest zgodny z naszymi danymi wskazującymi, że ABI1 reguluje poziom transkryptu *MAPKKK18* (Ludwików i in., 2009; Mituła, wsp. i Ludwików, 2015). Co więcej, obserwujemy brak aktywności kinazowej MAPKKK18 u mutantu *snrk2.6*. Jest to ważne spostrzeżenie z uwagi na fakt, że aktywność kinazowa SnRK2.6 jest w zasadzie śladowa u wielokrotnych mutantów receptorów ABA i u mutantu niewrażliwego na ABA - *abi1-1*, niosącego mutację punktową G180D. Wspomniane przesłanki pozwalają postawić hipotezę, że to właśnie kinaza SnRK2.6 uczestniczy w regulacji transkrypcyjnej genu *MAPKKK18* tj. fosforyluje nieznany aktualnie czynnik transkrypcyjny wiążący się z promotorem *MAPKKK18* (Mituła, wsp. i Ludwików, 2015).

Biorąc pod uwagę wyniki zgromadzone przez mój Zespół rozważaliśmy przede wszystkim czy MAPKKK18 jest białkiem docelowym dla fosfatazy ABI1. Istotnie ABI1, ale nie ABI2, oddziałuje z MAPKKK18. Wynik ten wskazuje na specyfikę substratową homologicznych fosfataz PP2C z grupy A względem MAPKKK18. Ponadto, udokumentowałam *in vitro* i *in vivo*, że ABI1 specyficznie hamuje aktywność kinazową MAPKKK18 indukowaną ABA. Jest to istotna obserwacja zważywszy, że MAPKKK18 nie ulega autofosforylacji i musi być aktywowana przez nadrzędną kinazę. Analizy aktywności enzymatycznej natywnej kinazy MAPKKK18 *in vivo* były możliwe z zastosowaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciw MAPKKK18, które zaprojektowałam i przygotowałam we współpracy z firmą AGRISERA. Dzięki tym analizom wykazałam, że MAPKKK18 jest białkiem o wyjątkowo niskiej ekspresji – niewykrywalnym z użyciem metody Western blot. Wynik ten sugerował, że MAPKKK18, jest białkiem degradowanym przez proteasom 26S. Analizy z użyciem metody pozakomórkowej degradacji potwierdziły tę hipotezę. Podobnie jak syntazy ACC, fosfataza ABI1 kieruje białko MAPKKK18 do degradacji proteasomalnej. Tak więc kaskada kinaz MAP rozpoczynająca się od MAPKKK18 jest regulowana przez rdzeniową sygnalizację ABA na dwóch poziomach: transkrypcyjnym, poprzez kontrolę poziomu transkryptu *MAPKKK18*, oraz potranslacyjnym, w wyniku ABI1-zależnej degradacji przez proteasom 26S. Dalsze badania mojego Zespołu dotyczą poznania szczegółowego mechanizmu degradacji *MAPKKK18*:

głównie identyfikacji ligazy ubikwityny i białek pomocniczych odpowiedzialnych za przyłączanie ubikwityny oraz sprecyzowanie fragmentu białka (reszt aminokwasowych) zawierającego sygnały do degradacji.

Podsumowując, przedstawiony nurt badawczy, w mojej ocenie, umożliwia pełniejsze zrozumienie wielokierunkowości działania fosfatazy białkowej ABI1. Za najważniejsze osiągnięcie uważam identyfikację i charakterystykę nowego mechanizmu komórkowego związanego z aktywnością fosfatazy ABI1 jakim jest kierowanie białek ACS6 i MAPKKK18 do degradacji przez proteasom 26S. W moich pracach wykazałam, że fosfataza ABI1: 1) uczestniczy w regulacji stabilności białek syntazy ACS6 i MAPKKK18; 2) kontroluje homeostazę wolnych rodników; 3) reguluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych; 4) hamuje aktywność kinazową MAPKKK18 i MPK6; oraz 5) jej aktywność, powoduje resetowanie ścieżki sygnalizacyjnej do stanu przed działaniem bodźca.

Przedstawione badania były realizowane w ramach dwóch kierowanych przeze mnie projektach badawczych, finansowanych w ramach COST FA0605 IMPAS 682/N – COST/2010/0 (2010-2011) oraz NCN UMO-2012/05/B/NZ3/00352 (2013-2016).

## 5. Omówienie pozostałego dorobku

Główny nurt mojej pracy badawczej przed i po doktoracie dotyczył analiz funkcjonalnych nad fosfatazą białkową ABI1. W trakcie wykonywania projektu doktorskiego opublikowałam pracę eksperymentalną dotyczącą analizy profilu transkrypcyjnego *A. thaliana* w warunkach stresu ozonowego (Ludwików i in., 2004). Ówczesnie była to pierwsza praca dokumentująca profil transkrypcyjny rośliny modelowej w warunkach stresu ozonowego, w dwóch punktach czasowych, z użyciem mikromacierzy (chipów) Affymetrix ATH1 Genom Array. Omówiłam w tej pracy głównie profil transkrypcyjny genów zaangażowanych w detoksyfikację reaktywnych form tlenu oraz genów, których produkty uczestniczą w syntezie fenylopropanoidów. Wyniki eksperymentów mikromacierzowych prezentowanych w tej pracy, jak również w pracy opublikowanej po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (Ludwików i in., 2009), wykonałam podczas 11-miesięcznego pobytu na Uniwersytecie w Manchesterze (w latach 2003-2004) w ramach stypendium Marii Curie Training site. Podczas pobytu otrzymałam

gruntowną wiedzę z zakresu analiz mikromacierzowych i metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, które następnie wdrażałam w Zakładzie Biotechnologii, UAM.

Wspomniana praca Ludwików i in., (2009) także opublikowana w nurcie globalnych analiz profili ekspresji dotyczyła szczegółowej analizy zmian w poziomie transkrypcji genów u mutantu *abi1td* w warunkach stresu ozonowego i suszy. Badania wykazały, że fosfataza ABI1 jest zaangażowana w wiele procesów komórkowych oraz w ścieżki odpowiedzi na stres uruchamiane niezależnie od ABA. Ciekawym odkryciem było również stwierdzenie, że ABI1 uczestniczy w regulacji transkrypcji genów, u których zachodzi alternatywne wycinanie intronów oraz genów, które regulują ten proces. Na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowałam, że ABI1 uczestniczy w rozpoznaniu miejsc alternatywnego składania DNA i tym samym odpowiada za różnorodność proteomu komórkowego w warunkach obu stresów. W niniejszej pracy opisałam także związek pomiędzy fosfatazą ABI1 a biosyntezą hormonów roślinnych: ABA i etylenem. Na podstawie przeprowadzonych analiz wnioskowałam, że ABI1 antagonistycznie reguluje poziom obu hormonów w komórce. Wyniki uzyskane podczas realizacji mojej pracy doktorskiej były punktem wyjścia do przygotowania projektu, w ramach którego szczegółowo zbadałam mechanizm regulacji biosyntezy etylenu przez ABI1, opisany w pracy Ludwików i in. (2014).

Równolegle do badań prowadzonych na gatunku modelowym *A. thaliana* byłam zaangażowana w realizację projektów z zakresu genomiki porównawczej. W pracy Ludwików i in. (2013) analizowaliśmy profil ekspresyjny i organizację na chromosomach genów kodujących fosfatazy białkowe 2C z grupy A u *Brassica oleracea*. W oparciu o wyniki wnioskowaliśmy, że u *B. oleracea* sygnalizacja zależna od fosfataz PP2C z grupy A ewoluowała w odmienny sposób niż u *A. thaliana*. Wykazaliśmy, że u *B. oleracea* rodzina genów PP2C z grupy A jest liczniejsza. Obserwowaliśmy także istotne różnice w profilu ekspresji członków tej grupy genów w odniesieniu do *A. thaliana*. W drugiej pracy Babula-Skowrońska i in., (2015) analizowaliśmy odpowiedź na suszę u rzepaku transgenicznego z nadekspresją *AtABI1*. Szczególnie interesował nas profil transkrypcji wybranych dwóch ewolucyjnie odległych paralogów (endogenów) kodujących ABI1 u *B. napus*, którym przypisaliśmy odmiennie funkcje w odpowiedzi na stres wodny. Postawiliśmy hipotezę, że subfunkcjonizacja, następująca po zdarzeniach duplikacji genów jest kluczowym

mechanizmem umożliwiającym utrzymanie zróżnicowania funkcjonalnego w obrębie paralogów ABI1 u rzepaku.

W moim pozostałym dorobku podoktorskim, oprócz prac eksperymentalnych, znajdują się również prace przeglądowe (Ludwików i Sadowski 2008; Ludwików i in., 2008) i monografie (Ludwików i in, 2011). W pracy Ludwików i Sadowski (2008) przedstawiono bieżące dane z zakresu transkryptomiki w warunkach stresu ozonowego, stawiając nacisk na omówienie szlaków sygnałowych uczestniczących w reakcji na ten stres. Z kolei w pracy Ludwików i in., (2008) przedstawiłam wybrane aspekty planowania i realizacji eksperymentów z udziałem mikromacierzy DNA. Praca stanowi także aktualne podsumowanie postępów w transkryptomice stresu u roślin, wskazując na wysoką użyteczność metod transkryptomicznych w tego typu analizach. Z kolei w rozdziale książki „*Genetics, Genomics and Breeding of Vegetable Brassicas*” pod tytułem „The Decoding of Gene Functions— Transcriptomics Tools Toward Molecular Physiology and Breeding” (Ludwików i in., 2011) przedstawiłam stan zaawansowania badań transkryptomicznych u roślin uprawnych z rodzaju Brassica. Za współautorstwo książki w 2012 roku otrzymałam Wyróżnienie Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych Polskiej Akademii Nauk.

Obecnie moje badania są kontynuacją podjętych wątków w nurcie analiz funkcjonalnych fosfatazy ABI1. Wraz z czteroosobowym Zespołem projektowym (3 doktorantów i 1 stażysta podoktorski), nad którym sprawuję opiekę naukową, rozwijam dwa główne kierunki badawcze. W pierwszym z nich zgłębiamy mechanizmy degradacji MAPKKK18 oraz syntazy ACC typu III – ACS7. Obecnie trwają analizy mające na celu identyfikację ligazy ubikwityny E3 zaangażowanej w proces degradacji MAPKKK18. Natomiast w przypadku analiz poświęconych ACS7, poszukujemy sygnałów molekularnych determinujących degradację tego białka. Analizujemy czy fosforylacja wybranych reszt aminokwasowych określa wzory kolejnych modyfikacji potranslacyjnych, ubikwitynacji oraz sumoilacji, kluczowych dla regulacji stabilności białka. Drugi temat badawczy ma na celu identyfikację inhibitorów fosfataz białkowych typu ABI1 wśród związków chemicznych o małej masie cząsteczkowej. Hamowanie aktywności fosfatazowej ma duże znaczenie dla tolerancji roślin na stres. Dlatego, opracowany inhibitor może znaleźć zastosowanie w rolnictwie, do ochrony upraw przed działaniem suszy.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam w realizacji kilkunastu projektów badawczych, w tym w projekcie w ramach Akcji COST IMPAS, gdzie również piastowałam funkcję jako zastępca w Komitecie Zarządzającym. Dotychczas kierowałam trzema projektami finansowanymi przez Narodowe Centrum Nauki. W 2014 roku odbyłam 2-tygodniowy staż w zakresie krystalografii na Uniwersytecie Massachusetts-Lowell. Poza aktywnością naukową realizowałam również projekty dydaktyczne. Byłam zaangażowana w tworzenie nowych programów studiów: studiów magisterskich oraz studiów doktoranckich. Obie aktywności realizowane były w ramach projektów finansowanych z funduszy Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. We wspomnianych projektach pełniłam funkcje Koordynatora merytorycznego Zadania lub Koordynatora Wydziałowego.

#### Literatura

- Babula-Skowrońska D, Ludwików A, Cieśla A, Olejnik A, Cegielska-Taras T, Bartkowiak-Broda I, Sadowski J (2015). Involvement of genes encoding ABI1 protein phosphatases in the response of *Brassica napus* L. to drought stress. *Plant Mol. Biol.* 88: 445-457.
- Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *PNAS* 109: 10593-10598.
- Danquah A, de Zélicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frei dit Frey N, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby JP, Ortiz-Masia D, Marcote MJ, Hirt H, Colcombet J (2015). Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82: 232-244.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U, Zhu JK (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 3: 233-244.
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21: 3029-3038.
- Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J.* 54: 129-140.
- Lampard GR, Lukowitz W, Ellis BE, Bergmann DC (2009). Novel and expanded roles for MAPK signaling in *Arabidopsis* stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *Plant Cell* 21: 3506-3517.
- Leung J, Orfanidi S, Chefdor F, Meszaros T, Bolte S, Mizoguchi T, Shinozaki K, Giraudat J, Bogre L (2006). Antagonistic interaction between MAP kinase and protein phosphatase 2C in stress recovery. *Plant Sci.* 171: 596-606.
- Li Z, Li Z, Gao X, Chinnusamy V, Bressan R, Wang ZX, Zhu JK, Wu JW, Liu D (2012). ROP11 GTPase negatively regulates ABA signaling by protecting ABI1 phosphatase activity from inhibition by the ABA receptor RCAR1/PYL9 in *Arabidopsis*. *J. Integ. Plant Biol.* 54: 180-188.
- Liu Y, Zhang S (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386-3399.

- Luan S (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 63–92.
- Ludwików A (2015). Targeting proteins for proteasomal degradation—a new function of Arabidopsis ABI1 protein phosphatase 2C. *Frontiers in Plant Science* 6: 310.
- Ludwików A, Babula-Skowrońska D, Szczepaniak M, Belter N, Dominiak E, Sadowski J (2013). Expression profiles and genomic organisation of group A protein phosphatase 2C genes in *Brassica oleracea*. *Annals of Applied Biology* 163: 124–134.
- Ludwików A, Cieśla A, Kasprowicz-Maluski A, Mituła F, Tajdel M, Gałgański Ł, Ziółkowski PA, Kubiak P, Małecka A, Piechalak A, Szabat M, Górka A, Dąbrowski M, Ibragimow I, Sadowski J (2014). Arabidopsis protein phosphatase 2C ABI1 interacts with type I ACC synthases and is involved in the regulation of ozone-induced ethylene biosynthesis. *Mol Plant* 7: 960–976.
- Ludwików A, Kierzek D, Gallois P, Zeef L, Sadowski J (2009). Gene expression profiling of ozone-treated Arabidopsis *abi1td* insertional mutant: protein phosphatase 2C ABI1 modulates biosynthesis ratio of ABA and ethylene. *Planta* 230: 1003–1017.
- Ludwików A, Krasowski K, Zeef L (2011). The Decoding of Gene Functions - Transcriptomics Tools Toward Breeding. In Vegetable Brassica. In Genetics, Genomics and Breeding of Vegetable Brassicas. Series editors: Prof. C. Kole and Prof. A.G. Abbott. Ed. Sadowski J. Publishers: Science Publishers, Inc., New Hampshire, Jersey, Plymouth.
- Ludwików A, Misztal LH, Krasowski K, Sadowski J (2008). Mikromacierze DNA i ich zastosowanie w badaniach ekspresji genów u roślin. *Biotechnologia* 4: 131–143.
- Ludwików A, Sadowski J (2008). Gene Networks in Plant Ozone Stress Response and Tolerance. *J Int Plant Biol.* 50: 1256–1267.
- Lyzenga WJ, Liu H, Schofield A, Muise-Hennessey A, Stone SL (2013). Arabidopsis CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *J. Exp. Bot.* 64: 2779–2791.
- Matsuoka D, Yasufuku, T, Furuya, T, Nanmori T (2015). An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Mol Biol.* 87: 565–575.
- Meinhard M, Grill E (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Lett.* 508: 443–6.
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602–608.
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S (2012). A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates Arabidopsis inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24: 4948–4960.
- Miao Y, Lv D, Wang P, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP (2006). An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 18: 2749–2766.
- Mituła F, Tajdel M, Cieśla A, Kasprowicz-Maluśki A, Kulik A, Babula-Skowrońska D, Michalak M, Dobrowolska G, Sadowski J, Ludwików A (2015). Arabidopsis ABA-activated kinase MAPKKK18 is regulated by protein phosphatase 2C ABI1 and the ubiquitin proteasome pathway. *Plant Cell Physiol.* First published online: October 6, 2015 doi: 10.1093/pcp/pcv146.
- Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci.* 18: 259–66.
- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462: 609–614.
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326: 1373–1379.
- Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu J-K (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *PNAS* 100: 11771–11776.

- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H Jr, Kangasjarvi J (2000). Ozone-sensitive arabidopsis *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849-1862.
- Rao MV, Lee HI, Davis KR (2002). Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32: 447-456.
- Rosado A, Amaya I, Valpuesta V, Cuartero J, Botella MA, Borsani O (2006). ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *J.Exp. Bot.* 57: 3327-3335.
- Saez A, Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Rodriguez PL (2008). HAB-1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2972-2988.
- Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M, Doczi R, Hirt H, Schwanninger M, Kant M, Schuurink R, Mauch F, Buchala A, Cardinale F, Meskiene I (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 2213-2224.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236-243.
- Sharp RE (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 211-222.
- Sharp RE, LeNoble ME (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J.Exp.Bot.* 53: 33-37.
- Skottke KR, Yoon GM, Kieber, JJ, DeLong A (2011). Protein phosphatase 2A controls ethylene biosynthesis by differentially regulating the turnover of ACC synthase isoforms. *PLoS Genet.* 7: e1001370.
- Sridharamurthy M, Kovach A, Zhao Y, Zhu JK, Xu HE, Swaminathan K, Melcher K (2014). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Inhibits ABA-Signaling Protein Phosphatase HAB1. *PLOS One* 9: e113643.
- Thole JM, Beisner ER, Liu J, Venkova SV, Strader LC (2014). Abscisic Acid Regulates Root Elongation Through the Activities of Auxin and Ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 4: 1259-1274.
- Trivellini A, Ferrante A, Vernieri P, Serra G (2011). Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *J.Exp.Bot.* 62: 5437-5452.
- Tsuchisaka A, Yu G, Jin H, Alonso JM, Ecker JR, Zhang X, Gao S, Theologis A (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 183: 979-1003.
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjarvi J (2004). Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in Arabidopsis. *Plant J.* 39: 59-69.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 63-73.
- Wang KL, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: S131-S151.
- Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *J. Biol. Chem.* 278: 49102-49112.
- Yu F, Qian L, Nibau C, Duan Q, Kita D, Levasseur K, Li X, Lu C, Li H, Hou C, Li L, Buchanan BB, Chen L, Cheung AY, Li D, Luan S (2012). FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in *Arabidopsis* by activating ABI2 phosphatase. *PNAS* 109: 14693-14698.

*Jennifer Ludovick*