

Prof. dr hab. Andrzej K. Kononowicz  
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej  
i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 7.07.2017 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr. Michała Michalaka  
pt. „ODDZIAŁYWANIA BIAŁKO-BIAŁKO W KOMPLEKSACH  
REGULUJĄCYCH TRANSPORT PEŁCZERZYKOWY U ROŚLIN”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Michała Michalaka została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem Prof. dr hab. Przemysława Wojtaszka oraz dr Anny Kasprowicz-Maluśki.

Praca liczy 96 stron, 74 ilustracje (w tym wykresy, diagramy, makro- i mikrografie, oraz zamieszczone na dysku CD mikrofilmy) bardzo dobrze dokumentujące zagadnienia omawiane w rozprawie, oraz 92 pozycje w spisie piśmiennictwa. Wszystkie prace opublikowane zostały w języku angielskim w renomowanych czasopismach z listy JCR i prawidłowo zacytowane. Uważam, że Doktorant wykazał się stosownym krytycyzmem przy wyborze tych zasługujących na cytowanie. Inaczej mówiąc, bogactwo zagadnień poruszanych w pracy oraz wielostronność podejścia eksperymentalnego, wymagały odwołania się do takiej a nie innej literatury przedmiotu.

Rozprawa została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie i oprócz spisu treści oraz wykazu stosowanych skrótów zawiera obszerny i bardzo interesujący *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki* i *Dyskusję*, niezwykle interesujący rozdział *Dalsze perspektywy badawcze*, *Listę cytowanego piśmiennictwa* a wreszcie zapisane na płycie CD *7 mikrofilmów*, *Bazy danych*, *Plik FASTA* z sekwencją genu mTFP1 oraz *Plik z rycinami* (zgadzam się z Autorem pracy, że ryciny oglądane w komputerze przewyższają jakością te zamieszczone w wersji drukowanej rozprawy i pozwalają dostrzec szereg dodatkowych szczegółów). Nie od rzeczy będzie dodać, że praca zawiera obszerne streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analizy wyników zrealizowane zostały przez Doktoranta w sposób wzorowy, choć nie ustrzegł się jednak pewnych drobnych błędów, które nie mają jednak istotnego wpływu na moją ogólnie bardzo wysoką ocenę całości. Wartość dodatkową pracy stanowią załączone przez Autora mikrofilmy, niewątpliwie unikalna forma dokumentacji wyników. **Stąd, uprzedzając szczegółowe uzasadnienie, chciałbym już teraz wyrazić pogląd, że praca ta w mojej ocenie w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnosząc do**

**Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Michała Michalaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**UZASADNIENIE**

Tematyka i cele pracy doktorskiej mgr. Michała Michalaka mieszczą się w jednym z niezwykle ważnych, bardzo aktualnych kierunków współczesnej biologii molekularnej roślin, do których bez wątplenia należy zaliczyć komórkowe, biochemiczne i molekularne aspekty sygnalizacji transportu pęcherzyków na szlaku egzocytotycznym, znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych związanych z regulacją transportu pęcherzykowego u roślin. U podstaw nieustającego i stale rosnącego zainteresowania tą tematyką leży z jednej strony ogromny, niespotykany wcześniej rozwój warsztatu badawczego, technik, narzędzi pozostających do dyspozycji naukowców, z drugiej zaś, będące tego konsekwencją, osiągnięcia poznawcze w dziedzinie fizjologii, biochemii, genetyki i biologii molekularnej, dotyczące strukturalnej i funkcjonalnej organizacji komórek roślin wyższych. Oczywiście, nadrzędną podstawą zainteresowań naukowców i praktyków tą tematyką jest potrzeba zidentyfikowania, scharakteryzowania i powiązania w logiczną, współgrającą całość mechanizmów odpowiedzialnych za regulację transportu pęcherzykowego u roślin. Pozwolę sobie w tym momencie na dygresję dotyczącą podejścia eksperymentalnego do tych i innych zagadnień biologii komórki. Zafascynowani technikami „omicznymi” (genomika, transkryptomika, proteomika itd.), wielu badaczy, szczególnie młodych, zaniedbuje weryfikację uzyskanych tą drogą wyników z „żywą rzeczywistością”, czy, jak niektórzy teraz mówią, z „*realem*”. Mgr Michalak nie popełnia tego „błędu”.

Problematyka badawcza, a w szczególności omawiane w tej rozprawie zagadnienia są doskonałą ilustracją złożoności, wieloaspektowości prac badawczych niezbędnych do precyzyjnego ustalenia istotnych dla całości zagadnienia struktur, ich chemicznej kompozycji, wzajemnych oddziaływań i powiązań, przepływu informacji. Wiem, że oceniana praca doktorska mgr. Michała Michalaka stanowi tylko pewien wycinek znacznie szerszych, poważnie już zaawansowanych badań nad tymi zagadnieniami, prowadzonych pod kierunkiem Profesora Przemysława Wojtaszka, a i także Dr Annę Kasprovicz-Maluśki – badań pod wieloma względami unikalnych na skalę międzynarodową. Wyniki badań zreferowanych w rozprawie stanowią uzupełnienie wiedzy zdobytej przez Zespół Profesora Wojtaszka w latach ubiegłych (czego wymiernym efektem są publikacje w renomowanych czasopismach naukowych) oraz kolejny etap poszerzania i pogłębiania wiedzy dotyczącej genetycznych i molekularnych aspektów biologii i metabolizmu komórek roślinnych.

*Streszczenie* przedstawione w dwóch wersjach językowych: polskiej i angielskiej zawiera wszystkie elementy niezbędne dla zapoznania się z tematyką, wykorzystanym warsztatem badawczym oraz uzyskanymi w toku realizacji rozprawy doktorskiej wynikami. Jest ono niewątpliwie świadectwem, że Doktorant posiada umiejętność zwięzłego przedstawiania skomplikowanych zagadnień..

*Wstęp* stanowi interesujące kompendium wiedzy dotyczącej zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy doktorskiej. W pierwszej części *Wstępu* Autor przedstawił informacje dotyczące roślinnego systemu błon wewnętrznych wydzielających stale komunikujące kompartmenty komórki. W kolejnym rozdziale Autor koncentruje się na roli jaką w transporcie pęcherzykowym odgrywają małe GTPazy.

Wstęp wydaje mi się szczególnie interesujący ze względu na klarowny układ, przedstawienie najważniejszych związanych z tematyką rozprawy zagadnień. Niewątpliwą zaletą tego rozdziału jest wielostronne omówienie poruszonych w nim zagadnień – czytelnik znajdzie tam informacje uzyskane w ostatnich latach przy wykorzystaniu najnowocześniejszych, molekularnych metod a omawiane zagadnienia ułożone są w spójną, logiczną całość, co niewątpliwie ułatwia zrozumienie złożonych mechanizmów i zależności między nimi.

*Cel pracy*, którym było znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych regulujących transport pęcherzykowy u roślin zawężono do szlaku sekrecyjnego – egzocytozy i przedstawiono w trzech punktach. Każda z wymienionych hipotez opatrzona została przez doktoranta krótkim komentarzem oraz wskazaniem jaki cel(e) postawił sobie Doktorant.

1. Sprawdzenie, czy wybrane białka-czynniki wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF (ARF-GEF) oddziałują z podjednostkami kompleksu egzocyst.
2. Opisanie roli niebadanych dotąd białek RIP, które uważa się za partnerów małych GTPaz ROP
3. Zbadanie, czy białka RIP pośredniczą w interakcji małych GTPaz ROP z ich efektorami z rodziny białek RIC oraz, czy same białka RIC mogą pośredniczyć w sygnalizacji GTPaz ROP do egzocystu.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań Doktorant przedstawił szereg bardzo interesujących wniosków. Należy podkreślić, że, w mojej opinii, wszystkie one są w pełni uprawnione i w pełni udokumentowane.

1. Po dokonaniu nadekspresji znakowanych fluorescencyjnie wybranych białek, podjednostek kompleksu egzocyst wspólnie z dużymi czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF (białek aktywujących GTPazy ARF, ARF-GEF) (badane białka obserwowano w protoplastach izolowanych z komórek

liści *Arabidopsis*) nie wykazano, aby obecne w przedziale sieci *trans* Golgiego białka BIG2 i BIG5 (ARF-GEF), kolokalizowały z podjednostkami egzocystu SEC6, SEC8 i EXO70A1. Autor nie wyklucza, że egzocyst bierze udział w pęcherzykowym transporcie zwrotnym białek do odpowiednich przedziałów, tym niemniej, związek między kompleksem egzocyst a białkami BIG, znany z komórek ssaków nie jest tak ewidentny lub nie zachował się u *Arabidopsis*.

2. Obserwacje białek RIP połączonych z białkami fluorescencyjnymi w protoplastach *Arabidopsis* wykazały, że wszystkie one są zasocjowane z mikrotubulami. Badane białka poddane koekspresji kolokalizowały z markerem mikrotubul MAP4, ale nie z markerem mikrofilamentów LifeAct. Za wiązanie mikrotubul przez białka RIP odpowiadała przede wszystkim ich domena N-końcowa, której usunięcie całkowicie zniosło lub mocno ograniczyło ich asocjację z cytoszkieletem. Autor wskazuje, że uzyskane przez Niego i innych badaczy wyniki są spójne dla całej rodziny białek RIP i bardziej odpowiadają wcześniejszym obserwacjom dotyczącym białka RIP3/MIDD1, niż białka ICR1. Autor podkreśla, że interesujące było zanikanie znakowania cytoszkieletu przez białka RIP w miarę rozrastania się domen w błonie protoplastów. Może to, jego zdaniem, oznaczać, że dochodziło do rozpadu mikrotubul spowodowanego nagromadzeniem w błonie aktywnych GTPaz ROP i sugeruje, że byłby to mechanizm zbliżony do lokalnego usuwania mikrotubul kortykalnych przez kompleks ROP11-MIDD1 opisany wcześniej przez innych badaczy. Mgr Michałak słusznie zauważa, że bez wyznakowania cytoszkieletu, nie można tego stwierdzić na pewno, tym bardziej, że dane z eksperymentów mikromacierzowych wskazują na odrębność RIP3/MIDD1 od pozostałych białek RIP.
3. Autor przyznaje, że koekspresja w protoplastach *Arabidopsis* białek RIP z wybranymi podjednostkami kompleksu egzocyst nie przyniosła spodziewanych rezultatów. Nie udało się zarejestrować kolokalizacji badanych białek. Tym niemniej stwierdzono, że widoczna w postaci punktowych skupień podjednostka SEC3A była połączona z mikrotubulami znakowanymi przez białko RIP5 i wspólnie z nimi przemieszczała się w protoplaście. Obserwowano też kolokalizację zasocjowanych z mikrotubulami białek ICR1 i SEC3A.
4. Ruch w komórce znakowanego białka SEC8 w postaci plamkowatych skupień nie był dotąd opisywany. Wielkość struktur i podobny charakter dynamiki do znakowanych przedziałów TGN, sugeruje, że SEC8 było obecne w przedziałach systemu błon wewnętrznych. Widoczne skupienia są większe niż pęcherzyki transportujące i istotnie, białko SEC8 wykryto w wielu kompartmentach błoniastych. Niewyjaśniony pozostaje mechanizm zarejestrowanego ruchu. Białko RIP5-EGFP służy jedynie za

znacznik mikrotubul kortykalnych. Możliwe jest, jak podkreśla Autor, że obserwowana struktura przemieszcza się wzdłuż niewyznakowanych mikrofilamentów. Pamiętać należy, że mikrotubule biorą udział w tworzeniu i utrzymywaniu przy błonie specyficznego przedziału nazwanego SmaCC/MASC – przedział ten zawiera białka charakterystyczne dla TGN, a także błonowe kompleksy syntazy celulozy ulegające z niego recykliczacji do błony.

5. Autor wykazał, że białka RIP z różną wydajnością, oddziałują ze wszystkimi badanymi GTPazami ROP. Wykorzystując pomiar czasu trwania fluorescencji ustalono, że ICR1 oddziałuje z białkami ROP najslabiej, a RIP5 najmocniej, a także że oddziaływanie ma miejsce w domenach błonowych tworzonych przez oba białka. Jak zauważa Autor obserwacja domen wskazuje na dwojakie zachowanie białek RIP. Obraz koekspresji ICR1 i RIP4 z GTPazami wskazuje na ich rekrutację przez białka RIP do cytoszkieletu i później do błony komórkowej. Z drugiej strony białka RIP2 i RIP5 w koekspresji z badanymi ROP bardzo słabo zaznaczały cytoszkielet, a tworzone wspólnie domeny błonowe były rozleglejsze. Podsumowując, nie udało się zrealizować pierwotnego pomysłu przypisania funkcji białkom RIP, dzięki ich sparowaniu z GTPazami ROP. Niemniej, powszechność oddziaływań RIP-ROP jest bardzo interesująca i najprawdopodobniej oznacza udział tych białek w całej sieci zależności międzybiałkowych skupionych wokół małych GTPaz ROP.
6. W ostatnim etapie badań Autor sprawdził, czy białka RIP mogą pośredniczyć w interakcji małych GTPaz ROP z ich efektorami. Z przeprowadzonej koekspresji znakowanych białek RIP z białkami RIC, wynika, że tylko białka RIC9 i RIC10 asocjują z RIP w domenach błonowych i na mikrotubulach. Obraz koekspresji przypominał ten obserwowany dla GTPaz ROP. Autor wskazuje, że istnieje pewna specyficzność białek RIP względem efektorów ROP. Stosunkowo niewiele wiadomo o białkach RIC9 i RIC10.

Należy podkreślić, że realizacja tych celów wymagała od Doktoranta przeprowadzenia złożonych, metodycznie trudnych, wieloetapowych, a często żmudnych i czasochłonnych doświadczeń z wykorzystaniem metod i technik molekularnych. Nie mam wątpliwości, że cele omawianej pracy doktorskiej należy uznać za ambitne, że ich realizacja wymagała od Doktoranta, obok opanowania i praktycznego zastosowania szerokiego zestawu metod, zdyscyplinowania i pomimo przychylności i pomocy wielu osób (patrz *Podziękowania*), benedyktyńskiej pracy laboratoryjnej a wreszcie, że przedstawione przez mgr. Michałaka wyniki badań w sposób istotny wzbogaciły naszą wiedzę nt. mechanizmów sygnalizacji regulującej spolaryzowany transport pęcherzyków u roślin..

Ważną częścią pracy doktorskiej mgr. Michała Michalaka jest rozdział zatytułowany *Dalsze perspektywy badawcze*. Z dużą przyjemnością odnotowałem w tej części pracy odpowiedzialne komentarze na temat jego własnych wyników, uprawnioną interpretację przyczyn niektórych trudności lub niepowodzeń, jak też, co bardzo ważne, sugestie dotyczące przyszłych badań. Ten rozdział rozprawy jest najlepszym świadectwem nie tylko bardzo dobrej znajomości przedmiotu oraz biegłości warsztatowej Doktoranta, ale także dojrzałości myślenia i umiejętności jasnego i logicznego artykułowania swoich przemyśleń.

Podsumowując tę część swojej opinii, pozostaję pełen uznania dla ogromu wykonanej przez Pana mgr. Michała Michalaka pracy, uzyskanych przez Niego wyników i w pełni uprawnionej ich interpretacji.

### **Końcowe uwagi ogólne**

1. Bardzo wysoko pod względem merytorycznym i formalnym oceniam napisany przez mgr. Michalaka *Wstęp* rozprawy doktorskiej oraz załączoną dokumentację.
2. Mogę z przyjemnością stwierdzić, że mgr Michalak w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanował bogaty, nowoczesny warsztat badawczy, który, jestem o tym przekonany, umożliwi Mu kontynuację pracy naukowej w laboratoriach biologii molekularnej roślin.
3. Uzyskane przez Doktoranta wyniki zasługują na uwagę badaczy zajmujących się tą tematyką, ich interpretacja jest w pełni uprawniona, a cała rozprawa doktorska zasługuje na najwyższe uznanie.

**Na zakończenie chciałbym jeszcze raz powtórzyć: rozprawę doktorską mgr. Michalaka oceniam jako właściwą pod względem formalnym i bardzo wartościową pod względem merytorycznym.**

**Wyrażając pogląd, że praca ta spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Michała Michalaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy i więcej niż poprawność formalną, o ile spełnione są inne wymogi, praca ta moim zdaniem zasługuje na stosowne, w ramach istniejących przepisów, wyróżnienie.**



Andrzej K. Kononowicz