

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Yuliyi Kloc pt.
“Poznanie funkcji biologicznej genu *HvGSK* jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)**

Wprowadzenie

Doskonalenie cech użytkowych roślin rolniczych jest obecnie kluczowe w kontekście zmian klimatycznych, idei likwidacji istniejącego niedożywienia oraz wciąż powiększającej się populacji ludzi. Biotechnologia rolnicza dostarcza atrakcyjnych narzędzi wzbogacających możliwości konwencjonalnej hodowli odmian w postaci transgenezy, czy ostatnio mutagenezy ukierunkowanej narzędziami edycji genomu.

Przedstawiona do recenzji praca przedstawia analizę efektów zmian w ekspresji ważnego modułu szlaku sygnałowego brasinosteroidów, genu *HvGSK*, na parametry plonu i tolerancję na stres abiotyczny.

Świetny wybór zarówno obiektu – jęczmienia, ważnej rośliny zbożowej, oraz genu *HvGSK*, kodującego kinazę GSK3, która jako negatywny regulator szlaku sygnałowego mógłaby, w przypadku wyciszenia wzmocnić działanie brasinosteroidów, zarówno w aspekcie rozwojowym jak i reakcji na stres. Co więcej, praca ta zapoczątkowuje analizy porównawcze roślin otrzymanych poprzez klasyczną transgenezę wyciszającą konstrukcją genową (RNAi) z roślinami otrzymanymi poprzez ukierunkowaną mutagenezę narzędziami opartymi o CRISPR/Cas9. Dużym walorem tej pracy jest odważne poszukiwanie podstawowych odpowiedzi naukowych poprzez zaawansowane badania na roślinie użytkowej. Takie badania są rzadziej wybierane ze względu na zwykle dłuższy okres wegetacyjny, skomplikowane procedury transformacji genetycznej i co za tym idzie, konieczność optymalizacji warunków wielu doświadczeń. W efekcie pojawia się czasem konieczność porównania obiektów otrzymanych na różnych etapach realizacji doktoratu, co do których zgromadzono nieproporcjonalne ilości danych. Ten problem jest widoczny w niniejszej pracy, rozumiem konieczność takiego podejścia i dalej nie będę tego punktował.

Recenzowana praca jest wynikiem działalności doktorantki w dwóch projektach NCN – Opus (jako wykonawca) i Preludium (jako kierownik). Praca konsekwentnie zmierza do weryfikacji jasno postawionej hipotezy o zależności wyciszenia negatywnego regulatora ścieżki sygnałowej brasinosteroidów i poprawą kilku cech użytkowych, w tym tolerancji na zasolenie, masy tysiąca ziarniaków i biomasy roślin. Część wyników zostało opublikowane w wysokopunktowanym czasopiśmie IJMS, gdzie doktorantka jest pierwszą autorką.



Dane formalne o rozprawie

Praca jest napisana w języku polskim i ma format standardowej rozprawy doktorskiej zawierającej wszystkie wymagane elementy. Rozprawa liczy 126 stron. W całej pracy znajdują się cytowania 184 pozycji literaturowych, w tym ponad 30% (55) pozycji z ostatnich 5 lat. Cytowane prace bardzo dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w interesującej tematyce, a ich dobór i ilość są odpowiednie. Proporcje objętości tekstu i figur pomiędzy „przełogiem literatury” - 26 str., „materiałami i metodami” - 22 str., „wynikami” - 33 str. i „dyskusją” - 15 str. są wyważone. W tekst wkomponowano 36 rycin i 11 tabel opatrzonych w informatywne podpisy. Ryc 32 jest zbędna bo nie wnosi nic nowego ponad stwierdzenie, że wcześniej opisane konstrukcje są poprawne, co jasno opisano w tekście – tu ciekawe byłoby ewentualne stwierdzenie, że inne rejony konstrukcji objęte sekwencjonowaniem są zachowane w stanie niezmiennym (ale jeśli nie ma zmian, to też wystarczyłoby skwitować zdaniem w tekście). Małe zastrzeżenia redakcyjne mam do tabel prezentujących oligonukleotydy – 6,7 i 8. Raz końce 5' i 3' są opisane, a raz nie (w tej samej tabelce), zróżnicowany rozmiar czcionki sekwencji, nadmiarowe znaki, spacje.

Język rozprawy jest przejrzysty bez poważnych błędów, a terminologia naukowa zwykle profesjonalna (poza paroma potknięciami). Niemniej niektóre fragmenty pracy wydają się być pisane w pośpiechu, co skutkowało czasem niezręcznymi sformułowaniami. Język przeglądu literatury, opisu materiałów i metod, opisu wyników, prowadzenia dyskusji i wniosków – poprawne, merytorycznie ocenione dalej.

Ocena rozprawy

Tytuł jest syntetyczny i oddaje ogólnie treść i cele rozprawy. W wielu rozprawach doktorskich autorzy próbują bardziej uszczegółowić tematykę – tutaj można by dodać coś o cechach użytkowych i brasinosteroidach. Niemniej istnieją różne szkoły i komentarz ten nie jest zarzutem. Zarzutem będzie jednak pominięcie drugiego członu nazwy botanicznej gatunku – jęczmień zwyczajny. Przedstawiony w oddzielnym rozdziale cel, czy raczej sposób sformułowania celu i hipotezy badawczej nie są optymalne. Cel jest zdefiniowany jako weryfikacja hipotezy (jednej, ogólnej, mówiącej o zależności tolerancji na zasolenie i wybranych cech użytkowych od działania kinazy GSK3) – to oczywiście. Ale patrząc na wyniki, hipotez weryfikowanych w tej pracy jest dużo więcej. Można by sformułować hipotezy o trwałości efektu wyciszenia, o mechanizmie wyciszania paralogów, o preferencyjnej integracji transgeny w pojedynczym miejscu, o tym w jakim stopniu bikinina symuluje efekt wyciszenia *HvGSK1.1* (lub na odwrót), czy w końcu o naturze mutacji wygenerowanych poprzez CRISPR/Cas9 w tym genie. Cel, z kolei, mógłby być zdefiniowany bardziej ogólnie, jako zbadanie efektu wyciszenia i ukierunkowanej mutagenyzy negatywnego regulatora szlaku sygnałowego brasinosteroidów. Jeśli doktorantka ma w przyszłości zdobywać środki na

badania, to umiejętność formułowania hipotez badawczych ma duże znaczenie i wymaga jeszcze pewnego treningu.

Przegląd literatury jest najlepszą częścią rozprawy. Jest świetnym i dopracowanym omówieniem i usystematyzowaniem informacji o jęczmieniu, szlaku sygnałnym brasinosteroidów, wpływie brasinosteroidów na biologię roślin, kinazach GSK, wyciszaniu genów i edycji genów narzędziami CRISPR/Cas9. Drobne potknięcia to np.: str. 20 – domena kinazowa, której profil jest zdeponowany w bazie PROSITE pod nr rej. PS50011 zawiera w sobie już wzory PS00108 i PS00107 (a wymienione są jakby były trzy niezależne domeny); str. 24 – na Ryc.4 nie wiadomo co reprezentuje wartość 1,0 (100%) na wykresie; str. 33 -niezreczne sformułowanie „system proteasomów ubikwityny”; str. 34 – miRNA może regulować geny nie tylko potranskrypcyjnie; str. 38 cytowanie Doudna i Charpentier (2014) powinno być z jedno zdanie wcześniej, a akapit zaczynający się od „CRISPR/Cas9...” – wygląda jak z automatycznego translatora (a zmiany SDN1, 2 i 3 kompletnie niejasne).

Materiały i metody są przedstawione profesjonalnie i zawierają wszystkie niezbędne informacje techniczne. Dobór materiałów i metod jest jak najbardziej właściwy pod kątem wykonywanych eksperymentów i wyróżnia się przejrzystością i płynnością opisu wykonywanych procedur. Czytelnik odnosi wrażenie że osoba wykonująca i opisująca metodykę dobrze rozumie znaczenie otrzymywanych wyników. Potknięcia to: str. 42 – (tabelka) mio-inozytol to nie jest witamina A, tiamina, to witamina B1, a nie cała grupa B; str. 52 i wiele miejsc w tej pracy – stosowaliście metodę RT-qPCR, a nie qRT-PCR; str. 55 – z opisu wynika że stosowaliście sondę mieszaną, specyficzną do wszystkich sekwencji obecnych w plazmidzie, a nie 2 rodzaje sondy.

Rozdział wyniki obejmuje treściwy opis rezultatów poczynając od weryfikacji liczby kopii transgeny w liniach otrzymanych w okresie przed doktoratem. Zastosowano metodę opartą o ilościowy PCR wykazując duży udział pojedynczych miejsc integracji i w pojedynczej liczbie kopii, co jest kluczowe do wyciągania dalszych wniosków. Dalsze analizy wykonywano na liniach homozygotycznych pokolenia T2 i T4, wykazując w znacznej liczbie linii stabilność efektu wyciszenia genu docelowego. Pomimo, że linie otrzymano odstępie czasowym porównanie poziomu wyciszenia mogłoby być zaprezentowane na jednej, złożonej figurze (połączenie Ryc. 13 i 15). Bardzo ciekawym aspektem jest analiza ekspresji paralogów w liniach z wyciszonym *HvGSKI* w warunkach normalnych i w stresie podwyższonego zasolenia. Brakuje mi jednak dyskusji obejmującej bezwzględny poziom ekspresji analizowanych paralogów, gdyż często się zdarza, że paralog o „najciekawszym i najbardziej zaskakującym” profilu ekspresji jest wyrażany na bardzo niskim poziomie i jeżeli jest kilka innych paralogów o zakonserwowanej funkcji, to obserwowane zmiany mogą nie mieć biologicznego znaczenia. Przy okazji prezentowania i dyskusowania tych wyników napotkałem lakoniczne stwierdzenie, że ze względu na małe podobieństwo autorka nie spodziewa się wyciszenia krzyżowego postulując transkrypcyjną koregulację. Brakuje tutaj dowodu w postaci porównania sekwencji nukleotydowych, przynajmniej w rejonie gdzie sekwencja docelowa powinna się znajdować,

choć nie można wykluczyć działania phasiRNA i wtedy dłuższe dopasowanie sekwencji też miałyby sens.

Następnie analizowano parametry wzrostowe w warunkach normalnych i przy zasoleniu 200mM NaCl – biomasę, względną zawartość wody, cechy morfologiczne (pokrój, kąt nachylenia liści i wielkość liścia flagowego) i masę tysiąca ziarniaków. Dla wszystkich cech i poziomu ekspresji wybranych paralogów wykonano analizę korelacji Pearsona. Analiza potwierdziła pewną zależność ekspresji *HvGSK1.1* z niektórymi paralogami oraz odwrotną zależność z MTZ, biomasą i RWC.

Ostatnia część wyników to opis projektowania i wykonania konstrukcji do ukierunkowanej mutagenyzy genu *HvGSK* przy pomocy nukleazy CRISPR/Cas9 oraz transformacji genetycznej jęczmienia wraz z potwierdzeniem obecności transgeny w pokoleniu T0 i wstępną charakterystyką otrzymanych mutacji w pokoleniu T1 otrzymanym z jednej linii #VIII.8. Bardzo dobrze wybrano tu szybkie metody weryfikacji mutacji (2 niezależne metody), w tym metodę z zastosowaniem endonukleazy T7EI. Równie dobrze wygląda charakterystyka sekwencji amplikonów kilkudziesięciu linii pokolenia T1. Zastanawia mnie tylko czy metody te są już tak powszechne, że autorka zrezygnowała z cytowania literatury, skąd metodę zaczerpnięto, czy też są one nowymi autorskimi procedurami? Tutaj też nie zgadzam się na nazywanie NGS metodą – jest to co najmniej grupa metod. Abstrahując od paru drobnych potknięć z niecierpliwością będę czekał na analizy funkcjonalne otrzymanych mutantów. Te drobiazgi to: str. 83 – „docelowe gRNA”; str 93 – Ryc. 36 zapis sekwencji DNA od końca 3' – tak się nie robi, domyślną orientacją zapisu sekwencji jest 5' do 3' i tylko w uzasadnionych przypadkach możemy zapisać nią komplementarną w wyraźnym zaznaczeniu, że po lewej jest 3'.

Duża część wyników, to kolejne etapy procedury oceny roślin transgeniczných i weryfikowania wyciszenia genu docelowego, które wykonane i zinterpretowane są poprawnie, więc nie wymagają rozbudowanej dyskusji. W pewnych jednak punktach dyskusja jest bardzo ciekawa, tym bardziej, że pomimo stosunkowo krótkiego okresu badań brasinosteroidów, jest kilkadziesiąt bardzo ciekawych opracowań na rzodkiewniku i ryżu. W dyskusji autorka wskazała też plany dalszych analiz koncentrujących się na kolekcji mutantów CRISPR/Cas9, w tym analizy efektów off-target i badanie roślin w warunkach polowych. Popieram ten kierunek, choć ciekawe byłyby też analizy mechanizmu zaniku efektu wyciszenia genu docelowego w niektórych liniach pokolenia T4, czy też wyjaśnienie mechanizmu koregulacji paralogów *HvGSK*.

Kilka wniosków zdaniem recenzenta jest nieco niedopracowanych (część niedociągnięć wynika tu z błędów wytkniętych na wcześniejszych etapach recenzji): 1. Nie w jednym locus, a w pojedynczym locus. 3. Recenzent zrozumiał, że sonda była wyznakowanym plazmidem, więc hybrydujące małe RNA są komplementarne do konstrukcji wyciszającej, a nie do fragmentu genu docelowego (choć to wysoce prawdopodobne). 4. Zanik wyciszenia w

porównaniu z czym? 6. „Niski” poziom podobieństwa kasety wyciszającej i paralogów nie został nigdzie w pracy udokumentowany.

Na koniec chciałbym aby doktorantka, oprócz ustosunkowania się do wymienionych potknięć omówiła nieco szerzej następujące kwestie:

1. Na schemacie przedstawionym na Ryc. 1 kinaza BIN2 może mieć lokalizację cytoplazmatyczną i jądrową. Proszę rozwinąć temat lokalizacji tego białka oraz czy taki mechanizm może też być obecny w HvGSK? Proszę też wyjaśnić dlaczego lansuje Pani nazwę GSK a nie BIN?
2. Proszę przybliżyć na jakiej zasadzie NGS pozwala na analizę dziesiątek/setek mutacji w jednym genie i jak konstruowane są sekwencjonowane biblioteki?

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa jest wartościowym opracowaniem z zakresu analizy funkcjonalnej genu o centralnym znaczeniu dla przekaźnictwa sygnału hormonalnego brasinosteroidów. Praca potwierdza również przydatność manipulacji ekspresją kinazy HvGSK celem poprawy niektórych cech użytkowych. Opracowanie odzwierciedla wysokie umiejętności techniczne, ogromną pracę autorki i zawiera dobrej jakości i nowatorskie wyniki. Niezwykle cenne jest przekierowanie badań na analizy mutantów wygenerowanych narzędziem CRISPR/Cas9. Pomimo wskazania w recenzji paru niedociągnięć, nie stanowią one istotnych błędów rzeczowych i całą pracę oceniam bardzo dobrze. Analiza tekstu dowodzi, że autorka jest dojrzałym badaczem godnym awansu naukowego.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Yuliyi Kloc spełnia pod względem formalnym i merytorycznym wymogi dotyczące rozpraw doktorskich według ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), oraz art.179 ustawy z 3 lipca 2018 r. pn. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669). Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Yuliyi Kloc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marcin Filipecki
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
marcin_filipecki@sggw.edu.pl