

prof. dr hab. Cezary Mądrzak
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Zakład Biologii Molekularnej

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

Lawinowy przyrost ilości danych genomicznych, który wynika z szybkiego rozwoju technik molekularnych i bioinformatyki, daje szansę poznania i zrozumienia szczegółowych aspektów funkcjonowania organizmów żywych. Rozwój genomiki choć, bez wątpienia, warunkuje postęp w tym zakresie nie jest jednak czynnikiem wystarczającym dla osiągnięcia pełnego sukcesu. Koniecznym uzupełnieniem imponujących osiągnięć na polu oznaczania struktury całych genomów są żmudne prace nad identyfikacją poszczególnych genów oraz określeniem ich funkcji, profili ekspresji i mechanizmów ją regulujących. Nieocenioną pomoc w zakresie adnotacji funkcjonalnych stanowią opublikowane wyniki zaawansowanych badań nad organizmami modelowymi, jednak nawet w ich przypadku bardzo wiele jeszcze pozostaje do zrobienia. Można mieć nadzieję, że tempo, w jakim przyrasta nasza wiedza będzie się zwiększało. Nadzieja ta wynika z niewątpliwego, dodatniego sprzężenia, jakie zauważamy pomiędzy ilością dotychczas zgromadzonych danych i liczbą zweryfikowanych hipotez a łatwością pozyskiwania nowych informacji. Niezbędnym uzupełnieniem oznaczania sekwencji nukleotydowych i ich analiz bioinformatycznych pozostaje, bez wątpienia, eksperyment pozwalający mniej lub bardziej jednoznacznie określić funkcję genu lub genów w środowisku komórkowym i w kontekście funkcjonowania całego organizmu. Obecnie możemy bardzo zwięźle, choć raczej należało by powiedzieć – skrótowo, określić drogę, którą każdorazowo trzeba by pokonać: po zgromadzeniu danych z zakresu genomiki przychodzi czas na analizę transkryptomu; weryfikacją tak uzyskanych danych powinna być analiza proteomu uzupełniona w niektórych przypadkach analizą metabolomu. Na tak sformułowane „proste” postulaty nakłada się niestety złożoność i wielotorowość mechanizmów regulujących fizjologię organizmu i jego reakcje na wpływ czynników zewnętrznych.

Pomimo, że długo jeszcze nie przeminie czas eksploracji organizmów modelowych, już teraz dysponujemy solidnymi przesłankami by wykorzystać opracowany warsztat doświadczalny oraz zdobyty zasób wiedzy, w badaniach nad roślinami uprawnymi. Jest rzeczą oczywistą, że bez tego nie da się osiągnąć sukcesu w zakresie przyśpieszania i precyzyjnego sterowania procesami

hodowlanymi. Rozwój i konsekwentne wykorzystywanie metod inżynierii genetycznej daje szansę szybszego osiągnięcia zakładanych celów hodowlanych.

W tak określony obszar działalności badawczej dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr Jolanty Groszyk będąca przedmiotem niniejszej recenzji. Została ona przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. Wacława Orczyka w Zakładzie Inżynierii Genetycznej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Ocena merytoryczna pracy

Mgr Jolanta Groszyk podjęła badania nad rodziną genów kodujących kinazy białkowe z rodziny GSK w jęczmieniu zwyczajnym w ramach projektu OPUS 7 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Pewna, wstępna część uzyskanych wyników została opublikowana w pracy, której Doktorantka jest pierwszym autorem¹. Praca opisuje wyniki analiz bioinformatycznych genomu jęczmienia, które dowodzą obecności w tym gatunku siedmiu genów – przedstawicieli rodziny GSK3. Analiza filogenetyczna sekwencji aminokwasowych ich domen kinazowych wykazała, że można je zakwalifikować do czterech grup, które wcześniej wyróżniono wśród genów *AtSK (GSK) Arabidopsis thaliana*. Autorzy wykazują ponadto ekspresję wszystkich siedmiu genów GSK jęczmienia (*HvGSK*) w różnych organach i stadiach rozwojowych roślin.

Oceniana rozprawa opisuje badania będące kontynuacją i rozwinięciem tych, które opisuje wspomniana wyżej publikacja. Autorka wybrała cztery geny reprezentujące poszczególne grupy i podjęła próbę określenia ich funkcji biologicznej. Zastosowała metodę często w tym celu stosowaną – wyciszania poszczególnych genów (na drodze RNAi) i badania fenotypów uzyskanych transformantów. Doktorantka przeprowadziła liczne wieloetapowe eksperymenty wykorzystujące różnorodne techniki badawcze. Prowadziła uprawy roślin i kultury bakteryjne, izolowała RNA roślinne, przeprowadzała odwrotną transkrypcję i reakcję real-time PCR dla określenia poziomu ekspresji badanych genów. Konstruowała plazmidy zawierające kasetę wyciszającą, transformowała komórki *Agrobacterium tumefaciens* a następnie wykorzystywała je do transformacji zarodków jęczmienia. Do przeprowadzenia zaplanowanych badań niezbędna była ponadto regeneracja roślin, uzyskanie ziarniaków pokolenia T1 i ich wysiew w celu uzyskania pokolenia T2. Do analiz fenotypów wykorzystywano homozygotyczne osobniki pokolenia T2.

Od tego momentu można mówić o najciekawszej, ale i najbardziej pracochłonnej, najtrudniejszej do opisanego i interpretacji części pracy. Doktorantka wybrała cechy fenotypowe i parametry, które postanowiła porównać w 14-dniowych

¹ Groszyk Jolanta, Yanushevskaya Yuliya, Zielezinski Andrzej, Nadolska-Orczyk Anna, Karłowicz Wojciech M., Orczyk Wacław (2018) Annotation and profiling of barley GLYCOGEN SYNTHASE3/Shaggy-like genes indicated shift in organ-preferential expression. PLoS ONE 13(6): e0199364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199364>

roślinach typu dzikiego i transformantach. Liczbę prób zwiększyło wprowadzenie do doświadczenia dodatkowych czynników. Badane rośliny uprawiano bowiem w warunkach określonych jako kontrolne oraz w obecności 200 mM NaCl (co nazwano stresem zasolenia) lub 15% PEG 10 000 (mającego powodować stres osmotyczny). Można zatem stwierdzić, że badano 5 grup obiektów (rośliny typu dzikiego oraz cztery grupy linii T2 z wyciszoną ekspresją poszczególnych genów GSK). Wszystkie obiekty analizowano w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem stresu zasolenia i stresu osmotycznego. Co oczywiste, podstawowym oznaczeniem był względny poziom ekspresji badanych genów: *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* oraz *HvGSK4.1* reprezentujących odpowiednio występujące w jęczmieniu (oraz w rzodkiewniku) cztery grupy genów GSK. Ponadto badano poziom ekspresji genu *HvDhn5* oraz *HvDwarf4*. Cechy fenotypowe i parametry określane we wszystkich próbach to: biomasa roślin, długość pędu i korzeni, zawartość H₂O₂, powierzchnia pierwszego liścia, sucha masa liści oraz wyciek elektrolitów. Doktorantka oznaczała również wybrane parametry fluorescencji chlorofilu.

Ostatecznym celem badań prowadzonych według schematu przyjętego przez Autorkę rozprawy jest określenie funkcji biologicznej badanej rodziny genów. Na podstawie wyników badań *Arabidopsis thaliana* stwierdzono, że *AtSK21* (przedstawiciel grupy II) oraz *AtSK12*, *AtSK21* i *AtSK13* (zaliczane do grupy I) fosforylują, zaangażowane w regulację szlaku sygnałowego brassinosteroidów – czynniki transkrypcyjne BZR1 oraz BES1/BZR2. Doktorantka cytuje doniesienia stanowiące ponadto, iż *AtSK11* fosforyluje dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (G6PD), która aktywowana w ten sposób uczestniczy w obronie komórki przed stresem oksydacyjnym. Pośrednie dane sugerują ponadto udział *AtSK31* (kinazy zaliczanej do grupy III) w sygnalizacji brasinosteroidowej. Autorka nie znalazła w literaturze danych sugerujących funkcje biologiczne pozostałych kinaz zaliczanych do grupy trzeciej oraz kinaz grupy czwartej.

Należy stwierdzić, że podjęcie badań nad określeniem funkcji genów z rodziny GSK w jęczmieniu jest uzasadnione z co najmniej dwóch głównych powodów. Po pierwsze, poznane już regulatorowe funkcje kinaz białkowych z tej rodziny lokują je w centrum zainteresowania hodowców pragnących modyfikować ważne cechy użytkowe roślin. Po drugie, dysponujemy bardzo małym, ograniczoną właściwie wyłącznie do ryżu, zasobem informacji na temat funkcji tych kinaz w zbożach.

Uzyskane przez Autorkę rozprawy dane doświadczalne pozwoliły jej na wyciągnięcie ostrożnych wniosków, które sformułowała w rozdziale 6 (Podsumowanie i wnioski). Stanowią one, między innymi, że najwyższy poziom ekspresji genów *HvGSK* występuje w organach generatywnych; geny te uczestniczą w regulacji rozwoju pędu (wniosek 4) i systemu korzeniowego (wniosek 5) oraz muszą brać udział w regulacji odpowiedzi rośliny na wystąpienie stresu osmotycznego (oraz stresu zasolenia). Przeprowadzone przez Autorkę

wnioskowanie doprowadziło do stwierdzenia związku funkcji genów *HvGSK* ze szlakami sygnałowymi brasinosteroidów (w tym za pośrednictwem genu *HvDwarf4*) oraz kwasu abscysynowego (taką możliwość sugeruje ich wpływ na ekspresję *HvDhn5*).

Opisane wyniki są interesujące i wartościowe. Z całą pewnością jednak, badania, które umożliwiły ich uzyskanie muszą być kontynuowane i rozwijane. Na sformułowanie takiego poglądu wpływa kilka przesłanek. Po pierwsze, wyłączenie funkcji poszczególnych genów rodziny GSK przeprowadzone z zastosowaniem mechanizmu RNAi (dokładniej: PTGS) nie było całkowite – doprowadzono tylko do obniżania poziomu ekspresji. Tę kwestię Autorka porusza w dyskusji, jednak byłoby bardzo pożądane, gdyby zechciała odnieść się do tego zagadnienia w czasie publicznej obrony. Być może rozwiązaniem byłyby badania stosujące inaktywację genu na etapie transkrypcji. Być może rzeczywiście, o czym Autorka wspomina w dyskusji, adaptacja metody CRISPR/Cas byłaby właściwym rozwiązaniem. Bardzo interesujące byłoby ponadto poznanie opinii Autorki na temat potencjalnej roli, jaką w funkcjonowaniu kinaz z rodziny GSK odgrywa alternatywny splicing ich transkryptów. Liczba wariantów splicingowych podawana w literaturze jest imponująca. Ten aspekt to druga z przesłanek wpływających na pogląd o konieczności kontynuowania badań. Trzecią przesłanką jest potrzeba identyfikacji substratów poszczególnych kinaz i określenie poziomu ich specyficzności – kinazy białkowe znane są z wysokiej specyficzności substratowej. Pozostaje wreszcie kwestia metabolomiczna. Badanie poziomu brasinosteroidów mogłoby okazać się pożyteczne – o tym także można wnioskować z tekstu rozprawy (patrz: „Dyskusja” str. 134).

Podsumowując ocenę merytoryczną rozprawy można stwierdzić, że jest to praca wartościowa i interesująca, choć bardzo trudna w lekturze co wynika, przede wszystkim, ze zróżnicowania obiektów i czynników badawczych oraz konieczności wnioskowania na podstawie przesłanek pośrednich. Tym niemniej, obowiązkiem recenzenta jest zwrócenie uwagi na zauważone niedoskonałości rozprawy. We wstępnej części pracy zdecydowanie brakuje krótkiego wprowadzenia w niektóre aspekty mechanizmów reakcji rośliny na stres. Zdecydowanie zyskałaby na tym jasność wyводу. Zakres merytoryczny pracy obejmuje badania nad wpływem ekspresji genów kodujących GSK na fenotyp jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu. Zdecydowanie brakuje wyjaśnienia różnicy między zastosowanym stresem zasolenia a stresem osmotycznym, które przecież znacząco pokrywają się, jako że oba są stanami zaburzenia stosunków wodnych w tkankach rośliny. Brakuje również wprowadzenia czytelnika w niektóre aspekty molekularne stresu. O dehydrynach w kontekście badanych zjawisk czytelnik dowiaduje się właściwie dopiero w „Dyskusji” – tylko o jednym kodującym je genów czyta wcześniej, w rozdziale 3.10. W tabeli 2 brakuje informacji o starterze stosowanym do

oznaczania genu *HvDhn5*, choć odsyła do tej tabeli tekst ze strony 66 (Rozdz. 3.10.3). Skrótowa nazwa tego genu pojawia się zresztą po raz pierwszy na stronie 64, choć należało by oczekiwać, że znajdziemy ją, na przykład, w rozdziale 1.8. Drugi z oznaczanych jako gen odniesienia – *Dwarf4*, znajdujemy w rozdziale 1.9. Wyjaśnienia skrótowych nazw tych genów nie znajdziemy zresztą w wykazie skrótów. Niektóre skróty zamieszczone w tekście (oraz w podpisach do rysunków) wymagają wyjaśnienia. Dobrym sposobem dokonania tego jest ich zamieszczenie w już wspomnianym wykazie skrótów. Można je było również objaśnić w podpisach pod rycinami. Zamieszczone w rozprawie, starannie dobrane i interesujące ilustracje znacznie zyskałyby na czytelności. Niektóre z tych przedstawiających schematy lub szlaki, np. rys. 7, mają starannie zredagowany, czytelny podpis. Inne, np. rys. 1, 11, 12, wymagają znacznego wysiłku by wyjaśnienie zastosowanych skrótów znaleźć w tekście, co w niektórych przypadkach nie jest możliwe (choćby RALF – rapid alkalization factor na rys. 11).

Jak wynika z już wcześniej zamieszczonych uwag, rozprawa zasługuje na pozytywną ocenę niezależnie od kilku uwag krytycznych. Przedstawia ona wyniki badań zrealizowanych z dużym nakładem pracy przez kompetentnego badacza.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr Jolanty Groszyk to opracowanie obejmujące 155 stron tekstu ilustrowanego 41 rysunkami i zawierającego 27 tabel. Spis cytowanej literatury obejmuje 178 pozycji.

Praca została napisana poprawnie choć w pozostają w mocy uwagi na temat tego, że jest trudna w czytaniu. Ponadto Autorka nie ustrzegła się pewnych niedoskonałości językowych i edytorskich. Recenzent uznaje za takową konsekwentne stosowanie w całej pracy przymiotnika „konserwowane” zamiast „zachowane” lub „zachowawcze”. Ponadto, poniżej przedstawia zauważone w tekście usterki, których usunięcie jest konieczne w przypadku, gdyby Autorka zechciała opublikować uzyskane wyniki w formie pracy przeglądowej (lub prac) w języku polskim. Z pełnym przekonaniem powinno się Autorkę zachęcić do podjęcia tego wysiłku. Liczba tych usterek nie jest duża, większość ma charakter błędów literowych, niektóre wynikają ze stosowania żargonu laboratoryjnego. Na stronie 17 powinno być „tillering” (a nie „rillering”). Na stronie 25 zamiast „dodawanie cząsteczek fosforanu” powinno się raczej napisać „dołączanie reszt fosforanowych”. Bardziej poprawne niż „koncentracja czynnika” będzie napisać „stężenie czynnika...”, lub „poziom czynnika...” (str. 32). Mówimy raczej o „poziomie nadekspresji” niż „sile nadekspresji” (str. 32). Powinno być „DIFFERENTIAL” a nie „REIFFERENTIAL” – na str.38. Raczej „wykazujące ekspresję” lub „syntetyzujące” zamiast „eksprymujące” – wyrażenie ze str. 41. Trudne do rozróżnienia są kolory linii

w schemacie (i legendzie) na rysunku 12A (str. 42). W kulturze bakteryjnej 0,5 mM acetosyringon to stężenie a nie ilość; ile zatem dodano tej substancji? Alternatywnie, na str. 60 można było napisać „dodawano do stężenia 0,5 mM...”. Powinno się pisać „syntetyzowanego” a nie „syntezowanego” (str. 79). Na rysunku 24 brakuje objaśnienia znaczenia gwiazdek (istotność); odwrotnie – na rys. 29 (str. 95) zamieszczono wyjaśnienie ich znaczenia w podpisie a nie ma ich na rysunku. W tekście u dołu strony 90 powinno być odwołanie do rysunku 27 (a nie 26). Zwykło się pisać raczej „niższy” niż „mniejszy” poziom wyciszenia (str. 128). Na str. 131 należało zapisać: „regulacji fitohormonalnej”.

Wymienione powyżej usterki nie zmieniają ogólnie pozytywnego obrazu pracy. Pod względem formalny rozprawa zasługuje na taką właśnie ocenę.

Podsumowanie

Po analizie ocenianej rozprawy stwierdzam, że jej Autorka mgr Jolanta Groszyk zdobyła znaczny zasób wiedzy oraz posiadała wysokie kwalifikacje badawcze. Praca przygotowana na podstawie przeprowadzonych przez nią badań stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w rozumieniu art. 13 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) przywołanej w związku z art. 179 ust. 1. ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1669).

Na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie wniosek o dopuszczenie mgr Jolanty Groszyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. Cezary Mądrzak

Poznań, 28 grudnia 2018 r.