



ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centrala 61 6550200, sekretariat 61 6550255, E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl

Agnieszka Kielbowicz-Matuk, dr hab.
Zakład Regulacji Ekspresji Genów
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, 13 stycznia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

**Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej
pod tytułem „Charakterystyka mechanizmu degradacji kinazy kaskady MAP – MAPKKK18
zależnej od proteasomu“**

Podstawy formalne wydania recenzji

Recenzję pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej opracowano na podstawie uchwały rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu z dnia 13 grudnia 2019 r., jak również pisma Dziekana Wydziału Biologii Pani prof. UAM dr hab. Beaty Messyasz z dnia 9 listopada 2021 r.

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Panią mgr Małgorzatę Tajdel-Zielińską wykonana została w Pracowni Biotechnologii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką promotora prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików. Część przedstawionych w rozprawie wyników badań została już opublikowana w dwóch czasopismach naukowych: *Plant and Cell Physiology* (2015) i *Plant Signaling & Behavior* (2018), w których Doktorantka występuje kolejno jako drugi autor oraz autor wiodący (pierwszy).

Przedmiot rozprawy doktorskiej i celowość podjęcia tematu badawczego

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej jest charakterystyka kaskady kinaz MAP rozpoczynającej się od aktywowanej przez kwas absycynowy (ABA) kinazy MAPKKK18 oraz poznanie mechanizmów zaangażowanych w regulację jej aktywności i stabilności. Kaskady kinaz MAP stanowią jeden z kluczowych modułów sygnalizacyjnych umożliwiających efektywne przystosowanie się organizmów roślinnych do zmian zachodzących w środowisku zewnętrznym. Ponadto, są ważnymi elementami sygnalizacji jednego z głównych hormonów roślinnych, kwasu absycynowego, zaangażowanego w regulację odpowiedzi

roślin na stres. Do tej pory zidentyfikowano i scharakteryzowano tylko kilka trójpoziomowych kaskad kinaz MAP u *A. thaliana*, podczas gdy rola wielu komponentów uczestniczących w szlakach sygnalizacyjnych, w tym w przekazywaniu sygnału ABA, nadal pozostaje nieznana.

W swojej pracy Doktorantka podjęła się ambitnego zadania głębszego poznania i eksploracji ścieżki sygnałowej ABA-aktywowanej kinazy MAPKKK18 u *Arabidopsis thaliana*. Biorąc pod uwagę, udział kwasu abscysynowego w regulacji szeregu różnorodnych procesów m. in. kiełkowaniu nasion, elongacji korzeni, powstawaniu i ruchów aparatów szparkowych, kompleksowe poznanie szlaku transdukcji sygnału ABA, istotnych komponentów tego zhierarchizowanego układu, jak również mechanizmów regulujących ich wzajemne zależności, z całą pewnością przyczyni się do lepszego poznania molekularnych podstaw przekazywania zewnątrzkomórkowych sygnałów z udziałem efektorów ABA. Niewątpliwie tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej jest bardzo ważna i wpisuje się w aktualny nurt badań.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem obejmującym 166 stron tekstu w języku polskim, ilustrowanego 31 rysunkami i zawierającego 23 tabele. Spis cytowanej literatury jest bardzo obszerny i obejmuje 389 pozycji. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich. Przedłożona praca składa się ze Streszczenia (w języku polskim i angielskim), poprzedzającego wykaz stosowanych skrótów, Wstępu, Materiałów i metod, Wyników oraz Dyskusji. Całość zamyka (poza spisem rysunków i tabel) zwięzłe Podsumowanie, w którym Doktorantka zawarła najważniejsze wyniki uzyskane podczas realizacji pracy i ponownie podkreśliła celowość prowadzonych badań. Na uwagę zasługuje nakreślenie przez Doktorantkę dalszych perspektyw badawczych, w których wskazuje deficyty i możliwości nowych badań naukowych. Przyznam, że w rozprawie zabrakło mi wniosków końcowych, sformułowanych w oparciu o uzyskane interesujące i nowatorskie wyniki.

Pomimo, że praca została napisana prawidłowo pod względem stylistycznym, Autorka nie ustrzegła się nielicznych niedoskonałości językowych. Niektóre mają charakter błędów literowych, inne są wynikiem stosowania żargonu laboratoryjnego, np. na str. 19 skrót GDLP powinien być zastąpiony skrótem GDSL, na str. 20 termin „stres zimna” powinien zastąpić „stres chłodu”, na str. 22 zwrot „infekcji grzybiczej” powinien być zamieniony na „infekcji grzybiczej lub grzybowej”, na stronach 23 i 25 „zwiększenie transkrypcji” odnosi się zapewne do „zwiększenia poziomu transkryptu”, na str. 34 „funkcje pełnione przez ubikwitynację białek roślinnych” należy rozumieć jako „funkcje pełnione przez białka roślinne pod wpływem ubikwitynacji”, a „prążki widoczne na blotach” to „produkty białkowe” (str. 101, 107, 109). Dodatkowo, na str. 45 należało zapisać, że ABI1 może być ubikwitynowane przez PUB12 i PUB13. W tekście na str. 84 powinno być odwołanie do Tabeli 16 (a nie do Tabeli 1), natomiast sformułowanie „konstrukty wektorowe niosące geny kinaz MAP” jest nieprecyzyjne (str. 94).

Pragnę podkreślić, że wskazane usterki, które z racji obowiązku musiałam wykazać, nie wpływają na moją pozytywną ocenę formalną pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Oceniając rozprawę pod względem merytorycznym z całą pewnością stwierdzam, że zarówno zaplanowane badania, selekcja metod badawczych, przeprowadzenie i interpretacja uzyskanych wyników nie budzą zastrzeżeń.

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka, zgłębiając najnowsze doniesienia literaturowe, w bardzo przejrzysty i wyczerpujący sposób opisała mechanizmy regulacji transdukcji sygnału poprzez kaskady kinaz MAP u *Arabidopsis thaliana*, ze szczególnym uwzględnieniem kompletnych trójpoziomowych kaskad kinaz MAP i ich roli w wewnątrzkomórkowej sygnalizacji u roślin, w tym w procesie tworzenia aparatów szparkowych. Wyjątkowe miejsce w tej części rozprawy, mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska poświęciła charakterystyce kaskady MAPKKK18/MAPKKK17-MKK3-MPK1/2/7/14, rozpoczynającej się od kinazy MAPKKK18, która jest przedmiotem badań Doktorantki. W kolejnych podrozdziałach mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska omówiła zagadnienia związane z selektywną degradacją białek przez komórkowy ‘system sprzątający’ ubikwityna-proteasom 26 S, jak również z percepcją i przekazywaniem sygnału ABA. Bez wątpienia tak skonstruowany Wstęp wskazuje nie tylko na obszerną wiedzę, którą posiadała Doktorantka, ale również na Jej dojrzałość w dokonywaniu właściwej selekcji w kontekście podjętych badań.

W tej części rozprawy znalazłam dwa uchybienia.

- W rozdziale 4.1.1. Autorka wskazuje, że genom *A. thaliana* zawiera 80 genów *MAPKKK*, których produkty białkowe są klasyfikowane na trzy główne podrodziny: kinazy MEKK, kinazy Raf i kinazy ZIK (4.1.1.1.). Jednakże łączna liczba członków w poszczególnych podrodzinach (89) jest rozbieżna ze wskazaną łączną liczbą genów *MAPKKK* (80) oraz z liczbą genów *MAPKKK* zamieszczoną na Rysunku 1 (79).
- W podrozdziale 4.1.1.2. Doktorantka wskazuje, że grupa A kinaz *MAPKK* u *A. thaliana* obejmuje cztery kinazy, podczas gdy w tej grupie występuje tylko trzech przedstawicieli, których Autorka wyszczególnia w tekście oraz na Rysunku 1.

Bez wątpienia wskazane przeze mnie śladowe nieścisłości nie wpływają na fakt, że lektura Wstępu należała do przyjemności, co jest zasługą dogłębnego poznania tematyki przez Doktorantkę.

Cel pracy jest jasno i precyzyjnie sformułowany, a jego ranga jest adekwatna dla rozprawy doktorskiej. Dodatkowo, Doktorantka skrupulatnie wytyczyła pięć zadań badawczych, których realizacja przybliżyła Ją do osiągnięcia wyznaczonego celu. Szkoda, że dysponując wcześniejszymi wynikami badań uzyskanymi w Pracowni Biotechnologii oraz rozległą wiedzą, która została zaprezentowana we Wstępie, Doktorantka nie pokusiła się o sformułowanie hipotezy badawczej, której prawdziwość mogłaby poddać ocenie w oparciu o uzyskane wyniki badań.

Rozdział „Materiały i metody” jest poświęcony zastosowanej metodyce badawczej, opisowi materiału do badań, odczynników i licznych konstruktów wektorowych oraz wykorzystanych narzędzi bioinformatycznych. Struktura tego rozdziału jest typowa dla tego rodzaju prac. Na uwagę zasługuje duża liczba metod badawczych, które zostały opanowane przez Doktorantkę podczas realizacji pracy. Nie napotkałam jedynie na opis warunków hodowli dla *Nicotiana benthamiana* i opis metodyki ekstrakcji białek z tkanek roślinnych, a moją ciekawość wzbudził termin „roztwór do zasilania roślin” (str. 52).

Kolejny rozdział „Wyniki” przedstawiono w pięciu podrozdziałach, w których mgr Małgorzata Tajdel-Zielińska w przemyślany sposób prezentuje uzyskane efekty doświadczeń podczas realizacji kolejnych zadań badawczych. Każdy omówiony etap badań rozpoczyna się od wskazania celowości jego wykonania, co ułatwia zrozumienie wybranej przez Doktorantkę ścieżki eksperymentalnej, a kończy się krótkim podsumowaniem otrzymanych wyników. Taka umiejętność delegowania zadań doskonale odzwierciedla naukowy rozwój Doktorantki. Skrupulatny opis

doświadczeń wzbogacony 15 rysunkami i 8 tabelami jest kompletny i nie budzi większych zastrzeżeń.

Pytania i uwagi dotyczące Wyników rozprawy:

1. Doktorantka zidentyfikowała liczne białka powiązane z różnymi procesami komórkowymi potencjalnie wchodzące w skład kompleksów białkowych MAPKKK18 z zastosowaniem ekspresji przejściowej w liściach *N. benthamiana* oraz techniki GST-pull down z ekstraktami białkowymi z *A. thaliana*. Zastanawiającym jest fakt, że wśród białek zidentyfikowanych na drodze spektrometrii mas w kompleksach HIS-GFP-MAPKKK18 znalazły się tylko dwie kinazy, podczas gdy w kompleksach GST-MAPKKK18 zidentyfikowano ich sześć (co więcej, nie są one tożsame z dwoma wspomnianymi).
2. Wcześniejsze badania Zespołu wykazały, że kinaza MAPKKK18 jest zlokalizowana w jądrze komórkowym, a w wyniku indukcji ABA następuje zmiana jej lokalizacji subkomórkowej i eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób ekstrahowano białka z tkanek roślinnych *N. benthamiana* i *A. thaliana* (nie znalazłam tej informacji w metodyce pracy). Czy do analizy GST-pull down białka GST-MAPKKK18 z ekstraktami białkowymi z *A. thaliana* wykorzystywano ekstrakty białkowe wzbogacone we frakcję białek cytozolowych lub jądrowych, co zapewne pozwoliłoby zminimalizować zidentyfikowaną grupę białek potencjalnie wchodzących w skład kompleksów białkowych MAPKKK18?
3. Celem identyfikacji kinazy MKK oddziałującej z MAPKKK18 z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego w Zakładzie Biotechnologii przygotowano odpowiednie konstrukcje wektorowe, które umożliwiały produkcję badanego białka w fuzji z domeną aktywującą (AD) czynnika transkrypcyjnego Gal4 oraz w fuzji z domeną wiążącą DNA (BD) czynnika transkrypcyjnego Gal4. Przyznam, że w tym miejscu zauważyłam niezgodność, gdyż opis przygotowanych konstrukcji wektorowych na str. 94 nie jest w pełni kompatybilny z opisem Rysunku 14. Czym kierowała się Doktorantka decydując o wyborze domeny (aktywująca lub wiążąca DNA) połączonej z sekwencją kodującą genu dla konkretnej kinazy np. kinazy MAPKKK18, będącej przedmiotem zainteresowania Doktorantki? Bezpośrednie oddziaływanie odnotowano wyłącznie pomiędzy MAPKKK18 i MKK3, a tylko w tym przypadku (zgodnie z rysunkiem 14) sekwencja kodująca genu *MAPKKK18* była połączona z domeną BD. Uprzejmie proszę Doktorantkę o krótki komentarz. Dodatkowo, proszę o weryfikację oddziaływania pomiędzy MAPKKK18-AD i MKK5-AD (rysunek 14).
4. W swoich badaniach Doktorantka udowodniła, że kinaza MAPKKK18 bezpośrednio oddziałuje z kinazą SnRK2.6. Biorąc pod uwagę, że rola kinaz SnRK2 w procesach fosforylacji, które są kluczowe w sygnalizacji ABA jest poznana, warto byłoby sprawdzić oddziaływanie pomiędzy MAPKKK18 a inną kinazą sygnalizacji ABA, SnRK2.2, która została zidentyfikowana przez Doktorantkę w kompleksach HIS-GFP-MAPKKK18.

Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższych uwag i udzielenie odpowiedzi na zadane pytania podczas publicznej obrony.

Z całą pewnością do **najważniejszych osiągnięć** prowadzonych przez Doktorantkę badań należą:

1. Wykazanie, że kinaza MAPKKK18 bezpośrednio oddziałuje z kinazą MKK3 oraz fosfatazą białkową ABI1 w warunkach *in vivo* i *in vitro* oraz z innym białkiem kompleksu podstawowej sygnalizacji ABA – kinazą SnRK2.6 w warunkach *in vitro*.
2. Zidentyfikowanie reszty lizynowej w pozycji 154 determinującej stabilność białka MAPKKK18.
3. Wykazanie, że kinaza MAPKKK18 bezpośrednio oddziałuje z fragmentami ligazy ubikwityny Keep on Going (KEG) w warunkach *in vitro*.
4. Zidentyfikowanie ligaz ubikwityny UPL1 i UPL4 zaangażowanych w proteasomalną degradację białka MAPKKK18.
5. Wykazanie udziału kinaz MKK3 i MAPKKK18 w rozwoju aparatów szparkowych zarówno we wczesnych, jak i późniejszych etapach rozwoju roślin.

Rozdział „Dyskusja” jest wszechstronnym opracowaniem, w którym Doktorantka stosownie, unikając nadinterpretacji, zestawia otrzymane wyniki własne z danymi literaturowymi odnoszącymi się zasadniczo do roli kinazy MAPKKK18 w sygnalizacji kwasu absycynowego oraz procesie rozwoju aparatów szparkowych. Niewątpliwie, czytałam go z dużym zainteresowaniem.

Pod względem merytorycznym przedłożoną do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Projekt rozprawy doktorskiej jest przemyślany i poprawnie zrealizowany.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz nowatorski charakter uzyskanych wyników wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Tajdel-Zielińskiej stosowną nagrodą.

Kielbowicz-Matuk Agnieszka

dr hab. Agnieszka Kielbowicz-Matuk