

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Kai pt. "Identyfikacja mikroRNA specyficznych dla podkładek jabłoni", wykonana dla Rady Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Wprowadzenie

Badania mechanizmów reakcji i odporności roślin na choroby nieustająco cieszą się dużym zainteresowaniem zarówno ze względu na wielkość strat przez nie powodowanych w rolnictwie jak i możliwość ograniczenia obciążania środowiska stosowaniem chemicznych środków ochrony. Drugim powodem prowadzenia badań w tym kierunku jest fascynujący „wyścig zbrojeń” pomiędzy mikroblem zdolnym do szybkiej ewolucji arsenału patogeniczności i rośliną o szerokim spektrum mechanizmów adaptacji i odporności. Specjaliści od doskonalenia odmian roślin uprawnych często gromadzą w nowych odmianach naturalne geny odporności dające mocną odporność na pojedyncze rasy patogenu. Tę strategię nie zawsze można zastosować, bo albo brak naturalnych genów odporności albo jest ona szybko przełamana. Pozostaje trudne i żmudne poszukiwanie tzw. cech ilościowych, które dają nadzieję na trwalszą, trudniejszą do przełamania odporność. Badanie bardzo zróżnicowanych, molekularnych mechanizmów tych cech daje nadzieję na ich szersze wykorzystanie. Wyniki przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej wpisują się w ten nurt badań nad odpornością roślin, a wartość ich jest dodatkowo spotęgowana wyborem gatunku, jabłoni, o bardzo długim cyklu hodowlanym i wielkim znaczeniu ekonomicznym.

Recenzowana praca jest wynikiem działalności doktorantki w ramach kilku projektów: Międzynarodowe Programy Doktoranckie FNP, projektu NCN, Urzędu Pracy i Poznańskiego Konsorcjum RNA w ramach KNOW.

Celem przedłożonej pracy było zidentyfikowanie miRNA u jabłoni i określenie profili ich ekspresji w zależności od podkładki i powiązanie tych danych ze zróżnicowaną reakcją na zarazę ogniową. Praca obejmuje głównie szerokie analizy bioinformatyczne sekwencji otrzymanych metodami NGS oraz wstępną weryfikację molekularną.

Dane formalne o rozprawie

Rozprawa jest napisana w języku polskim i ma format standardowej pracy doktorskiej zawierając wszystkie wymagane elementy. Rozprawa liczy 105 stron plus 12-stronicowy suplement. W całej pracy znajdują się cytowania blisko 220 pozycji literaturowych, w tym ok. 1/5 pozycji z ostatnich 5 lat. Cytowane prace bardzo dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w interesującej tematyce, a ich dobór i ilość są odpowiednie. Proporcje ilościowe pomiędzy „przeglądem literatury” - 15 str., „materiałami i metodami” - 13 str., „wynikami” - 34 str. i „dyskusją” - 13 str. są dobrze wyważone. W tekst wkomponowano 20 rycin i 17 tabel opatrzonych w informatywne podpisy.

Język przejrzysty bez poważnych błędów językowych, terminologia naukowa profesjonalna, nieliczne literówki. Sposób sformułowania celu, hipotez badawczych i wniosków poprawny, znajdujący odzwierciedlenie w zaprezentowanych wynikach.

Ocena rozprawy

Tytuł oddaje treść i cele rozprawy. Cel jest dokładnie przedstawiony we wstępie, a hipotezy robocze jasno wynikają z opisu realizowanych zadań.

Przegląd literatury jest dobrym omówieniem i usystematyzowaniem informacji z zakresu tematyki pracy rozpoczynając się od pogłębionego i bardzo dobrego opisu mikroRNA u roślin, jednak z licznymi odwołaniami do świata zwierząt i człowieka. Następnie przedstawione jest omówienie dostępnych molekularnych i bioinformatycznych narzędzi do pracy z sekwencjami miRNA, ze szczególnym uwzględnieniem wyników sekwencjonowania nowej generacji i kryteriów dot. sekwencji i struktury zarówno prekursorów jak i dojrzałych cząsteczek miRNA. Kolejne dwa podrozdziały omawiają aspekty związane z konkretnym badanym układem eksperymentalnym – „wpływ podkładki na ekspresję genów w zrazie” oraz „zaraza ogniowa”, na którą to chorobę poszukuje się źródeł odporności. Szczególnie ten pierwszy podrozdział budzi pewien niedosyt, gdyż długodystansowy transport małych RNA (zwykle przez floem) jest niezwykle ciekawym i od lat dyskutowanym zjawiskiem (dla przeglądu polecam Sarkies i Miska 2014 doi:10.1038/nrm3840). Natomiast omówienie etiologii i znaczenia choroby jest wystarczające dla zrozumienia i docenienia rozprawy.

Materiały i metody jasno przedstawiają zakres i sposób wykonania analiz. Przede wszystkim dowiadujemy się, że eksperymenty miały właściwą liczbę powtórzeń biologicznych, a zastosowane metody były adekwatne. Analizy bioinformatyczne stanowią najobszerniejszą część pracy i opierają się o dwa główne eksperymenty mające za cel: (1) identyfikację w zdrowych, młodych pędach miRNA specyficznych dla podkładki o różnym wpływie na podatność na zarazę ogniową (1 odmiana x 4 podkładki x 3 powtórzenia biologiczne), oraz (2) identyfikację miRNA reagujących na zakażenie bakteryjne (1 odmiana x 2 podkładki x 2 punkty czasowe wraz z kontrolą x 3 powtórzenia biologiczne).

Metodyka analiz bioinformatycznych w obydwu eksperymentach przeprowadzona została nieco inaczej ze względu na różne technologie NGS (Solid i Illumina) jak i odstęp czasowy. Niemniej wyraźnie widać dużą wprawę w wykonywaniu tych analiz zarówno przy samodzielnym układaniu schematów analitycznych jak i doborze ustawień w bardziej kompleksowych pakietach. Do części analiz tworzone były własne skrypty w języku Perl. Metodyka eksperymentalnego potwierdzania obecności wykrytego miRNA obejmowała zarówno amplifikacje pre-miRNA jak i wykrywanie poziomu samych miRNA poprzez zastosowanie ilościowego stem-loop RT-PCR.

Wyniki, to najciekawsza część pracy. Ścieżki analityczne są dokładnie omówione i zinterpretowane. W pierwszej części zidentyfikowano 252 miRNA, z czego tylko 60 było dotychczas znanych u jabłoni i stworzono dedykowaną bazę danych, która niczym nie ustępuje bazie miRBase pod względem zawartości informacji i łatwości w korzystaniu. Część miRNA zostało potwierdzone eksperymentalnie zarówno na poziomie dojrzałego miRNA jak i pre-miRNA (kilka produktów PCR potwierdzono poprzez sekwencjonowanie). Poziom dojrzałych miRNA sprawdzony met. stem-loop RT-PCR często nie korelował z wynikami miRNA-seq, lecz jest to niestety cecha wielu eksperymentów z miRNA, które okazują się bardzo zmienne w powtórzeniach biologicznych. Na tym etapie przeprowadzono również analizę związku poziomu ekspresji miRNA z rodzajem podkładki i pomimo dużego zróżnicowania pomiędzy powtórzeniami biologicznymi wytypowano 14 miRNA o charakterystycznym dla podkładki i istotnym statystycznie wzorze ekspresji. Ekspresja tylko jednego miRNA (mdm-miR212N)

korelowała z cechą podniesionej odporności na zarazę ogniową. Wspomniana wcześniej baza danych zawiera również przewidziane w ramach ocenianej rozprawy transkrypty docelowe (w sumie 934), z których 76 (będących celem dla 29 miRNA) można było potwierdzić przy pomocy danych degradomowych jabłoni otrzymanych przez innych naukowców. Przypuszczalne i potwierdzone sekwencje docelowe zostały też sklasyfikowane do kategorii funkcyjnych zgodnie z terminami GO, na których wykonano analizę nadreprezentacji by zidentyfikować procesy preferencyjnie regulowane przez miRNA. Zabieg ten wymagał przyporządkowania sekwencjom jabłoni odpowiedników z rzodkiewnika. Niestety obraz dotyczył sekwencji docelowych dla wszystkich wykrytych miRNA, a nie dla grup w jakiś sposób sprofilowanych (zapewne z powodu małej ilości/braku podkładowo-specyficznych sekwencji). Niemniej recenzent docenia wykorzystanie tego narzędzia, bo zapewnia pewien sposób statystycznego ujęcia opisów sekwencji, traktowanych zwykle bardzo arbitralnie.

Druga część wyników dotyczy śledzenia dynamiki miRNA w odpowiedzi na infekcję *E. amylovora* na roślinach zaszczerpionych na podkładkach o skrajnym wpływie na podatność na zarazę ogniową (G.30 i M.27). Punktem wyjścia było sekwencjonowanie metodą Illumina o głębokości >10mln odczytów/bibliotekę i dalsze analizy. Strategia obróbki sekwencji była podobna jak poprzednio, choć z wykorzystaniem bardziej zintegrowanych narzędzi. Zidentyfikowano 233 nowe miRNA, z czego zdecydowana większość to tzw. długie miRNA (24nt) zaangażowane w proces metylacji DNA. Dla 9 z badanych 17 potwierdzono obecność pre-miRNA przez RT-PCR. Zdecydowana większość nowych miRNA występuje na niskim lub bardzo niskim poziomie. Analizę przeprowadzono zarówno w zależności od podkładki jak i w zależności od infekcji. Cztery miRNA wykazały ciekawe zróżnicowanie w zależności od podkładki jednak ich obecność jest raczej markerem podatności, a po infekcji również wykazują dynamikę na podkładce bardziej wrażliwej. Analizując miRNA w zależności od infekcji wykryto 3 istotnie reagujące na bakterie – jedno rosło, a dwa spadały 72 godz. po inokulacji. Jedno z nich, mdm-miR168a,b, zostało błędnie nazwane izomirem ath-miR168a,b, zamiast homologiem/ortologiem/analogiem (jestem otwarty na propozycje), nawet jeśli mają identyczną sekwencję.

Kolejna analiza obejmowała badanie miRNA po 2 i 72 godzinach od infekcji, przy czym kontrola miała liście tylko ponacinane, a próba badana ponacinane i inokulowane. Pomimo że i tu obserwowano dużą zmienność w powtórzeniach, wyselekcjonowano 3 miRNA o istotnej statystycznie zmianie ekspresji w czasie. Zaobserwowano również, że większą zmienność w profilach miRNA powoduje samo nacięcie niż inokulacja. Ten aspekt był dalej dyskutowany sugerując zmianę sposobu inokulacji. Niektóre wyniki tej analizy potwierdziły się po weryfikacji RT-PCR, a niektóre nie.

Dyskusja dotyczy najważniejszych aspektów metodycznych i biologicznych: lmiRNA, zmienności osobniczej, potwierdzenia danych NGS RT-PCRem, podwójnego stresu uszkodzenia i infekcji i co najatrakcyjniejsze, potencjalnych sekwencji docelowych. Rozdział jest wyważony i rzeczowy. Pewien niedosyt recenzent czuje w związku z ograniczeniem dyskusji o możliwym mechanizmie transportu małych RNA, czy też miejsca biogenezy tych cząsteczek (podkładka czy zraz). Oczywiście badanie wymienionych aspektów wymuszałoby zakładanie nowych doświadczeń i dodatkowe sekwencjonowanie nowych bibliotek. Tak więc ów niedosyt to raczej zaostrozony apetyt recenzenta niż zarzut dla spójnych analiz zaprezentowanych w niniejszej pracy.

Dyskusja prowadzi do końcowych wniosków wskazując jedno mikroRNA – mdm-miR535b,c jako najciekawszą kandydaturę do dalszych badań eksperymentalnych, zarówno jako marker podwyższonej odporności przez podkładkę, jak i potencjalny cel manipulacji genetycznych zmierzający do poprawy odporności. Sekwencją docelową tego miRNA mogą być czynnik transkrypcyjny SBP oraz/lub nodulina, co oczywiście wymaga potwierdzenia eksperymentalnego. Ten wybór recenzentowi wydaje się słuszny. Pomimo, że wnioski nie są ujęte w punktach, jak zwykle to bywa, nie umniejsza to ich wartości – są uprawnione i jednoznacznie wynikają z przeprowadzonych analiz i dyskusji.

W związku z niewielką ilością uwag dotyczących dysertacji chciałbym prosić o dodatkowe odpowiedzi na następujące kwestie związane z tematyką pracy:

1. Wychodząc z właściwej definicji izomiru (Morin i in. 2008 doi:10.1101/gr.7179508) – czy przeprowadzono jakieś analizy poza zaprezentowanym projektem dotyczące izomirów, a jeśli nie, to czy literatura donosi o zróżnicowanej specyfice regulacyjnej przez izomiry?
2. Wg niedawnych doniesień efekt działania miRNA poprzez cięcie docelowego mRNA może zostać zamplifikowany generując tzw. ta-siRNA. Pakiet UEA sRNA workbench obecnie oferuje takie narzędzie. Proszę o przybliżenie tematyki i ew. odpowiedź czy przymiarki do takich analiz były robione?

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa jest wartościowym opracowaniem z zakresu molekularnych mechanizmów oddziaływania podkładki na całą roślinę oraz reakcji na porażenie ważnym patogenem - *E. amylovora* na bardzo ważnej i trudnej roślinie. Opracowanie odzwierciedla wysokie umiejętności bioinformatyczne, koncepcyjne i pracę autorki oraz zawiera wysokiej jakości, nowatorskie wyniki w ilości wystarczającej na doktorat. Obok już opublikowanej pracy należy oczekiwać kolejnych punktowanych publikacji. Recenzent nie dostrzegł istotnych błędów rzeczowych, a cała praca wzbudziła duże zainteresowanie recenzenta. Analiza tekstu dowodzi, że autorka jest dojrzałym naukowcem, godnym awansu naukowego.

Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Elżbiety Kai do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Marcin Filipecki
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Ogródnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
marcin_filipecki@sggw.pl