

Dr hab. Robert Konieczny
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Instytut Botaniki, Uniwersytet Jagielloński

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Pauliny Zimak-Piekarczyk pt. „Charakterystyka biochemiczno-fizjologiczna mutantu insercyjnego *mkk2 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.”
wykonanej w Zakładzie Biologii Stresu Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego
w Krakowie
pod kierunkiem dr hab. Ireneusza Ślesaka (prof. IFR PAN) jako promotora
oraz dr Piotra Rozpádka jako promotora pomocniczego

Kinazy aktywowane mitogenami (MAPK, MAP) stanowią liczną i zróżnicowaną grupę kinaz serynowo-treoninowych, odpowiedzialnych za odpowiedź komórki na różnorodne bodźce środowiskowe. Poprzez rozbudowane szlaki transdukcji sygnału obejmujące receptor zewnątrzkomórkowy oraz kilka poziomów sygnalizacji w obrębie samych MAP, enzymy te kontrolują przebieg podstawowych procesów życiowych takich jak wzrost, różnicowanie, oraz metabolizm podstawowy i wtórny na poziomie transkrypcji i/lub biosyntezy białka. Złożoność szlaków sygnalizacyjnych tworzonych przez kinazy MAP, ich wzajemne nakładanie się, a z drugiej strony specyfika gatunkowa, a nawet tkankowa poszczególnych kaskad sygnalizacyjnych powodują, że wnioskowanie o funkcji tych enzymów jest wyjątkowo trudne. Pomocne w tego typu badaniach jest wykorzystanie roślin zmodyfikowanych genetycznie o zmienionej ekspresji badanego genu. Tę strategię przyjęła w swojej pracy doktorskiej Pani mgr Zimak-Piekarczyk.

Głównym celem badań Autorki była charakterystyka biochemiczna i fizjologiczna mutantu *Arabidopsis thaliana* o zahamowanej ekspresji genu kinazy kinazy MAP, *MKK2*. Podjęcie tych badań jest w pełni uzasadnione, ponieważ rola tego genu w szeroko pojętej biologii roślin jest wciąż słabo poznana. Stosując zróżnicowany zestaw technik badawczych, Autorka weryfikuje hipotezy o udziale *MKK2* w procesach wzrostowych i rozwojowych oraz w reakcjach adaptacyjnych rzodkiewnika do wybranych stresów środowiskowych, tj. solnego i świetlnego. Pod względem redakcyjnym oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ dla prac naukowych eksperymentalnych.

Cel badań sprecyzowany jest jasno, podobnie jak postawione do weryfikacji hipotezy.

We „Wstępie” Autorka szczegółowo wprowadza czytelnika w poruszane w pracy zagadnienia. Ze względu na ich imponującą różnorodność, ta część pracy jest obszerna, z trafnymi odwołaniami do literatury. Jednak wg recenzenta tematy dotyczące fitohormonów wydają się być omówione zbyt pobieżnie. Np. w podrozdziale „Auksyny” (1.4.2.1), brakuje odniesienia do transportu wewnątrzkomórkowego i długodystansowego auksyn i ich znaczenia w roślinie. Umieszczenie takich informacji byłoby celowe ponieważ geny *PILS*, których ekspresję Autorka bada odgrywają ważną rolę w reakcjach zależnych od auksyny, które z kolei, są przedmiotem obszernej dyskusji w dalszej części dysertacji. Dodatkowo, wiadomo, że aktywność niektórych

białek kontrolujących transport auksyn jest zależna od fosforylacji. W tym miejscu rozprawy konieczna jest również korekta schematycznego rysunku (Rys. 5), na którym przenośniki auksynowe PILS3 i 4 Autorka lokalizuje w błonie komórkowej.

Kolejny rozdział „Materiał i metody” obejmuje opis stosowanych technik badawczych. Autorka posługuje się metodami molekularnymi np. genotypowanie roślin, ilościowy RT-PCR, klasycznymi technikami fizjologicznymi i biochemicznymi jak elektroforeza natywna, fluorymetria, a także metodami mikroskopowymi i bioinformatycznymi.

Zastosowanie tak wielu metod badawczych pozwoliło Doktorantce na szczegółową analizę efektów zahamowania ekspresji *MKK2* na różnych poziomach funkcjonowania rośliny. Jestem pod wrażeniem ogromu pracy jaki Pani mgr Zimak-Piekarczyk wykonała. Co do stosowanej metodyki mam tylko kilka uwag:

1/ Czy homozygotyczność linii SAIL potwierdzono tylko na roślinach wyprowadzonych z materiału otrzymanego z banku nasion czy również na tych uzyskanych w hodowli własnej? Czy Doktorantka uważa ewentualną weryfikację homozygotyczności na późniejszych etapach hodowli za zasadną i ile było cykli reprodukcyjnych w hodowli?

2/ Moje wątpliwości budzi opis wielkości prób używanych do niektórych analiz. Zgodnie z przyjętą przez Autorkę konwencją informacje te umieszczane są pod odpowiednimi fotografiami/wykresami przez co siłą rzeczy są lakoniczne. Np. podana na Rys. 33 i 34 wielkość próby „n = 6” nie wiadomo czy odnosi się do mutantu i typu dzikiego łącznie czy osobno; nie wiadomo również czym *de facto* jest „n”, czy jest to liczba użytych do badań liści, analizowanych skrawków, chloroplastów czy roślin, z których pochodził materiał do badań. Tego typu nieścisłości napotkałem w tekście więcej.

3/ W podrozdziale 3.8 Autorka pisze, że analizowała parametry wzrostu i rozwoju badanych roślin w tym pojawianie się pędu kwiatowego, czas zakwitania oraz wielkość roślin. Nie sprecyzowała jednak jak szacowana była wielkość roślin (pomiar części nadziemnej czy łącznie z systemem korzeniowym?), a w rozdziale „Wyniki” wszystkie ww. parametry omawiane są bardzo ogólnie, bez podawania wartości liczbowych.

W rozdziale „Wyniki” w dwudziestu podrozdziałach przedstawiono bardzo wnikliwie rezultaty badań, a w kolejnej części dysertacji, w „Dyskusji” są one szeroko omawiane w kontekście wzajemnych powiązań oraz dostępnych danych literaturowych. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że Autorka wykazała się dużą umiejętnością w zakresie interpretacji danych, a w szczególności znajdowaniem, niekiedy bardzo trudnych do uchwycenia związków między nimi.

Na podstawie analiz morfometrycznych Autorka stwierdza, że mutanty *mkk2* mają większy przyrost biomasy oraz większą powierzchnię liści niż rośliny typu dzikiego. Sugeruje, że przyczyną obserwowanych różnic może być wyższa wydajność fotosyntetyczna mutantu oraz większe rozmiary komórek miększu liściowego. W tej ostatniej kwestii niektóre zdjęcia zamieszczone przez Autorkę nie korelują z opisem wyników, widać bowiem na nich, że nie tylko średnica/powierzchnia komórek mutantu jest większa ale również liczba warstw miększu w jego liściach (5-6 warstw vs. 2-3 warstwy na zdjęciach w drugim rzędzie Rys. 22).

Zagadnienie to wydaje się bardzo interesujące i dotyka słabo poznanego dotychczas mechanizmu regulacji formowania się i działania wrzecion podziałowych. Udział kinazy MAP został w tych procesach częściowo potwierdzony, jednak wątek ten – jak podkreśla Autorka również w odniesieniu do swoich wyników – wymaga dalszych badań. Nie do końca rozumiem jednak zasadność doświadczenia sugerowanego przez Doktorantkę, które miałyby polegać na zahamowaniu wrzecion podziałowych mutanta w celu sprawdzenia, czy rośliny takie nadal będą wykazywać wzrost. Działanie czynników hamujących organizację albo aktywność wrzecion podziałowych, np. oryzaliny, triflularany lub innych trucizn cytoszkieletu nigdy nie jest selektywne i może skutkować zniszczeniem innych struktur komórkowych np. *kontium ściana-błona komórkowa* przez co uzyskane wyniki mogą mieć charakter artefaktu. Dodatkowo, warunkowana turgorem elongacja komórki oparta jest w dużej mierze na sprawnie działającym cytoszkielecie stanowiącym szlaki transportu, do i ze ściany komórkowej, zarówno enzymów jak i innych cząsteczek wpływających na jej elastyczność.

Cechą ocenianej pracy doktorskiej jest logika konstruowania ciągów doświadczeń, a postawa Autorki wskazuje na ogromną wręcz dociekliwość. Dla Doktorantki bowiem, każdy uzyskany wynik cząstkowy staje się pretekstem do postawienia nowej hipotezy roboczej i jej weryfikacji. I tak, wyższą wydajność fotosyntetyczną mutanta Doktorantka wiąże m.in. z większą ilością aparatów szparkowych w jego liściach (a przez to sprawniejszą wymianą gazową) oraz z wyższą sprawnością fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Z kolei większe rozmiary komórek przypisuje silniejszemu ich uwodnieniu oraz działaniu IAA, którego poziom istotnie wyższy stwierdzono w komórkach mutanta.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka stwierdza jednak, że *MKK2* nie uczestniczy w transporcie zewnątrzkomórkowym auksyny, co wydaje mi się przedwczesnym i nie do końca poprawnym wnioskiem. Do analizy relacji między auksyną a kinazą *MKK2* wybrano m.in. geny *PILS3* i *PILS4*, które odpowiadają za wewnątrzkomórkowy transport tego fitohormonu, w tym jego gromadzenie w ER i dostępność form aktywnych. Gen *PILS4* – jak wskazują ostatnie badania molekularne – powstał stosunkowo niedawno w wyniku duplikacji genu *PILS3*, a kodowane przez oba geny białka wykazują bardzo wysoki, blisko 90% stopień homologii. Prosiłbym Doktorantkę o uzasadnienie wyboru do swoich badań spośród całej grupy genów *PILS*, genów *PILS3* i *PILS4* oraz o wyjaśnienie czy rozważała analizę ekspresji genu(ów), związanych z długodystansowym transportem auksyny uważanym zgodnie za jeden z ważniejszych determinantów większości procesów wzrostowych.

Zamieszczone przez Doktorantkę zdjęcia w pełni rozwiniętych roślin mutanta *mkk2* i typu dzikiego z hodowli ziemnej (Rys. 24) nie pozostawiają wątpliwości co do wpływu badanej kinazy na wielkość ich części nadziemnych, a opis w tekście sugeruje również szybsze zakwitanie mutantów *mkk2*. Opracowanie ilościowe i statystyczne tych wyników, a także sprecyzowanie, co było przedmiotem pomiarów w tym doświadczeniu jest jednak niezbędne, o czym wspomniałem wcześniej.

Ostatnia część rozdziałów „Wyniki” i „Dyskusja” poświęcona jest badaniom nad udziałem kinazy *MKK2* w reakcjach adaptacyjnych do stresu świetlnego i solnego. Ogólne badania nad wpływem zasolenia na sygnalizację opartą na *MKK2* były już publikowane, ale prace wykonane przez Autorkę są ich znacznym i nowatorskim dopełnieniem. Wystarczy wspomnieć chociażby

badanie zależności między metabolizmem reaktywnych form tlenu (RFT) a wyciszeniem badanego genu. Analizując metabolizm RFT Autorka szacowała m.in. całkowitą aktywność peroksydaz (POX) metodą densytometryczną. Niektóre wyniki jednak, jak np. wyższa sprawność aparatu fotosyntetycznego mutantu, a także większe rozmiary komórek roślin *mkk2* w porównaniu do typu dzikiego sugerują możliwy i selektywny wpływ badanej kinazy na aktywność różnych peroksydaz, tj. o ściśle określonej specyficzności substratowej. Chciałbym zapytać Doktorantkę o ewentualną zasadność pomiarów aktywności specyficznych POX w kontekście odmiennej sprawności aparatu fotosyntetycznego mutantu i roślin typu dzikiego w warunkach stresowych, a także w odniesieniu do dyskusji dotyczącej różnic w obserwowanej wielkości komórek między badanymi roślinami. Niektóre peroksydazy, a także RFT mają bowiem potwierdzony znaczący wpływ na strukturę ściany komórkowej, a także sprawność przepływu elektronów i fosforylację ADP w chloroplastach.

W końcowej części dysertacji Autorka zamieszcza rozdziały „Streszczenie”, „Wnioski”, „Kierunki dalszych badań” oraz „Suplement”, które stanowią dobre podsumowanie przeprowadzonych eksperymentów, pokazują ich znaczenie oraz wyznaczają możliwe ścieżki kontynuacji.

W ostatniej części recenzji odniosę się krótko do warstwy redakcyjnej i językowej rozprawy. W przeważającej większości tekstu Autorka posługuje się ścisłym i klarownym językiem naukowym. Trudniejsze fragmenty ilustruje starannie wykonanymi schematami lub zdjęciami. Wyjątkiem są, niektóre fragmenty rozdziału „Materiał i metody”, gdzie niestety dość często zdarzają się niezręczne i nieprecyzyjne sformułowania nie mieszczące się w kanonie języka naukowego. Poniżej podaję przykłady tylko kilku z nich:

str. 18: NADPH_2 ($\text{NADPH} + \text{H}^+$)

str. 38: „w celu określenia względnej ekspresji...genów auksynowych” (genów auksynozależnych?, genów związanych z metabolizmem/transportem auksyn?)

str. 40: „liście utrwalano w roztworze glutaraldehydu” (aldehydu glutarowego)

str. 43: tytuł rozdziału: „Określenie poziomu wybranych białek” (stwierdzenie obecności i ilości?)

Dodatkowo, w przedstawionej do oceny dysertacji w wielu miejscach brakuje zaznaczonego producenta wykorzystywanych odczynników chemicznych, a niektóre nazwy stosowanych substancji są niepełne np. żywica *Epon*. Zamieszczenie ww. informacji jest niezbędne do zminimalizowania błędów podczas ewentualnego powtórzenia doświadczeń.

Wymienione powyżej nieścisłości redakcyjne i językowe w niczym nie umniejszają wartości poznawczej recenzowanej pracy doktorskiej. Rozprawa jest bowiem obszerna, z pewnością wymagała dużego nakładu pracy i sporej inwencji ze strony Autorki. Występujące w tekście pewne niestosowne sformułowania mogą być zresztą bardzo łatwo usunięte przy przygotowywaniu publikacji.

Podsumowanie:

Uważam, że praca Pani mgr Zimak-Piekarczyk spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Przeprowadzone przez Autorkę badania dostarczają w znakomitej większości zupełnie nowych i kompletnych danych naukowych, które stanowią istotny wkład do wiedzy o biologii rośliny modelowej jaką jest *Araibidopsis thaliana* oraz otwierają perspektywy do wykorzystania tej wiedzy w pracach nad biologiczną funkcją MAP u innych roślin.

W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Botaniki im. W. Szafera PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Zimak-Piekarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 19.05.2018


dr hab. Robert Konieczny