

Poznań, 20.02.2018

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Filipa Mituły
Tytuł rozprawy: OKREŚLENIE ROLI KINAZY KASKADY MAP - MAPKKK18
W REGULACJI SYGNALIZACJI KWASU ABCYSYNOWEGO
U *ARABIDOPSIS THALIANA*
Promotor: Prof. UAM dr hab. Agnieszka Ludwików

Każdy żywy organizm posiada system przekazywania sygnałów, umożliwiający właściwą reakcję na zmieniające się warunki otoczenia. U organizmów eukariotycznych dominują tzw. wieloskładnikowe systemy regulacyjne. Przykładem tego typu systemów regulacyjnych są szlaki kinaz białkowych aktywowanych mitogenami MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein kinases*). Przekaz sygnału opiera się na fosforylacji białek w resztach serynowych (S), treoninowych (T) i tyrozynowych (Y). MAP kinazy tworzą u roślin rozbudowane ścieżki sygnałowe w formie kaskad. Kaskada kinaz MAP zbudowana jest z trzech poziomów. Transdukcja sygnału rozpoczyna się od aktywacji kinaz MAPKKK, które następnie fosforylują specyficzne MAPKK. Po aktywacji, MAPKK fosforylują kinazy MAPK, których celem aktywności jest szereg białek, w tym czynniki transkrypcyjne. Aktywacja kaskady kinaz MAP prowadzi do zmiany m.in. szeregu procesów komórkowych, takich jak ekspresja genów, regulacja podziałów komórkowych. Kinazy kaskad MAP są silnie zaangażowane w odpowiedź na stresy środowiskowe, zarówno o podłożu biotycznym, jak i abiotycznym. Jednym z fitohormonów silnie związanym z odpowiedzią na stresy środowiskowe jest kwas abscysynowy (ABA). ABA należy do grupy inhibitorów wzrostu i rozwoju, i powszechnie występuje w roślinach naczyniowych. Poziom ABA w komórce wpływa nie tylko na szereg procesów rozwojowych, takich jak kiełkowanie nasion oraz elongacja korzeni, ale również jest kluczowy w procesie zamykania aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres suszy i atak patogenów. Percepcja/efekt ABA jest możliwy m.in. dzięki wewnątrzkomórkowym receptorom PYL/PYR/RCAR (ang. *Pyrabactin Resistant/PYR-like/Regulatory Component of ABA Receptor*) i funkcjonowaniu tzw. rdzeniowego modułu ABA, w skład którego wchodzi także – fosfatazy PP2C grupy A (ang. *Protein Phosphatase 2C group A*) oraz kinazy SnRK grupy 2 (ang. *Sucrose Non-Fermenting Kinases, group 2*). Funkcjonowanie fosfataz białkowych 2C oraz kinaz SnRK2 jest powiązane bezpośrednio z poziomem ABA w komórce

roślinnej. Warto pamiętać, iż sygnałom ABA to ponad 500 różnych oddziaływań pomiędzy co najmniej 138 białkami i mimo, iż opisano kinazy MAP rekrutowane przez sygnalizację ABA, jednak nasza wiedza dotycząca kinaz MAPKKK zaangażowanych bezpośrednio w inicjujących transdukcję sygnału ABA pozostaje ograniczona.

Obiektem badań opisanym w rozprawie doktorskiej mgr. Filipa Mituły jest MAPKKK18. MAPKKK18 stanowi pierwszą spośród kinaz MAP rozpoczynających kaskadę, którą powiązano z odpowiedzią na ABA. W pracy podjęto próbę określenia mechanizmów regulujących aktywność MAPKKK18 oraz opisanie jej funkcji w regulacji procesów powiązanych z sygnalizacją ABA. Przeprowadzone badania wykazały, że (i) MAPKKK18 oddziałuje z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA, (ii) aktywność kinazowa MAPKKK18 jest specyficznie indukowana przez ABA, a w wyniku aktywacji (iii) MAPKKK18 jest eksportowana z jądra komórkowego do cytoplazmy. W niniejszej pracy badano również wpływ MAPKKK18 na znoszenie spoczynku nasion i zamykanie aparatów szparkowych, a także na regulację podziałów komórkowych w rozwoju komórek linii różnicowania szparek. To ostatnie odkrycie jest szczególnie eksponowane m.in. dlatego, że kaskady kinaz MAP odgrywają istotną rolę w regulacji procesu tworzenia aparatów szparkowych, a przykładem takiej kaskady jest szlak MAP YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6, która to jest jednym z głównych regulatorów procesu tworzenia aparatów szparkowych.

W toku pracy udowodniono rolę MAPKKK18 w regulacji procesu tworzenia szparek. Przeprowadzona analiza wykazała, m.in., że wyłączenie genu MAPKKK18 prowadzi do obniżenia ogólnej liczby komórek w epidermie, zarówno liczby aparatów szparkowych, jak i pozostałych komórek epidermalnych. Natomiast nadekspresja MAPKKK18 prowadzi do fenotypu odwrotnego, czyli zwiększenia liczby aparatów szparkowych, przy podobnej liczbie innych komórek epidermalnych. Co istotne w kontekście uzyskanych wyników z wykorzystaniem linii mutantów, także w genach kodujących kinazy ze szlaku MAP YODA (*mkk7*), postawiono hipotezę, że MAPKKK18 nie oddziałuje z elementami tej kaskady.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją poza technicznymi informacjami (spis treści i wykaz skrótów) streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty w sposób zwarty i rzeczowy opisują założenia, sposób realizacji oraz znaczenie badań. Wstęp szczegółowo i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia, takie jak:



kaskada sygnałowa ABA, kaskady kinaz MAP czy regulacja rozwoju aparatów szparkowych. Ta część tekstu uzupełniona jest poglądowymi ilustracjami (str. 17, 21, 24, 26 i 34). Następny rozdział to Założenia i Cel pracy z podziałem na zadania cząstkowe. Kolejne sekcje to: Materiały, Metody oraz Wyniki i Dyskusja. Całość zamyka jednostronicowe Podsumowanie, Wykaz rycin oraz Spis literatury. Do pracy nie dołączono materiałów w wersji elektronicznej.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Dobrym zabiegiem edytorskim jest zadbanie o wykaz skrótów (str.8) niemniej jednak jest on wybiórczy i niektóre ze skrótów obecnych w tekście nie figurują w wykazie (np. CDPK str.26 *Calcium-Dependent Protein Kinases*, START str.16 *Star-Related Lipid Transfer Domain* czy BiFC str. 12 Bimolecular Fluorescence Complementation) lub nie są rozwijane (np. SPCH, MUTE, FAMA, PP2c str. 20, 10 i wiele więcej). Niepotrzebne jest ciągle przywoływanie skrótów w tekście wraz z rozwinięciem niemalże na każdej stronie (np. GMC/GC str. 21 i to samo na 22). Czasem skróty są nieprecyzyjne np. RbohD (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein F*). Nie ma rażących błędów stylistycznych. Autor czasem dość swobodnie posługuje się żargonem pisząc np. „...aparaty szparkowe są bardziej zamknięte..” str.11, „...aktywność genów tych kinaz..” str.18, czy „wykres intensywności świecenia radioaktywnego fosforu..” str.58. Trafne wykorzystanie ilustracji we Wstępie choć różne odcienie niebieskiego na rysunku 1, wymagają wyjaśnienia w legendzie, w której można się też tylko domyślać, który panel jest A a który B str.17 to samo na rysunku 14 czy 11. Odnośniki do figur w tekście nie zawsze są dokładne np. rys.11B str. 62. Drobne literówki np. „Dawki związków użytą w eksperymencie..” str. 57. Zdarzają się błędne odniesienia fragmentów tekstu do danego rozdziału np. „Przygotowane immunokompleksy wykorzystano następnie do analiz aktywności kinazowej MAPKKK18, zgodnie z protokołem zamieszczonym w rozdziale 4.9.3 (Metody 4.9.3).” str.57. czy „Wiadomo, iż kaskada YODA-MKK7/MKK9-MPK3/MPK6 reguluje podziały komórek linii różnicowania szparek zarówno na wczesnych, jak i późniejszych etapach rozwoju epidermy (Lampard i wsp., 2009) - proces ten opisano szczegółowo w rozdziale 1.3 (Wstęp 1.3).” str.76. Warte podkreślenia są krótkie (parozdaniowe) podsumowania najistotniejszych rzeczy wynikających z uzyskanych rezultatów w sekcji Wyniki składające się w logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy i ułatwiające ich zapamiętanie. Całość rozprawy to 120 stron tekstu,

24 ryciny (choć niektóre z nich to wykresy inne zdjęcia a reszta to rysunki), 7 tabel, 234 cytowane publikacje.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pracy doktorskiej mgr. Filipa Mituły wyodrębnić można siedem zasadniczych części. Pierwszą z nich jest Wstęp, który Autor rozpoczyna od opisu roli ABA w regulacji szeregu procesów rozwojowych. Szczególny nacisk kładzie na rolę ABA w modulacji odpowiedzi roślin na stres suszy poprzez udział w akumulacji substancji pomocniczych, regulacji potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w komórce oraz modulacji apertury aparatów szparkowych. Tym ostatnim poświęca cały podrozdział 1.2 szczegółowo opisując rozwój aparatu szparkowego z uwzględnieniem molekularnych determinant warunkujących powstanie tych unikalnych komórek. Drugą znaczącą część Wstępu stanowi opis kaskad(y) kinaz(y) MAP. Uwzględnia jej złożoność, przytacza przykłady te opisane i najważniejsze dla zrozumienia znaczenia prezentowanych wyników. Omówione zostają wszystkie trzy poziomy kaskady MAP głównie pod kątem sygnałom ABA i genezy/funkcjonowania aparatów szparkowych. Kinazy MAPKKK to głównie (co uzasadnione) MAPKKK18 i 17 (podrozdział 1.4.1.1). Obie kinazy charakteryzuje wysokie podobieństwo sekwencji na poziomie białka i obie należą do podgrupy MEKK. MAPKKK18 wyróżnia się spośród pozostałych członków podgrupy MEKK brakiem charakterystycznej domeny regulatorowej na N-końcu sekwencji, przez co białko składa się prawie wyłącznie z domeny katalitycznej. Kompozycja, zawartość, aktualność prezentowanych informacji sprawiają, iż Wstęp jest bardzo solidną częścią rozprawy dobrze przygotowującą czytelnika na odbiór i interpretację wyników.

Kolejna część rozprawy to Założenia i Cel pracy. Tutaj zabrakło precyzji. Niektóre fragmenty tekstu są właściwie jak ze Wstępu. Znow słów kilka o tym, że ABA jest ważny itp. potem o głównym (poznanie ścieżki sygnałowej regulowanej przez MAPKKK18) celu (w domyśle - są inne) następnie o dwóch zagadnieniach, a na koniec informacja, że aby osiągnąć wyznaczone cele realizowano opisane zadania. Trochę zawile.

Dalszą część rozprawy stanowi opis Materiałów i Metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to 20 stron. W dużej mierze opis ten dotyczy klonowań różnych wariantów badanych białek, transformacji mikroorganizmów oraz materiału roślinnego, a także specjalistycznych testów jak analizy ruchów aparatów szparkowych czy ich zagęszczenia oraz badanie aktywności kinazowej.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki badań. W podrozdziale 5.1 autor bada wpływ hormonów roślinnych na aktywność kinazową MAPKKK18. Wybór molekuł sygnałowych jest arbitralny i chciałbym poprosić o komentarz dotyczący jego kryteriów. Mając na uwadze proces kiełkowania, dlaczego nie testowano np. giberelin? Z przedstawionych wyników (rysunek 10 str. 60) wynika, że obecność MAPKKK18 pozytywnie wpływa na kiełkowanie nasion w obecności ABA. Mając na uwadze, iż ABA kontroluje spoczynek nasion oraz jest negatywnym regulatorem kiełkowania jak skomentuje Pan zdanie: " Otrzymany wynik pozwala stwierdzić, że MAPKKK18 funkcjonuje jako pozytywny regulator sygnalizacji ABA podczas kiełkowania u Arabidopsis." str. 61. Fragmenty tekstu w podrozdziale 5.3 dedykowanemu opisowi wpływu aktywności MAPKKK18 na ruchy aparatów szparkowych (linie 10-23) mogłyby swobodnie trafić do Wstępu. Jak definiuje Pan warunki normalne eksperymentu (linia 1 od dołu str. 61)? Solidna jest część pracy dedykowana lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18 i jej zmianom pod wpływem ABA. Trochę szkoda, że nie ma obrazów kontrolnych (metanol, rys. 13, str. 66). Ta część wyników to konsekwentnie i logicznie zbudowany/zaprezentowany zbiór pokazujący, iż ABA reguluje lokalizację komórkową MAPKKK18 i, że pod wpływem ABA MAPKKK18 jest aktywnie eksportowana z jądra komórkowego przez por jądrowy. Mając na uwadze losy/lokalizację w komórce MAPKKK18 nasuwa się pytanie ogólnej natury, czy w ogóle i jak na to może wpływać unikalny fakt braku domeny regulatorowej na N-końcu sekwencji tego białka? Bardzo ciekawe/intrygujące są wyniki pokazujące fizyczne oddziaływanie MAPKKK18 z elementami kaskady sygnałowej ABA czy też innymi MAP kinazami. Chciałem w tym momencie poprosić o komentarz, na ile ograniczeniem w poszukiwaniu takich interakcji między nimi może być używany model eksperymentalny (nadekspresja w protoplastach) i czy są alternatywne rozwiązania dla niego oraz dlaczego brak w tych eksperymentach kontroli np. pS6C1C-MAPKKK18/pS6C4N czy pS6C1C/ SnRK2.6-pS6C4N? Wyniki zamykają dane ilustrujące udział MAPKKK18 w regulacji podziałów komórek linii różnicowania szparek w epidermie liścieni Arabidopsis. Dane te uzyskane m.in. z analizy linii mutantów *mkk7* i *mkk7mapkkk18-1* pozwalają przypuszczać, że regulacja procesu tworzenia szparek przez MAPKKK18 jest niezależną ścieżką od kaskady YODA-MKK7.

Podsumowując wyniki warto w tym momencie podkreślić, iż wraz z dwoma publikacjami będącymi współudziałem Pana Między kompleksowo ukazują spektrum procesów regulowanych przez MAPKKK18 poprzez ścieżki sygnalizacyjne ABA i stanowią



ważny wkład w poznanie mechanizmów transdukcji sygnału ABA poprzez kaskady kinaz MAP u Arabidopsis.

Rozprawę zamyka rozdział Dyskusja i krótkie Podsumowanie. Dyskusja jest rozdziałem zwartym, nie „przegadany”, bardzo dobrze uzupełniającym całość dysertacji. Zawiera informacje o niemalże każdym aspekcie pracy. Nie jest to jednak tylko opis. To refleksja, która wyraźnie odzwierciedla świadomość mgr. Mituły o złożoności zjawiska biologicznego, które bada. Widać to w kontekście komentarza znaczenia/obserwacji oddziaływań MAPKKK18 z elementami kaskady sygnałowej ABA i propozycji działania rdzeniowej sygnalizacji ABA, uwzględniające istnienie kaskady MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14 (rys. 23).

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Może troszeczkę brakuje aspektu/wyników/komentarza o potencjalnym udziale MAPKKK18 w regulacji procesów morfogenetycznych korzenia w odpowiedzi na np. stres suszy, tym bardziej, że wyniku aplikacji egzogenego ABA obserwuje się aktywność promotora genu MAPKKK18 w merytemach wierzchołkowych korzeni. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy a także publikacje będące owocem pracy Pana Mituły pozwalają sądzić, że jej Autor jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką i ugruntowaną wiedzę. Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Filipa Mituły do dalszych etapów przewodu.

