

Poznań, 12.07.2017

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Michała Michalaka
Tytuł rozprawy: ODDZIAŁYWANIA BIAŁKO-BIAŁKO W
KOMPLEKSACH
REGULUJĄCYCH TRANSPORT PĘCHERZYKOWY U ROŚLIN
Promotor: Prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek

Struktura komórki roślinnej jest niezwykle dynamiczna. Jej elementy składowe komunikują się ze sobą, także z wykorzystaniem niewielkich lipidowych pęcherzyków transportujących. Operatywny system błon nieustannie się przekształca i wbrew pozorom jest to proces bardzo kontrolowany. Ruch kompartmentów i pęcherzyków jest realizowany przez białka motoryczne wzdłuż włókien cytoszkieletu, głównie mikrofilamentów i podlega ścisłej kontroli dzięki ogromnej populacji białek regulatorowych – małych GTPaz. Białka te mają zdolność łatwego przechodzenia pomiędzy stanem aktywnym i nieaktywnym, dzięki czemu wydajnie uruchamiają i zatrzymują różne procesy oddziałując z białkami efektorowymi. Jednym ze szlaków komunikacyjnych wykorzystujących pęcherzyki lipidowe jest egzocytoza. Jest to proces polegający na transporcie pęcherzyków lipidowych z wnętrza komórki i ich połączeniu z błoną komórkową. Zawartość pęcherzyków wydzielana jest w ten sposób poza komórkę, natomiast błona pęcherzyka, w której jest zawartych wiele białek, jest włączana do błony komórkowej. W ten sposób komórki zmieniają skład białek i lipidów błony, a także dostarczają poza komórkę niezbędne składniki matrix zewnątrzkomórkowej. Na szlaku egzocytozy kompleksem wielobiałkowym odpowiedzialnym za utrzymywanie pęcherzyków w pobliżu błony komórkowej jest egzocyst. Głównym zadaniem tego kompleksu jest przyciągnięcie pęcherzyka w pobliże błony komórkowej, po czym kolejne kompleksy białkowe łączą pęcherzyk z błoną. U roślin odkryto powielenie większości genów kodujących podjednostki egzocystu, podczas gdy u innych organizmów eukariotycznych każda reprezentowana jest przez pojedynczy gen. Podobnemu powieleniu uległy także geny kodujące GTPazy roślinne. Wiedza na temat kompletnych szlaków sygnałowych związanych z roślinną egzocytozą jest ciągle niepełna a poznanie interakcji międzybiałkowych prowadzących do formowania kompleksu egzocystu pozostaje wielkim wyzwaniem biologii eksperymentalnej.

Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej mgr. Michała Michalaka miały na celu znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych związanych z regulacją transportu pęcherzykowego u roślin. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły m.in. ustalić, że u *Arabidopsis thaliana* nie dochodzi do oddziaływań między podjednostkami kompleksu egzocyst a czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF (ang. ADP-Ribosylation Factor) z tzw. grupy BIG i te ostatnie nie są najprawdopodobniej powiązane bezpośrednio z egzocystem.

Ciekawe otwarcie stanowią wyniki dotyczące białek RIP (ang. Rop Interactive Partner). Te ostatnie pełnią przypuszczalnie funkcję białek adaptorowych i regulatorowych i nie mają one swoich odpowiedników ani u drożdży, ani u zwierząt. W protoplastach *Arabidopsis thaliana* białko ICR1 (ang. Interactor of Constitutive Active Rop1/Rop Interactive Partner1), wiązało się z mikrotubulami, czego nie zauważono we wcześniejszych badaniach. Podobnie, wszystkie białka z rodziny RIP/ICR (RIP2-RIP5) okazały się być białkami zasocjowanymi z mikrotubulami. Taką właściwość przypisano jak dotąd jedynie białku RIP3. Dzięki badaniom ustalono m.in., że za wiązanie cytoszkieletu odpowiedzialna jest domena N-końcowa tych białek, natomiast fragment C-końcowy umożliwia łączenie się białek RIP z błoną komórkową. Białka RIP wiążąc jednocześnie mikrotubule, błonę komórkową i małe GTPazy ROP mogą być potencjalnie istotne dla sygnalizacji regulującej spolaryzowany transport pęcherzykowy u roślin. Prezentowana praca doktorska stanowi dobry wstęp do dalszych analiz, które mogą rozjaśnić zawile aspekty spolaryzowanego wzrostu i rozwoju komórek *Arabidopsis*.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją Streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty w sposób zwarty i rzeczowy opisują założenia, sposób realizacji oraz znaczenie badań. Wstęp selektywnie wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia, takie jak: roślinny system błon wewnętrznych czy mechanizmy kontroli transportu pęcherzykowego. Autor poświęca w nim szczególną uwagę białkom zaangażowanym w kaskady sygnałowe (np. GTPazyARF, GTPazyROP czy białka RIP). Ta część tekstu uzupełniona jest poglądowymi rysunkami (str. 13, 16 i 21). Następny rozdział to precyzyjnie zdefiniowany cel pracy z podziałem na zadania cząstkowe. Kolejne sekcje to: Materiały i Metody oraz Wyniki i Dyskusja. Ta ostatnia sekcja ma swoje podsumowanie (str.83). Autor dzieli się także

perspektywami badawczymi (str. 88), a rozprawę zamykają Spis literatury oraz Wykaz skrótów. Do pracy dołączono materiały w wersji elektronicznej w tym filmy obrazujące dynamikę oddziaływań białek.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Mimo znacznej ilości nazw białek (często w skróconej formie zapożyczonych z języka angielskiego) autor starannie utrzymuje uwagę czytelnika na ich wzajemnych relacjach. Dobrym zabiegiem edytorskim jest zadbanie o wykaz skrótów (str.95) nie mniej jednak jest on wybiórczy i szereg skrótów obecnych w tekście nie figuruje w wykazie (np. DRM (ang. detergent resistant membranes) str.20, AVR1 (ang. avirulence factor 1) str. 17, ABP1 (ang. auxin binding protein 1) str. 22 i 75). Nie ma rażących błędów stylistycznych. Autor czasem dość swobodnie posługuje się żargonem laboratoryjnym np. „plazmid z wstawką” str. 4, „namnożono pożądaną plazmid” str. 40. Trafne wykorzystanie wtrąconych tabel z sekwencjami oligonukleotydów w sekcji Materiały i Metody oraz bardzo pomocna poglądowa rycina 6 (str. 43). Niewątpliwie mocną stroną pracy są obrazy. Kolor na obrazie jest oczywiście zabiegiem sztucznym/graficznym ułatwiającym interpretację tego co widzimy, niemniej jednak pewna konsekwencja w jego stosowaniu jest wskazana. Nie rozumiem kolorystyki panelu B na rycinie 10. Dlaczego MAP4 jest tam czerwone a LifeAct fioletowa? Interpretacja artystyczna/zastosowanie kolorów jest dość swobodne np. nałożeniem czego z czym jest kolor turkusowy na rycinie 16 i 17. Generalnie informacja (np. sposób wyznakowania, rodzaj materiału itp.) w legendzie do rycin winna być wystarczająca do jej interpretacji. Jeśli tak nie jest to pojawia się adnotacja o opisie w tekście. Rzeczywiście w przypadku kilku rycin tak jest (np.11,13,22,23) jednak dla szeregu z nich legendy takich informacji nie posiadają a są autorską interpretacją tego czego powinniśmy się po nich spodziewać np. ryciny 10, 18 czy 19. Jak autor definiuje określenie : „, przykładowe obrazy czasu trwania” rycina 18? Niektóre z rycin np. 22 i 23 a zwłaszcza ich opisy mogłyby być zdecydowanie większe. Całość rozprawy to 96 stron tekstu, 23 ryciny, 5 wykresów, 3 tabele, 92 cytowane publikacje.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pracy doktorskiej mgr. Michała Michalaka wyodrębnić można sześć zasadniczych części. Pierwszą z nich jest Wstęp, który Autor rozpoczyna od opisu systemu błon wewnętrznych komórek eukariotycznych zwracając uwagę na obecność oplaszczonych lub

pozbawionych płaszcza pęcherzyków kursujących między nimi. Przejrzyście podkreśla fakt, iż poszczególne kompartmenty są odrębne morfologicznie, ale przenikają się funkcjonalnie. Co więcej wykazują one wielopoziomową dynamikę. Dynamika systemu błon wewnętrznych zależy od cytoszkieletu i jemu także poświęcony jest jeden z podrozdziałów Wstępu. Dużo uwagi poświęcono roślinnemu kompleksowi egzocyst, który ustanawia przestrzenną i czasową kontrolę egzocytozy. Jest to kluczowy fragment dla zrozumienia serii wyników i mimo złożoności zagadnienia (komórka roślinna jest w stanie formować wiele kompleksów egzocyst o zróżnicowanym składzie podjednostkowym) autor dobrze ilustruje z jednej strony komplikacje roślinnych szlaków sekrecyjnych, z drugiej ich znaczenie dla pełnienia swoistych zadań. Najważniejszą, moim zdaniem, część Wstępu stanowią podrozdziały dotyczące białek sprawujących czasoprzestrzenną kontrolę nad transportem pęcherzykowym. Jest to logicznie ułożona seria informacji o odpowiednio: GTPazach ARF, ROP oraz białkach RIP uczestniczących w sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ROP. W ogólnej natury Wstępie, bezsprzecznie solidnym biologicznie, może brakować trochę podstaw/informacji technicznych o metodach obrazowania czy np. analizach czasu trwania fluorescencji FLIM (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy) wykorzystywanych w analizach kompleksów/oddziaływań białkowych.

Cel pracy Autor definiuje jako znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych regulujących transport pęcherzykowy u roślin, jednocześnie zwiężając zakres poszukiwań do szlaku sekrecyjnego – egzocytozy. Jego osiągnięcie rozpisano na trzy logiczne kroki: (i) Sprawdzenie, czy wybrane białka-czynniki wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF oddziałują z podjednostkami kompleksu egzocyst, (ii) Opisanie roli niebadanych dotąd białek RIP, (iii) Zbadanie, czy białka RIP pośredniczą w spotkaniach małych GTPaz ROP z ich efektorami.

Kolejną część rozprawy stanowi opis Materiałów i Metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to solidne/rzetelne 21 stron. W dużej mierze opis ten dotyczy klonowań różnych wariantów badanych białek, transformacji mikroorganizmów oraz materiału roślinnego a także specyfikacji parametrów obserwacji preparatów mikroskopowych i rejestracji obrazów.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki badań. Te w pracy połączono z dyskusją i uważam to za dobry zabieg. Sentencja- zobaczyć to uwierzyć- dobrze definiuje wyniki pracy określające rolę domen N i C końcowej obecnych/zachowawczych u białek RIP. Domeny te odpowiedzialne są odpowiednio za powiązanie z mikrotubulami (N) oraz asocjację z błoną komórkową i

podjednostką SEC3A egzocystu (C). Mimo iż zależności pomiędzy domenami a miejscem przyłączenia białek RIP opisano wcześniej dla wybranych przedstawicieli (np. RIP3) i były one przewidywalne, trzeba je było pokazać i jest to niewątpliwie autorski wkład mgr. Michałaka w wiedzę o białkach RIP u *Arabidopsis*.

Znacząca jest, w moim odczuciu, obserwacja specyficzności oddziaływań RIP-egzocyst (nie udało się znaleźć dowodów na oddziaływanie innych niż ICR1 białek z rodziny RIP z podjednostkami egzocystu - SEC3A) i brak ogólnej tendencji tych białek do asocjacji, jak ma to miejsce na przykład w przypadku oddziaływań RIP-ROP. Jak w kontekście takiego założenia należałoby zinterpretować stwierdzenie : „Wydaje się, że specyficzność działania białek RIP zależy właśnie od ich regulatorów, m. in. małych GTPaz ROP, z którymi oddziałują „ (str.71)? Czy i w jakim stopniu na specyfikę oddziaływań może mieć wpływ np. tworzenie homooligomerów tak jak np. w przypadku ICR1? Specyficzność oddziaływań RIP-egzocyst znamionuje jednocześnie, iż białka RIP, jako rusztowanie mogą pośredniczyć w wiązaniu na mikrotubuli nieznanego białka-adaptora utrzymującego tam białka egzocystu. To ciekawa hipoteza/otwarcie które dyskutuje mgr Michałak w podrozdziale Dyskusja – Podsumowanie. Chciałem w tym momencie poprosić o komentarz, na ile ograniczeniem w poszukiwaniu takich nieznanach adaptorów czy też interakcji między nimi może być używany model eksperymentalny (nadekspresja w protoplastach). I czy są alternatywne rozwiązania dla niego?

Opisane w pracy eksperymenty nie pozwoliły na ustalenie fizjologicznej roli białek RIP u *Arabidopsis*. Obserwacje mikroskopowe pomogły określić powiązania molekularne w jakie białka te są zaangażowane, natomiast ich wpływ na fizjologię komórki wciąż pozostaje w sferze hipotez. Pewnym pomysłem na nowe otwarcie w opisanych badaniach jest wnikliwa analiza danych dotyczących ekspresji genów RIP i oddziaływań białko-białko z największych biologicznych baz danych. Mimo, że np. w bazach danych oddziaływań białko-białko jest za mało informacji źródłowych, aby wiarygodnie opisać zależności między białkami RIP i ich partnerami, uważam tą część pracy, mimo pesymizmu autora, za wartościową (np. identyfikacja genów o profilu ekspresji zbliżonym do RIP4).

Rozprawę zamyka rozdział Dyskusja-Podsumowanie. Jest on rozdziałem 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 Michałaka o złożoności zjawiska biologicznego które bada.

Kończąc swoje dzieło autor słusznie stwierdza, że: „praca doktorska stanowi jedynie wstęp do poznania potencjalnie ważnej i interesującej rodziny białek swoistych dla roślin”.

Zgadam się z Nim także w twierdzeniu, iż opisane tu relacje (np. RIP -mikrotubule) wymagają potwierdzenia nie tylko w izolowanych protoplastach, a także, czy natywnie białka te tworzą domeny błonowe i czy łączą się z mikrotubulami.

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Realny obraz walki o wynik. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autor jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką i ugruntowaną wiedzę o tym jak obrazować białka w materiale roślinnym. Nie pokusiłbym się o głębsze wnioski biologiczne na podstawie uzyskanych wyników ale bez wątpienia stanowią one istotny wkład w gromadzenie wiedzy o białkach potencjalnie istotnych dla sygnalizacji regulującej transport pęcherzykowy u roślin. Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Michała Michalaka do dalszych etapów przewodu.

12.07.2017

Michał Jasicki