



Prof. dr hab. Iwona Szarejko
Katedra Genetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski, Katowice

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Filipa Michała Mituły
pt. „Określenie roli kinazy kaskady MAP - MAPKKK18 w regulacji sygnalizacji kwasu
abscysynowego u *Arabidopsis thaliana*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Filipa Mituły została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Większość przedstawionych w rozprawie wyników badań została już opublikowana w dwóch pracach, w czasopiśmie: *Plant and Cell Physiology* (2015) 56:2351-2367, oraz *Plant Signalling and Behavior* (2018) 11: 4, natomiast część zastosowanej metodologii opublikowano w *Bio-Protocol* (2015) 5 (4), 2/20/2015. Doktorant był pierwszym autorem dwóch z tych prac.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pana mgr Filipa Mituły jest kompleksowa analiza funkcji i regulacji kinazy MAPKKK18, jednej z kinaz aktywowanych mitogenem (MAP), zidentyfikowanej u *Arabidopsis thaliana* w ścieżce sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA). Choć kwas abscysynowy powszechnie uznawany jest za główny hormon roślinny odpowiedzialny za reakcję roślin na stresy, rola wielu komponentów biorących udział w przekazywaniu sygnału ABA wciąż pozostaje nieznana. Kaskady kinaz MAP należą do kluczowych elementów transdukcji sygnału ABA, lecz funkcja i mechanizmy regulujące aktywność poszczególnych enzymów nie są dotąd wyjaśnione. Do takich kinaz należy badana przez Doktoranta kinaza MAPKKK18, o której w momencie rozpoczęcia Jego badań wiadomo było jedynie, że jej ekspresja jest zależna od aktywności rdzeniowej sygnalizacji ABA.

Problematyka pracy nawiązuje do bardzo aktualnych wyzwań naukowych, a mianowicie do poznania mechanizmów odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne. Stres suszy jest jednym z najgroźniejszych stresów środowiskowych ograniczających prawidłowy wzrost i rozwój roślin oraz głównym czynnikiem powodującym straty w rolnictwie. Tolerancja roślin na stres niedoboru wody jest kontrolowana przez koordynację złożonych procesów zachodzących na poziomie molekularnym, fizjologicznym i morfologicznym w różnych etapach rozwoju rośliny. Kwas abscysynowy odgrywa w tej koordynacji kluczową rolę, zatem szczegółowe poznanie ścieżek sygnalizacji ABA, wzajemnych zależności między komponentami tych szlaków oraz mechanizmów regulujących ich współdziałanie może przyczynić się do lepszego poznania molekularnych podstaw odpowiedzi roślin na stres suszy. Zespół naukowy Zakładu Biotechnologii Instytutu Biologii Molekularnej UAM kierowany wcześniej przez





Prof. dr hab. Jana Sadowskiego, a obecnie przez Prof. UAM Agnieszkę Ludwików, należy do czołowych ośrodków, zajmujących badaniami roli kinaz MAP w transdukcji sygnału u roślin. Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Filipa Mituły, stanowi nowy rozdział tych bardzo aktualnych i ważnych merytorycznie badań.

Szczegółowe cele rozprawy, obiekt badań i zastosowane metodyki badawcze

Główne cele badań podjętych przez Doktoranta obejmowały: (1) identyfikację mechanizmów regulujących aktywność kinazową MAPKKK18 oraz (2) opisanie funkcji MAPKKK18 w regulacji procesów powiązanych z sygnalizacją ABA. Obiektem badań była modelowa roślina dwuliścienna *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0), dla której istnieje bogactwo materiałów genetycznych, dostępnych dla badaczy. Należą do nich mutanty insercyjnego typu knock-out i linie z nadekspresją genu *MAPKKK18*, wykorzystane w tej pracy. Dla osiągnięcia postawionego celu, mgr Filip Mituła przeprowadził szereg badań, w których analizował mechanizmy regulujące aktywność MAPKKK18, identyfikował procesy biologiczne regulowane przez MAPKKK18 i powiązane z sygnalizacją ABA oraz poszukiwał partnerów MAPKKK18 zarówno w szlaku transdukcji sygnału ABA, jak i w kaskadach kinaz MAP. Szczegółowe doświadczenia obejmowały:

- analizę aktywności kinazowej MAPKKK18 po działaniu hormonów roślinnych biorących udział w odpowiedzi na stres
- analizę roli MAPKKK18 w regulacji kiełkowania nasion
- analizę wpływu MAPKKK18 na ruchy aparatów szparkowych
- identyfikację lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18
- charakterystykę oddziaływań MAPKKK18 z białkami kompleksu rdzeniowej sygnalizacji ABA
- analizę oddziaływań MAPKKK18 w kaskadzie kinaz MAP
- określenie roli MAPKKK18 w regulacji rozwoju aparatów szparkowych.

Do realizacji wymienionych celów mgr Filip Mituła zastosował nowoczesne techniki i metody z zakresu biologii molekularnej i biologii komórki. Wykazał się biegłą znajomością technik analizy białek, począwszy od ich izolacji z materiału roślinnego, badania ich aktywności, analizy oddziaływań białko-białko, do lokalizacji subkomórkowej białek z wykorzystaniem metody BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation method). Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant wykorzystał w badaniach szereg skonstruowanych przez siebie wektorów niosących sekwencje kodujące białka fuzyjne lub sekwencje zmutowanej kierunkowo kinazy MAPKKK18. Wektory te wykorzystał w doświadczeniach nad lokalizacją subkomórkową kinazy MAPKKK18 oraz analizą oddziaływań MAPKKK18 z wybranymi komponentami rdzeniowej sygnalizacji ABA oraz z elementami kaskady kinaz MAP. Do transformacji przejściowej zastosował kulturę protoplastów *Arabidopsis*, a obserwacje oddziaływań białko-białko w systemie BiFC prowadził z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

Zastosowane w ocenianej pracy obiekty i metody badawcze oceniam jako w pełni odpowiednie dla osiągnięcia założonego przez Doktoranta celu badawczego. Doświadczenia zostały zaplanowane w sposób starannie przemyślany, a metody właściwie dobrane do każdego eksperymentu.





Najważniejsze uzyskane wyniki

W rozprawie przedstawiono wyniki starannie zaplanowanych i opisanych analiz, a za najważniejsze z nich uważam:

1. Stwierdzenie, że kinaza MPKKK18 jest pozytywnym regulatorem sygnalizacji ABA podczas kiełkowania nasion.
2. Wykazanie, że MPKKK18 działa jako pozytywny regulator zamykania szparek pod wpływem ABA
3. Wykazanie, że kwas jasmonowy, kwas salicylowy i etylen nie wpływają na aktywność kinazy MAPKKK18
4. Ustalenie, że mutacje punktowe zmieniające aktywność kinazową MAPKKK18 prowadzą do zmiany jej lokalizacji subkomórkowej oraz że MAPKKK18 jest aktywnie transportowana pod wpływem ABA przez pory jądrowe z jądra komórkowego do cytoplazmy
5. Stwierdzenie, że MAPKKK18 bezpośrednio oddziałuje z ważnymi elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA: fosfatazą białkową ABI1 oraz kinazą SnRK2.6/OST1, a więc zarówno z negatywnymi, jak i pozytywnymi regulatorami sygnalizacji ABA,
6. Wykazanie, że MAPKKK18 promuje rozwój aparatów szparkowych w hypokotylach *A. thaliana*, działając niezależnie od kaskady YODA-MKK7/MKK9, pełniącej podobną funkcję.
7. Stwierdzenie, że kinaza MKK3 jest jedynym partnerem oddziaływań dla MAPKKK18 w kaskadzie kinaz MAP rozpoczynającym się od MAPKKK18, natomiast kinazy MKK5 i MKK7 nie są substratem dla MAPKKK18.

Do interesujących wyników pracy należy zaliczyć także stwierdzenie, że kinaza MPKKK18 działa powyżej ROS oraz jonów wapnia Ca^{+2} w regulacji sygnalizacji ABA w aparatach szparkowych oraz że fosfataza ABI2 PPC2 nie jest partnerem MAPKKK18 w rdzeniowej sygnalizacji ABA. Doktorant zbadął także rolę genu *MKK7* w rozwoju aparatów szparkowych w początkowym i zaawansowanym stadium rozwoju hypokotyli u *Arabidopsis*.

Ocena formalna pracy

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. We Wstępie wyczerpująco przedstawiono aktualną problematykę dotyczącą roli kwasu abscysynowego w rozwoju roślin i odpowiedzi na stresy oraz zagadnienia związane z percepcją i przekazywaniem sygnału ABA, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji ABA w rozwoju i zamykaniu aparatów szparkowych. W kolejnych rozdziałach Autor omówił mechanizm transdukcji sygnału poprzez kaskady kolejnych kinaz MAP, rozpoczynając od MAPKKK, poprzez MAPKK i kończąc na MAPK. Szczegółowo przedstawił kaskadę rozpoczynającą się od analizowanej w pracy kinazy MAPKKK18, tj. kaskadę MAPKKK17/18-MAPKK3-MPK1/2/7/14. Tak skonstruowany Wstęp dobrze uzasadnia zasadność podjętych przez Doktoranta badań. Cele pracy są jasno sformułowane. Mam natomiast kilka przedstawionych poniżej uwag i pytań do rozdziałów Materiały i Metody, choć trzeba zaznaczyć, że ten drugi jest bardzo obszerny.

Wyniki ujęto w 7 podrozdziałach, przedstawiających opis rezultatów doświadczeń odpowiadających na pytanie lub hipotezę postawioną we wstępie podrozdziału. Pytania te oparte są na krótkim omówieniu dotychczasowego stanu wiedzy na dany temat, co ułatwia czytającemu zrozumienie, dlaczego Doktorant wykonał określone doświadczenie oraz ocenę otrzymanych wyników. Dokumentacja wyników jest przejrzysta i kompletna. Kolejny rozdział, Dyskusja został opracowany w sposób wyczerpujący, z pełną znajomością problematyki nawiązującej do procesów dotyczących roli kinazy MAPKKK18 w sygnalizacji ABA i procesów biologicznych regulowanych przez tę sygnalizację. Na szczególne





podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwa analiza roli dwóch kaskad kinaz MAP w regulacji podziałów komórek linii rozwojowej aparatów szparkowych: kaskady kinaz zapoczątkowanej przez MAPKKK18 oraz kaskady zapoczątkowanej przez kinazę YODA.

Rozprawę kończy (poza spisem rycin i literatury) rozdział Podsumowanie, który w dużej mierze stanowi skróconą wersję zamieszczonego na początku rozprawy Streszczenia. Szkoda, że Doktorant nie spróbował sformułować wniosków ze swoich badań, co nie powinno sprawić Mu problemu, biorąc pod uwagę jednoznaczne wyniki doświadczeń i świetną znajomość literatury. Należy podkreślić, że bardzo obszerny spis literatury, obejmujący prawie w całości najnowszą literaturę przedmiotu, zredagowany jest bardzo starannie.

Pytania i uwagi dotyczące formalnej strony pracy

1. W rozdziale Materiały wymieniono mutanty insercyjne, podwójne mutanty i linie z nadekspresją genu *MAPKKL18* oraz mutantą *mkk7* i podwójnego mutantą *mkk7/mkkl18-1*, lecz bez żadnego ich opisu i uzasadnienia ich wyboru. Czym, np. różnił się mutant knock-out *mpkkl18-1* od mutantą *mpkkl18-2*? Jaki był cel wyboru dwóch mutantów typu knock-out do analiz? W rozdziale Materiał nie wskazano też, do jakich badań wykorzystano te linie, co być może ułatwiłoby wyjaśnienie tej kwestii.
2. Czym Autor kierował się przy wyborze do badań mutantą *mkk7* a nie innej kinazy MAPKK?
3. Nie znalazłam w rozdziale Metody opisu traktowania kwasem jasmonowym, salicylowym i etefonem. Jest tylko informacja o traktowaniu ABA i nadtlenkiem wodoru (str. 40) poprzez rozpylenie roztworów na liście rozety. Czy zastosowano tę sama metodę przy traktowaniu innymi fitohormonami?
4. W rozdziale 4.4.3 opisano procedurę krzyżowania *Arabidopsis*, nie napisano jednak, jakie linie ze sobą krzyżowano. W rozdziale 3.2. wymieniony jest podwójny mutant *mkk7/mpkkl18*, lecz zaznaczono, że jest to linia wyprowadzona wcześniej w Zakładzie Biotechnologii, więc opis krzyżowania jest chyba zbędny.
5. Nie znalazłam też w pracy informacji, w jakim eksperymencie wykorzystano transformację *Arabidopsis thaliana* metodą agroinfiltracji (rozdział 4.4.4)
6. W opisie konstrukcji wektorowych brakuje mi informacji, w których analizach (wymienionych już wcześniej w rozdziale Założenia i cele pracy), Doktorant wykorzystywał poszczególne wektory.
7. Autor umieścił w pracy wykaz stosowanych skrótów, co jest bardzo cenne dla czytelnika, jednak wykaz ten jest mocno niepełny i brakuje w nim wyjaśnienia skrótów nazw wielu genów lub białek, np. ABI1, HAB., AHG, CBP20, EIN3, EDR1, MEKK, itp. Nie wiadomo także, dlaczego Autor raz podaje angielskie, a raz polskie rozwinięcie skrótów.
8. Zbyt kolokwialne wydaje mi się użyte w Streszczeniu sformułowanie „rośliny kielkują silniej...”. Lepiej chyba stosować termin „zdolność kielkowania”. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktoranta, czy przeprowadzone przez Niego doświadczenie jest wystarczającym dowodem do stwierdzenia, że MAPKKK18 ma wpływ na znoszenie spoczynku nasion?

Powyższe uwagi krytyczne i komentarze dotyczą kwestii stosunkowo drobnych, przede wszystkim edycyjnych i nie wpływają na moją wysoką opinię o merytorycznej wartości rozprawy mgr Filipa Mituły.





Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa Pana mgr Filipa Mituły spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej dotyczącej problematyki swych badań, umiejętnością stawiania hipotez naukowych, planowania eksperymentów i stosowania najnowszych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej i biologii komórki. Wykazana w rozprawie zdolność mgr Filipa Mituły do krytycznej oceny uzyskanych wyników i wyważonego wnioskowania świadczy o Jego dojrzałości naukowej. Otrzymane wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Filipa Mituły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katowice, 4 maja 2018

Prof. dr hab. Iwona Szarejko

