

Prof. dr hab. Hanna Jańska

Wrocław, 31.12.2021

email: hanna.janska@uwr.wroc.pl

Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej zatytułowana
"Charakterystyka mechanizmu degradacji kinazy kaskady MAP- MAPKKK18 zależnej
od proteasomu"**

Kinazy aktywowane mitogenami, w skrócie MAPK tworzą w komórkach eukariotycznych trzypoziomowe kaskady będące mostem pomiędzy bodźcem zewnątrzkomórkowym, a odpowiedzią wewnątrzkomórkową. Sekwencyjna fosforylacja ma fundamentalne znaczenie dla kaskadowej transdukcji sygnału. Ten sposób sygnalizacji jest znany od stosunkowo dawna, jednak mimo licznych badań nadal wiele pozostaje do zbadania w zakresie całkowitego interaktomu tych skomplikowanych szlaków oraz mechanizmów je regulujących. Jednym z induktorów kaskady MAP u roślin jest kwas abscysynowy (ABA), fitohormon odgrywający kluczową rolę w regulacji procesów wzrostu, rozwoju i odpowiedzi na stresy o podłożu abiotycznym. Celem ocenianej pracy była szczegółowa charakterystyka kaskady kinaz MAP rozpoczynającej się od ABA-aktywowanej kinazy MAPKKK18, a w szczególności poznanie mechanizmów regulujących aktywność i stabilność kinazy MAPKKK18. Praca została wykonana w Pracowni Biotechnologii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików, czyli w zespole, który od lat zajmuje się z sukcesami badaniem mechanizmów transdukcji sygnału ABA z udziałem kinaz MAP oraz proteosomalną degradacją białek.

Recenzowana rozprawa doktorska ma postać monografii, zawierającej 166 stron i składa się z typowych dla prac eksperymentalnych części poprzedzonych spisem skrótów. Spis ten zawiera dużo skrótów używanych często w biologii eksperymentalnej jak ATP, BSA czy PCR, natomiast zabrakło wyjaśnienia dla specjalistycznego dla tej pracy skrótu MKK.



Dodatkowo do pracy dołączono rozdział „Dalsze perspektywy badawcze” jak i suplement, gdzie opisano w jaki sposób utworzono podwójnego mutantu *mkk3mapkkk18* oraz wyniki identyfikacji miejsc fosforylacji kinazy MAPKKK18. Na końcu rozprawy doktorskiej przed dość pokaźnym spisem literatury (22 strony) umieszczono spis rysunków i tabel. Całość pracy opracowana jest starannie i w większości zrozumiale, chociaż Autorka nie ustrzegła się stosunkowo wielu błędów redakcyjnych.

Rozdział „Wstęp” to przegląd literatury charakteryzującej białka/procesy będące obiektem badań opisanych w części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej i taka koncepcja bardzo mi się podoba. Rozpoczyna go charakterystyka kinaz MAP i opis znanych kaskad sygnałowych tych kinaz u *Arabidopsis*. Z punktu widzenia nowatorskich cech odkryć Doktorantki ważny jest podrozdział omawiający dotychczasowy stan wiedzy w zakresie charakterystyki kinazy MAPKKK18, regulacji jej aktywności na poziomie transkrypcyjnym i potranslacyjnym, roli w sygnalizacji ABA i regulacji tworzenia aparatów szparkowych. Proces rozwoju aparatów szparkowych i czynników go kontrolujących jest omówiony szczególnie szeroko. Kilka następnych podrozdziałów „Wstępu” poświęconych jest regulacji stabilności białek przez system ubikwityna-proteasom (UPS). Doktorantka opisuje nie tylko budowę proteasomu, mechanizm jego działania, ale również charakteryzuje proces ubikwitynacji białek czyli modyfikacji potranslacyjnej białek mającej na celu naznaczenie białek gotowych do degradacji. Trzeci nurt wstępu skupia się na udziale kwasu abscysynowego w kaskadach sygnałowych i degradacji białek tych kaskad przez system UPS. Podsumowując wstęp jest adekwatny do zrozumienia zawartości eksperymentalnej ocenianej rozprawy.

Opisy w rozdziale „Materiały i Metody” są w większości bardzo starannie i szczegółowo opracowane. Zakres stosowanych metod jest szeroki, a zastosowana metodyka badań odpowiednio dobrana do stawianych celów badawczych. Jednakże podczas analizy wyników nie mogłam znaleźć informacji o sposobie przygotowania ekstraktów roślinnych wykorzystywanych do identyfikacji partnerów białkowych MAPKKK18. Nie jest to banalny aspekt w przypadku badań interaktomu. Odwołanie w tekście (str.84) dotyczy podrozdziału 6.6.4, ale w tym podrozdziale opisany jest sposób oczyszczania rekombinowanych białek z bakterii. Rekomendowałabym również aby informacji o stosowanych metodach do pomiaru poziomu białka i DNA w próbkach były wyodrębnione. Dodatkowo mam szczegółowe pytanie dotyczące częstości podlewania roślin roztworem do zasilania (str.52). Czy ten sam roztwór stosowano do roślin tytoniu i *Arabidopsis* ?

Badania rozpoczęto od poszukiwań partnerów białkowych kinazy MAPKKK18. W tym celu wykorzystano kilka niezależnych metod i jest to niewątpliwie dużą zaletą ocenianej pracy.

Jedną z zastosowanych metod była przejściowa ekspresja kinazy MAPKKK18 z *Arabidopsis* jako białka fuzyjnego w liściach tytoniu w połączeniu z jego oczyszczaniem za pomocą chromatografii powinowactwa i identyfikacją składników oczyszczanego kompleksu za pomocą spektrometrii mas. W dyskusji doktorantka daje wyraz obawom związanym z heterologiczną ekspresją jak również z faktem, że kinaza MAPKKK18 była ekspresjonowana pod kontrolą silnego konstytutywnego promotor 35S. W związku z tym nasuwa się pytanie: czy był jakiś istotny powód, że nie podjęto się ekspresji MAPKKK18 w komórkach *Arabidopsis* pod kontrolą własnego promotora? W opisie tego doświadczenia znalazłam kilka błędów edytorskich, które utrudniają jego zrozumienie. Począwszy od skrótu nazwy syntetyzowanego białka fuzyjnego, który sugeruje, że metki GFP i HIS są dołączone do N-końca białka MAPKKK18. Znacznik GFP stosuje się raczej do badań lokalizacji subkomórkowej danego białka niż do identyfikacji potencjalnych białkowych partnerów. Czy według doktorantki jego obecność nie zaburzała interakcji z innymi białkami? W rezultacie zastosowania chromatografii powinowactwa Doktorantka uzyskuje listę 262 potencjalnych partnerów białkowych MAPKKK18, ale listy tej nie mogłam znaleźć mimo odnośnika do tabeli 1. Drugą niezależną metodą wykorzystaną do identyfikacji potencjalnych partnerów białkowych kinazy MAPKKK18 była metoda „GST pull-down”. W związku z tym chciałabym wiedzieć, jakie białka zostały sklasyfikowane obiema metodami jako najbardziej prawdopodobni partnerzy MAPKKK18? Czy wśród identyfikowanych białek były białka mitochondrialne lub chloroplastowe? Czy zidentyfikowano białka tytoniu nie mające odpowiedników u *Arabidopsis*? Z opisu wynika, że wśród białek współocyszczających się z MAPKKK18 i wiążących się do GST-MAPKKK18 są białka zaangażowane w proces degradacji z udziałem proteasomu, w ubiquitynację białek, sygnalizację i biosyntezę ABA oraz białek zaangażowanych w proces biogenezy aparatów szparkowych. W opracowaniu wyników brakuje jednak zestawienia porównawczego uwidaczniającego ile i jakie białka w każdej grupie funkcyjnej były identyfikowane obiema metodami, a ile zostało zidentyfikowanych tylko jedną metodą (np. diagramy Venna).

Wyniki otrzymane za pomocą metody „GST pull-down” sugerowały również, że istotną grupą białek oddziaływujących z MAPKKK18 stanowią białka należące do kinaz MAP, w tym dwie kinazy MKK, MKK7 i MKK10. Identyfikacje partnerów białkowych kinazy MAPKKK18 w obrębie kinaz MAP przeprowadzono wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy oraz metodę pull-down z użyciem białek rekombinowanych ekspresjonowanych w systemie bakteryjnym. Taka strategia jest niewątpliwie pracochłonna, ale umożliwia identyfikację bezpośrednich oddziaływań między białkami. Oba typy analiz

wskazują na istnienie bezpośredniego oddziaływania jedynie między MAPKKK18 i MKK3. Wiarygodność tego wyniku jest niezaprzeczalna mimo, że takie oddziaływanie nie zostało wykryte w metodach gdzie identyfikacja partnerów opierała się na spektrometrii mas. Autorka rozprawy dyskutuje ten aspekt badań w rozdziale „Dyskusja”. Prosiłabym autorkę rozprawy o wyjaśnienie chronologii zdarzeń, które są podstawą zdania „W trakcie realizacji niniejszej pracy, dwa niezależne zespoły opisały kompletną kaskadę z udziałem MAPKKK18- MKK3”. Dwie cytowane prace pochodzą z 2015 roku. Do tej części rozprawy mam jeszcze jedno pytanie: która z opcji tłumaczących dlaczego nie potwierdzono oddziaływań pomiędzy MAPKKK18 i MKK7 lub MAPKKK18 i MKK10 przedstawionych w rozprawie jest najbardziej prawdopodobna według Doktorantki?

Drożdżowy system dwuhybrydowy oraz metodę pull-down z użyciem białek rekombinowanych wykorzystano również do analizy oddziaływań między MAPKKK18 z białkami kompleksu podstawowej sygnalizacji ABA. Pokazano, że MAPKKK18 oddziałuje bezpośrednio z regulatorami sygnalizacji ABA, fosfatazą ABI1 oraz kinazą SnRK2 ale nie z bliskim homologiem ABI1 fosfatazą ABI2.

W następnych podrozdziałach Autorka rozprawy opisuje wyniki badań, które sugeruje tytuł rozprawy „Charakterystyka mechanizmu degradacji kinazy kaskady MAP-MAPKKK18 zależnej od proteasomu”. Trochę szkoda, że tytuł rozprawy nie sygnalizuje, że Doktorantka charakteryzowała nie tylko mechanizm degradacji, ale również interaktom MAPKKK18. Fakt, że stabilność MAPKKK18 jest regulowana przez szlak ubikwityna-proteasom 26S został udokumentowany wcześniej, natomiast Pani mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska podjęła się określić które reszty lizyny są sygnałem do degradacji białka MAPKKK18, jak również które ligazy ubikwityny determinują specyficzność UPS w stosunku do MAPKKK18. Najpierw stosując narzędzia bioinformatyczne przewiduje potencjalne miejsca ubikwitynacji, a następnie weryfikuje ich funkcjonalne znaczenie poprzez wyznaczanie tempa degradacji MAPKKK18 zmutowanego w przewidywanych miejscach w stosunku do wersji natywnej. Zastosowana metoda monitorowania efektywności degradacji (pozakomórkowa degradacja *in vitro*) jest opisana precyzyjnie i jasno w rozdziale „Materiały i Metody”, ale nie mogłam znaleźć odpowiedniego odnośnika literaturowego do metody oryginalnej.. Analizy pozakomórkowej degradacji *in vitro* wykazały, że tylko ubikwitynacja lizyny 154 zwiększa tempo degradacji czyli tylko ta lizyna jest zaangażowana w regulację stabilności MAPKKK18. Wynik ten jest intrygujący w świetle badań konkurencyjnej grupy badawczej opisanych w dyskusji, które wskazują, że nie tylko lizyna 154, ale również 32 jest zaangażowana w proteasomalną

degradację MAPKKK18. Prosiłabym o bliższe uzasadnienie powodów tych różnic sugerowanych w dyskusji, a mianowicie zastosowany znacznik i inne punkty czasowe.

Wśród identyfikowanych białek oddziałujących z MAPKKK18 były trzy ligazy ubikwityny. W celu weryfikacji tego ważnego wyniku Doktorantka zastosowała metodę pull-down potwierdzając bezpośrednie oddziaływanie między KEG ligazą i kinazą MAPKKK18. Inną strategię zastosowano w przypadku pozostałych dwóch ligaz, UPL1 i UPL4, wykazując, że ekstrakty pochodzące z roślin ich pozbawionych degradują MAPKKK18 wolniej niż ekstrakt z roślin typu dzikiego. W tym przypadku nie potwierdzono więc bezpośredniego oddziaływania, ale wykazano wyraźny wpływ na tempo degradacji. Dlaczego zastosowana inna strategię dla KEG i UPL1-4 ligaz?

Autorka rozprawy odkrywa również nowe informacje na temat udziału kinazy MAPKKK18 w biogenezie aparatów szparkowych wykazując, że udział ten związany jest z aktywnością modułu MAPKKK18-MKK3. Innymi słowy identyfikuje nową ścieżkę sygnalizacyjną MAPKKK18-MKK3 łączącą sygnalizację ABA z kontrolą podziałów komórek linii rozwojowej aparatów szparkowych. Analiza zagęszczeń aparatów szparkowych, krytyczna dla tych wniosków, jest przeprowadzana tylko dla jednej linii typu nokaut w genie kodującym MKK3 stwarzając pewne prawdopodobieństwo, że cecha ta może być związana z nokautem w innym genie. Jakie były powody nie wyselekcjonowania/analizowania drugiej niezależnej linii? Czy wyselekcjonowana przez Doktorantkę linia typu nokaut w genie kodującym MKK3 lub otrzymany przez nią podwójny mutant wykazywały oprócz zmian w strukturze epidermy inne zmiany w fenotypie w stosunku do linii typu dzikiego ?

Dyskusja, choć napisana jasno i ciekawie mogłaby być krótsza, bardziej zwarta choćby poprzez pominięcie informacji obecnych w innych częściach rozprawy, np. str. 125 - opis podstaw doświadczenia czy str. 127 - informacje o rozwoju aparatów szparkowych. Z drugiej strony dyskusja jest bezsprzecznym dowodem bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę szerokiej literatury dotyczącej tematyki rozprawy. W niektórych przypadkach wyniki prac Autorki nie są zgodne z wynikami pochodzącymi z innych laboratoriów i chciałabym podkreślić, że mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska potrafi podołać tak trudnej dyskusji. Część wyników prac badawczych zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w dwóch pracach. W pracy, która ukazała się w *Plant Signaling & Behavior* w roku 2016 Doktorantka jest pierwszym autorem, a drugim autorem w pracy opublikowanej w *Plant and Cell Physiology* w roku 2015. Środki na realizację ocenianej pracy zdobyto z różnych źródeł, między innymi z dwóch projektów, których mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska była kierownikiem: projektu finansowanego przez NCN i grantu Dziekana Wydziału Biologii UAM.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej pt. „Charakterystyka mechanizmu degradacji kinazy kaskady MAP- MAPKKK18 zależnej od proteasomu” spełnia wszystkie warunki określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

M. Jaischa