

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jolanty Groszyk pt. „Identyfikacja i analiza funkcji genów z rodziny GSK w jęczmieniu (*Hordeum vulgare* L.)”

Wprowadzenie

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z najwcześniej udomowionych gatunków roślin i ciągle należy do najważniejszych gatunków uprawnych. Jęczmień jest wykorzystywany przede wszystkim w przemyśle paszowym, a także w produkcji napojów alkoholowych. W Polsce powierzchnia zasiewów jęczmienia wynosi prawie 1 milion hektarów, co stanowi około 15% powierzchni upraw wszystkich zbóż. Jęczmień jest gatunkiem diploidalnym, którego genom haploidalny składa się z 7 chromosomów i ma wielkość około 5.3Gpz. W 2012 roku międzynarodowe konsorcjum opublikowało pierwszą sekwencję genomu jęczmienia, co otworzyło nowe możliwości w badaniach nad tym ważnym gospodarczo gatunkiem. W Polsce zaawansowane prace nad ulepszaniem zbóż, w tym jęczmienia, z wykorzystaniem metod współczesnej biotechnologii, ukierunkowane na kształtowanie cech plonotwórczych prowadzone są przez zespół badawczy Zakładu Inżynierii Genetycznej IHAR-PIB w Radzikowie. Badania Autorki wykonane nad jęczmieniem pod opieką Pana Prof. dr hab. Wacława Orczyka wpisują się w problematykę badawczą tego zespołu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy genów GSK kodujących kinazy podobne do kinaz syntazy glikogenu (GSK). Kinazę syntazy glikogenu odkryto w 1980 roku w badaniach nad królikiem i opisano ją jako kinazę serynowo-treoninową regulującą aktywność syntazy glikogenu w mięśniach szkieletowych. Obecnie wiadomo, że kinazy podobne do GSK występują u wszystkich eukariontów i są regulatorami wielu ważnych procesów. U roślin zarówno geny GSK jak i kodowane przez nie kinazy są stosunkowo słabo poznane i ciągle odkrywane są ich nowe funkcje. Jak dotychczas najwięcej prac nad kinazami GSK prowadzono u *Arabidopsis thaliana* wykazując, że kinazy te można podzielić na cztery podstawowe grupy, i że są one kodowane przez 10 genów. Odkryto także wiele funkcji kinaz GSK. Pokazano, że kinazy GSK regulują ważne procesy rozwojowe, takie jak ustalenie wzoru okółków kwiatowych oraz uczestniczą w wielu szlakach sygnałowych, w tym związanych z tolerancją roślin na stropy abiotyczne, między innymi na zasolenie.

Badania wykonane przez Autorkę rozprawy mają charakter nowatorski, gdyż jak dotychczas nie prowadzono prac badawczych nad genami i kinazami GSK u jęczmienia. Wykonane przez Autorkę badania uważam za celowe i w pełni uzasadnione ponieważ wzbogacają one wiedzę w zakresie funkcji genów GSK u jęczmienia.

Dane formalne o rozprawie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z rozdziałów w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, które stanowią: przegląd literatury (25 stron), cel i zakres pracy (1 strona), materiały i metody (25 stron), wyniki (48 stron), dyskusja (18 stron), podsumowanie i wnioski (2 strony) oraz spis literatury (11 stron). Układ pracy jest dobrze przemyślany i przejrzysty. Rozprawę poprzedza starannie przygotowany spis treści oraz wykaz skrótów ułatwiający czytelnikowi dobre zrozumienie treści pracy. W rozprawie zamieszczono 41 rysunków i 27 tabel, które są starannie opisane. W treści pracy Autorka odwołała się do 178 pozycji literatury źródłowej. Ponadto rozprawę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz informacja o tym, że badania były finansowane w ramach projektu NCN OPUS7 (UMO-2014/13/B/NZ9/02381).

Ocena rozprawy

Część eksperymentalną pracy poprzedza przegląd literatury, w którym Autorka przedstawiła najważniejsze informacje dotyczące jęczmienia zwyczajnego, omówiła ogólnie właściwości kinaz białkowych, zaprezentowała główne nurty badań nad kinazami GSK u roślin, a także przybliżyła najważniejsze metody i strategie transgenezy stosowane dla jęczmienia. Zakres wiedzy zaprezentowany w przeglądzie literatury uważam za właściwie dobrany. Podrozdziały dotyczące funkcji genów i kinaz GSK w roślinach są rozbudowane i uważam je za szczególnie wartościowe. W tych podrozdziałach Autorka w sposób syntetyczny, a zarazem wyczerpująco, przedstawiła dotychczas odkryte funkcje kinaz GSK w procesach rozwojowych, regulacji fitohormonalnej i tolerancji roślin na zasolenie wykazując się bardzo dobrą znajomością literatury w obszarze podjętej tematyki badawczej. Dobre zrozumienie funkcji genów i kinaz GSK w roślinach ułatwia szereg schematów i rycin zawartych w tej części pracy.

Autorka jasno sformułowała cel swoich badań, którym było zidentyfikowanie genów z rodziny *GSK* i poznanie ich funkcji w jęczmieniu. Jak dotychczas nie badano genów *GSK* w tym gatunku. Autorka rozprawy osiągnęła ten cel realizując szereg szczegółowych zadań, do których należały: (1) bioinformatyczna identyfikacja i analiza genów kodujących kinazy *GSK* u jęczmienia, (2) zbadanie profili ekspresji zidentyfikowanych genów, (3) przygotowanie konstrukcji wyciszających dla genów *GSK*, (4) wykonanie transformacji genetycznej i uzyskanie transgenicznych linii jęczmienia z wyciszeniami genów *GSK*, (5) wykonanie charakterystyki fenotypowej uzyskanych transgenicznych linii z wyciszeniami ze szczególnym uwzględnieniem stresu osmotycznego i zasolenia oraz (6) analiza korelacji cech molekularnych, morfologicznych i fizjologicznych dla linii z wyciszeniami. Przedstawiony cel badań uważam za bardzo ambitny, a wykonane badania za kompleksowe i wielowątkowe. W swych badaniach Autorka skutecznie zastosowała zaawansowane metody inżynierii genetycznej, genetyki molekularnej, jak również bioinformatyki, biometrii i fizjologii roślin. Poszczególne metody zostały przez Autorkę właściwie opisane.

Punktem wyjścia do badań Autorki była analiza bioinformatyczna dostępnych sekwencji nukleotydowych i białkowych jęczmienia ukierunkowana na identyfikację genów *GSK*. Autorka zidentyfikowała 7 genów *GSK* i wykonała ich analizę bioinformatyczną oraz grupowanie. Podobnie jak w *A.thaliana* Autorka stwierdziła występowanie 4 grup genów *GSK* w jęczmieniu. Analiza bioinformatyczna predykcji białek potwierdziła obecność domeny i motywów typowych dla kinaz *GSK*. Następnie Autorka wykonała analizę ekspresji na poziomie transkrypcji dla 7 genów *GSK* w 10 różnych tkankach i stadiach rozwojowych jęczmienia wykorzystując metodę Real Time PCR. Autorka wykazała, że badane geny ulegają ekspresji we wszystkich badanych tkankach, a ponadto, że dla wszystkich genów poziom transkrypcji jest najwyższy w tkankach generatywnych (kłosie premeiotycznym i meiotycznym). Pewien niedosyt budzi fakt, że na rysunku 19 przedstawiono profile ekspresji dla 4 spośród 7 badanych genów *GSK*, co utrudnia czytelnikowi wyrobienie sobie poglądu na temat różnic w ekspresji w obrębie wszystkich badanych genów.

W kolejnym etapie prac Autorka wytypowała 4 geny *GSK* reprezentujące różne grupy do analizy funkcjonalnej. Wykorzystując system klonowania Gateway Autorka uzyskała 4 plazmidy binarne z kasetami wyciszającymi. W obrębie T-DNA tych plazmidów znajdował się gen markerowy oporności na higromycynę regulowany promotorem 35S oraz kasetą wyciszającą hpRNA pod kontrolą konstytutywnego promotora Ubi zawierająca fragmenty danego genu *GSK* o długości 250-300 pz w orientacji odwróconej rozdzielone intronem. W opisie kasety wyciszającej zabrakło mi informacji o źródle/pochodzeniu promotora Ubi. Poprawność konstrukcji genowych została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie. Należy podkreślić, że Autorka wykazała się dużymi umiejętnościami przygotowując konstrukcje wyciszające gdyż nie zawsze udaje się uzyskać konstrukcje hpRNA. Skonstruowane plazmidy zostały wprowadzone do szczepu AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*. Tak przygotowane szczepy bakteryjne Autorka wykorzystwała do transgenezy jęczmienia odmiany 'Golden Promise'. Do transformacji wykorzystwała prawie 7000 zarodków jęczmienia. Udało się wykonać transformację genetyczną i uzyskać łącznie 71 roślin T0 dla 4 konstrukcji genowych wymagało niewątpliwie ze strony Autorki olbrzymiego nakładu pracy i świetnego opanowania technik kultur tkankowych roślin. Dzięki zastosowaniu ilościowego qPCR Autorka wytypowała pojedynki T1 posiadające jedno miejsce integracji T-DNA i homozygotyczne pod względem transgeny, które zapoczątkowały transgeniczne linie z wyciszeniami. Szkoda, że wyniki analizy ilościowej qPCR, które przedstawiono tylko dla dwóch bliżej nie określonych potomstw T1 (rysunek 22), nie zostały dołączone do tabeli 13.

Następnie Autorka zbadała poziom wyciszenia genów docelowych w liściach 14-dniowych roślin i wytypowała po 5 linii charakteryzujących się najwyższym poziomem wyciszenia do szczegółowych badań funkcji genów *GSK*. Poziom transkrypcji dla linii z wyciszeniami genów *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1* był obniżony o 67-85%, w przypadku genu *HvGSK1.2* o 29-45% zaś dla *HvGSK2.1* o 15-36% względem kontroli w zależności od badanej linii. Uzyskanie serii transgenicznych linii z wyciszeniami jest niewątpliwie wymiernym osiągnięciem Autorki rozprawy.

W kolejnym etapie badań Autorka wszechstronnie scharakteryzowała linie z wyciszeniami na poziomie pokolenia T2 wykorzystując 14-dniowe siewki uprawiane w rulonach z bibuły filtracyjnej oraz rośliny uprawiane w warunkach fitotronowych. W pierwszym doświadczeniu wykonane zostały kompleksowe analizy 14-dniowych siewek, uprawianych w warunkach kontrolnych, do których odnoszone były wyniki analiz wykonanych w warunkach stresu osmotycznego wywołanego 15% PEG10.000 i stresu zasolenia wywołanego 200mM NaCl. W doświadczeniu tym Autorka badała profile transkrypcji genów *HvGSK* oraz markerów ekspresyjnych stresu zasolenia *HvDHN5* i biosyntezy brasinosteroidów *HvDwarf4*, a także biomasę roślin, długość pędów i korzeni, zawartość nadtlenku wodoru, powierzchnię pierwszego liścia, suchą masę liści, wyciek elektrolitów i parametry fluorescencji chlorofilu. W drugim doświadczeniu Autorka opisała wybrane cechy morfologiczne i plonotwórcze oraz parametry fluorescencji chlorofilu roślin rosnących w warunkach fitotronowych. W trzecim doświadczeniu Autorka przeprowadziła analizę porównawczą systemu korzeniowego roślin rosnących w warunkach kontrolnych i stresu solnego. Wykorzystując uzyskane wyniki Autorka skonstruowała macierze korelacji cech dla linii z wyciszeniami, co pozwoliło na zidentyfikowanie korelacji pomiędzy cechami i wnioskowanie o funkcjach genów *HvGSK*. Pewnym ograniczeniem tego wnioskowania były stosunkowo małe liczebności prób dla niektórych pomiarów. Autorka bardzo szczegółowo opisała uzyskane wyniki fenotypowania niepotrzebnie jednak omawiając różnice, które nie były istotne statystycznie. Szkoda też, że Autorka nie przedstawiła wyników fenotypowania 14-dniowych siewek w postaci wykresu podobnego tego, który zamieściła na rysunku 36 lub w postaci heat-mapy sumującej uzyskane wyniki, co znacznie ułatwiłoby czytelnikowi ich prześledzenie i całościową analizę.

Dyskusja jest napisana w sposób usystematyzowany i przeczytałem ten rozdział z zainteresowaniem. Autorka przedyskutowała w sposób krytyczny uzyskane wyniki odnosząc się do prac innych grup badawczych wykonanych głównie dla *A.thaliana* i ryżu. Ponadto Autorka przedstawia ciekawe tezy, które mogą ukierunkować dalsze szczegółowe badania nad funkcjami genów *HvGSK*. Mam pewien niedosyt związany z dyskusją na temat poziomu wyciszenia genów *HvGSK* w transgenicznym liniach otrzymanych przez Autorkę. Obniżenie poziomu transkrypcji w zakresie od 11 do 85% w tych liniach Autorka tłumaczy występowaniem wariantów splicingowych genów *HvGSK* lub potencjalną metylacją wprowadzonej konstrukcji genowej hpRNA i stwierdza, że znacznie lepsze rezultaty można byłoby osiągnąć w wykorzystaniu technologii CRISPR/Cas9. Nie do końca mnie to przekonuje, gdyż w moim odczuciu jest to wysoce prawdopodobne, że zmutowanie genów *HvGSK*, które ulegają ekspresji we wszystkich tkankach badanych przez Autorkę, może być letalne.

Do najważniejszych wniosków Autorki należy wskazanie funkcji czterech genów *HvGSK* w jęczmieniu. Autorka pokazała, że geny *HvGSK* uczestniczą w złożony w sposób regulacji procesów rozwojowych oraz budowaniu odpowiedzi roślin na stres osmotyczny i zasolenie, a ich funkcje są zróżnicowane. Przykładowo, gen *HvGSK2.1* działa przeciwnie do pozostałych badanych genami *HvGSK* w rozwoju korzenia. Autorka postuluje, że geny *HvGSK* mogą być związane w zróżnicowany sposób z tolerancją jęczmienia na stres

osmotyczny i/lub zasolenie poprzez regulację szlaków sygnałowych kwasu abscysynowego i brasinosteroidów. Tu nasuwa mi się spostrzeżenie, że warto byłoby przetestować linie z wyciszeniami w warunkach stresu suszy. Pewnym zaskoczeniem jest dla mnie fakt, że tylko w przypadku wyciszenia genu *HvGSK2.1* Autorka obserwowała różnice w rozwoju kwiatostanów chociaż wykazała, że właśnie w organach generatywnych ekspresja wszystkich *HvGSK* jest najwyższa. Uzyskane przez Autorkę wyniki stanowią dobry punkt wyjścia do szczegółowych analiz funkcji genów *HvGSK* u jęczmienia.

Podsumowując Autorka wykonała gigantyczną pracę realizując przedstawioną pracę doktorską. Wyniki uzyskane przez Autorkę są oryginalne i wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat genów *GSK* u jęczmienia, a wymiernym efektem prac Autorki jest seria transgeniczných linii z wyciszeniami genów *HvGSK*. Autorka umiejętnie przedyskutowała uzyskane wyniki, a rozprawa jest napisana starannie i właściwie zredagowana. Pewnym utrudnieniem podczas czytania pracy są drobne niedociągnięcia edytorskie i stylistyczne, które nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej rozprawy.

Uwagi do pracy

- (1) Autorka wytypowała 4 spośród 7 zidentyfikowanych genów *GSK* do uzyskania roślin z wyciszeniami ale nie przedstawiła kryteriów wyboru tych genów do analizy funkcjonalnej. Czy kierowano się tylko tym, żeby wybrane geny reprezentowały wszystkie grupy genów *GSK*?
- (2) Autorka nie przedstawiła przesłanek związanych z wyborem stężenia PEG 10 000 (15%) i NaCl (200mM) na potrzeby testowania roślin w warunkach stresu osmotycznego i zasolenia. W moim odczuciu są to dość wysokie stężenia. W jaki sposób je dobrano?
- (3) Niektóre z tabel i rysunków mogłyby być lepiej zredagowane. Przykładowo: w tabeli 2 nie doszukałem się informacji o starterach dla genów *HvDHN5* i *ARF1*, w tabeli 6 błędnie zapisano nazwę tiaminy (thiamina), na rysunki 16 czcionka wykorzystana do opisu gałęzi dendrogramu jest za mała co utrudnia analizę tego drzewa, w opisie rysunku 24 nie podano informacji o tym, że prezentowane wyniki dotyczą roślin kontrolnych, a na rysunku 29 nie zaznaczono różnic istotnych statystycznie.
- (4) Autorka nie zawsze właściwie stosuje terminologię związaną ze stresem i stresorem. Przykładowo, często używa stwierdzenia „Rośliny uprawiane w stresorze zasolenia” (na przykład na str. 95). W moim odczuciu nie brzmi to dobrze i raczej stosowałbym sformułowanie „Rośliny uprawiane w warunkach stresu solnego”.
- (5) Autorka nie ujednoliciła pod względem stylu spisu literatury, przykładowo: czasami dla pozycji literaturowej podane są pełne tytuły pism, a innym razem skróty, czasami w tytułach prac są stosowane duże litery, a innym razem małe, nazwy łacińskie powinny być zapisane kursywą, a najczęściej nie są. Styl spis literatury powinien być jednolity dla wszystkich pozycji.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Jolanty Groszyk dotyczy aktualnej problematyki badawczej jaką jest zrozumienie funkcji genów kodujących kinazy GSK ze szczególnym uwzględnieniem stresu osmotycznego i zasolenia u ważnego gatunku uprawnego jakim jest jęczmień. Prace badawcze zostały dobrze zaplanowane i przeprowadzone z wykorzystaniem szeregu zaawansowanych metod badawczych, a uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań. Autorka rozprawy opanowała i skutecznie połączyła w swej pracy liczne techniki badawcze współczesnej biologii eksperymentalnej roślin i jednoznacznie pokazała, że potrafi kompleksowo rozwiązywać problemy badawcze oraz w sposób krytyczny analizować uzyskane wyniki. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe elementy stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski