

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Nauk Przyrodniczych | Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice  
tel. +48322009360 | kom. +48322009360  
e-mail: [malgorzata.gaj@us.edu.pl](mailto:malgorzata.gaj@us.edu.pl)

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Haliny Pietrykowskiej p.t.

#### **"Identification and characterization of microRNAs involved in sexual reproduction of *Marchantia polymorpha*."**

#### **Przedmiot rozprawy i jej znaczenie naukowe**

Recenzowana praca doktorska wpisuje się w zagadnienia genomiki roślin, a jej przedmiotem badań jest analiza mikrotranskryptomu wątrobowca, porostnicy wielkokształtnej, *Marchantia polymorpha*, przedstawiciela roślin niższych zwanych plechowcami. Gatunek ten od lat badany jest pod kątem ewolucji roślin lądowych, a od lat 90. XX w. jest także uznawany za atrakcyjny obiekt dla genomiki strukturalnej i funkcjonalnej roślin plechowych. O wysokiej pozycji tej rośliny w badaniach współczesnej biologii, a w szczególności genomiki roślin świadczy dedykowanie *M. polymorpha* całego numeru *Plant and Cell Physiology* [Volume 57(2), 2016], w którym opisano liczne zalety i dostępne narzędzia badawcze umożliwiające nowoczesne analizy struktury i funkcji genomu tej rośliny (w tym edytowanie genomu). W badaniach nad *M. polymorpha* przoduje Japonia i stąd nie dziwi, że część analiz opisanych w ramach pracy wykonana została na Uniwersytecie w Kyoto.

Modelowe dla genomiki roślin cechy *M. polymorpha* stały się zachętą dla Laboratorium Ekspresji Genów UAM kierowanego przez panią prof. Zofię Szweykowską-Kulińską, promotora recenzowanej pracy, do podjęcia badań nad identyfikacją cząsteczek miRNA kontrolujących rozmnażanie płciowe u *M. polymorpha*. Badania nad metabolizmem RNA, a szczególnie dotyczące miRNA u *Arabidopsis* i roślin uprawnych od lat z dużymi sukcesami są prowadzone w Zespole kierowanym przez p. prof. Z. Kulińską-Szweykowską. Światowy poziom prac tego Zespołu dokumentują publikacje pojawiające się w najlepszych czasopismach naukowych oraz przynależność do Poznańskiego Konsorcjum RNA mającego status KNOW. Regulacja procesów rozwojowych, w tym sterowanie procesami rozmnażania jest obecnie w centrum zainteresowania biologów molekularnych i biotechnologów roślin. Kolejne lata przynoszą nowe dowody, że kluczowymi regulatorami wszelkich procesów rozwojowych u roślin, w tym zmian fazy wzrostu z wegetatywnego na generatywny, są małe cząsteczki RNA (sRNA), w tym miRNA. Stąd też **praca mgr Haliny Pietrykowskiej podejmująca te problemy u *M. polymorpha* świetnie wpisuje się w bieżący, światowy nurt nauki**. Uznanie budzi szeroki zakres badań i różnorodność narzędzi genomiki zaprezentowanych w pracy doktorskiej. Duży rozmach eksperymentalny pracy potwierdzają też projekty pozyskane dla wsparcia finansowego badań, w tym dwa granty NCN (PRELUDIUM 7 i ETIUDA 5) oraz fundusze pozyskane z Poznańskiego Konsorcjum RNA (KNOW) finansowanego ze środków MNiSW. Macierzystą jednostką, w której wykonano badania było Laboratorium Ekspresji Genów, IBMiB UAM ale znaczną część badań wykonano podczas stażu doktorskiego realizowanego w ramach grantu ETIUDA 5 w Laboratorium Biologii Molekularnej Roślin na Uniwersytecie w Kyoto (Japonia). Ponadto, Doktorantka współpracowała z innymi jednostkami UAM oraz Wydziału BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego.

Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za niezwykle aktualne i interesujące dla współczesnej nauki.

---

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
ul. Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec  
tel. 32 36 89 400, 32 20 09 351, e-mail: [wnp@us.edu.pl](mailto:wnp@us.edu.pl)

## Struktura pracy

Pod względem formalnym rozprawa jest typową monografią o charakterze eksperymentalnym, napisana została w języku angielskim. Praca liczy 159 stron i składa się z szeregu rozdziałów i podrozdziałów o układzie typowym dla prac eksperymentalnych z zakresu biologii. Poniżej omawiam kolejne rozdziały rozprawy na bieżąco umieszczając komentarze do pracy i pytania do Doktorantki.

## Wstęp (Introduction)

W rozdziale Introduction Doktorantka dokonała przeglądu aktualnej literatury naukowej pod kątem wybranych zagadnień dotyczących *M. polymorpha* zebranych w dwa podrozdziały. Doktorantka przybliżyła obiekt swoich badań, *M. polymorpha* oraz w dokonała rewizji mikrotranskryptomu u 2 gat. wątrobowców (*Pellia endiviifolia* i *M. polymorpha*) poprzedzając te informacje przedstawieniem szlaku biogenezy miRNA u roślin. Dla niektórych z zagadnień ujętych w Introduction nie widzę uzasadnienia w przeprowadzonych badaniach np. nie widzę konieczności szczegółowego przedstawiania anatomii plechy wątrobowca, czy rozwoju gametoforów i sporofitu podczas gdy jednocześnie brakuje prostego, ogólnego schematu przedstawiającego przemianę pokoleń u wątrobowców. Schemat taki ułatwiłby czytającemu przypomnienie przebiegu tego procesu i nazw dla poszczególnych faz i typów organów. Szkoda, że Autorka nie skorzystała np. ze schematu zamieszczonego w nowej i cytowanej przez Doktorantkę pracy Flores-Sandoval et al. (2019). Z kolei, wprowadzenie odrębnego podrozdziału nt. biogenezy miRNA mylnie sugeruje, że jakieś elementy tego procesu były badane w pracy. Odwrotnie, w Introduction nie omówiono grupy małych specyficznych RNA wywodzących się z tRNA tzw., tRFs, które badano w pracy, o czym dowiadujemy się dopiero w Results. Mam również niedosyt informacji uzasadniających modelową pozycję *M. polymorpha* w badaniach molekularnych roślin, w tym opisu możliwości jakie stwarza ta roślina w genomice funkcjonalnej, szczególnie brakuje przybliżenia metod transformacji i edytowania genomu, które Doktorantka zastosowała w badaniach. Istotny, w mojej opinii, byłby podrozdział bardziej wnikliwie charakteryzujący genom i transkryptom *M. polymorpha*. Interesującym w kontekście tematu pracy, lecz pominiętym w Introduction, zagadnieniem jest rola miRNA w sygnalizacji auksyny, który to proces odgrywa szczególnie ważną rolę w rozwoju oraz rozmnażaniu roślin. Co prawda, w Dyskusji Autorka nawiązuje do niektórych elementów szlaku auksyny, czynnika ARF3 u *Marchantia*, ale nie w kontekście wagi sygnalizacji auksynowej w rozwoju roślin. Ostatnie badania pokazały bowiem niezwykle prostotę i unikalność sygnalizacji auksynowej u *M. polymorpha*, co pozwoliło uznać tę ścieżkę za ancestralną dla świata roślin. Ostatni podrozdział Introduction podaje przegląd miRNAs uczestniczących w rozwoju organów generatywnych u roślin, który uzupełnia schemat pokazujący miRNAs i ich geny docelowe kontrolujące przemiany faz rozwojowych u roślin kwiatowych, głównie *Arabidopsis* (Fig. 21). Niestety, zarówno w tekście jak i na schemacie, Doktorantka nie podała, które z opisywanych miRNA-zależnych ścieżek zostały opisane także u roślin plechowatych, wątrobowców, czy *M. polymorpha*. Co prawda, w dyskusji pojawiają się odniesienia do funkcji wybranych miRNA u *M. polymorpha*, ale w mojej opinii to rozdział Introduction powinien wyczerpująco przedstawiać stan wiedzy z tego zakresu.

Podsumowując, w mojej opinii rozdział Introduction pozostawia niedosyt wiedzy o aktualnym stanie badań i metod używanych u *Marchantia*/plechowatych jako rośliny modelowej w genomice roślin niższych. Trudno także wyrobić sobie opinię o aktualnym stanie wiedzy nt. roli miRNA w regulacji rozwoju plechowców/wątrobowców, w tym skali podobieństwa tych ścieżek regulacyjnych do roślin wyższych. **Mam nadzieję, że krótkie podsumowanie wiedzy z tego zakresu przyniesie autoprezentacja pracy podczas obrony.**

## Cel badań

Każda praca naukowa bez względu na formę - manuskryptu, czy też publikacji w czasopiśmie naukowym, powinna zawierać w początkowym rozdziale jasno zdefiniowane cele badań. W recenzowanej rozprawie ani

w Introduction ani w innych częściach pracy niestety nie znalazłam postawionej hipotezy badawczej i zdefiniowanych celów. Prosiłabym o korektę tego istotnego niedostatku rozprawy podczas autoprezentacji w czasie obrony.

## **Materiał i metody**

Materiałem badawczym były rośliny *M. polymorpha* L. subs. *ruderalis* Bischl. pochodzące z dwóch geograficznie odległych miejsc (accessions): lokalne okazy zebrane koło Sierakowa w Polsce oraz męskie i żeńskie genotypy Takaragaike, odpowiednio Tak-1 i Tak-2 pochodzące z Japonii. Wybór genotypu do badań genetycznych, a szczególnie genomowych ma podstawowe znaczenie. Dostępne od 2017 r. dane sekwencji genomu *M. polymorpha* oparte są na jednym osobniku żeńskim uzyskanym w krzyżówce Japońskich form Tak-1 i Tak-2. Do sekwencjonowania NGS stanowiącego centralną część pracy Doktorantka zastosowała lokalny polski genotyp *M. polymorpha*, pobierając materiał do analiz NGS z plech męskich i żeńskich oraz męskich i żeńskich organów rozrodczych wytwarzanych przez te plechy. Analizy NGS prowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych ale brak jednak informacji o tym, co stanowiło jedno powtórzenie biologiczne oraz w jakim stadium rozwoju roślin uzyskiwano materiał do izolacji RNA. Takie informacje, najlepiej poparte prostym schematem, przybliżyły by obiekt badań, bo w kontraście do roślin wyższych, plechowce są znacznie rzadziej badane przez biologów molekularnych. Doktorantka przedstawiając wyniki często odnosi się do danych uzyskanych w analizie roślin Tak „genotypu Japońskiego” (prace zespołu Bowmana) jednak nie komentuje możliwych różnic pomiędzy polską i japońską linią roślin i ewentualnego wpływu takich różnic na interpretację własnych wyników NGS. **Prosiłabym o wyjaśnienie tych wątpliwości, w tym przyczyn tego nieoczywistego doboru materiału badawczego. Co wiadomo o zmienności genetycznej u *Marchantia*? Czy uzyskane w pracy wyniki dla lokalnego genotypu wskazują na różnice w stosunku do genotypu Japońskiego?** Podkreślenie i zidentyfikowanie takich różnic wzbogaciłoby dyskusję uzyskanych w pracy wyników o nowy kontekście.

Wachlarz zastosowanych w pracy metod badawczych jest szeroki i bardzo imponujący i oprócz zaawansowanych metod molekularnych obejmuje kulturę, krzyżowanie i fenotypowanie roślin *Marchantia*, w tym z użyciem technik mikroskopii świetlnej i MRI, oraz transformację genetyczną z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* zastosowaną dla wyprowadzenia linii repeterowych GUS i mutantów CRISPR/Cas9. Doktorantka szczegółowo opisuje procedury analizy DNA, RNA i białek w tym profilowanie RMA metodą NGS i tworzenie biblioteki degradomów. Opis metod obejmuje znaczną część manuskryptu (blisko 40 stron) i poruszanie się po tym obszernym materiale opisowym nie jest łatwe, a Doktorantka nam tego nie ułatwia. Położenie kolejnych podrozdziałów nie zawsze jest oczywiste, np. podrozdział 2.1.2. *Agrobacterium-mediated M. polymorpha transformation* wbrew tytułowi nie zawiera pełnego opisu tej metody bo np. procedury związane z bakteriami do transformacji oraz konstrukty użyte w transformacji zawarto w innych rozdziałach (2.3.4 i 2.5.5). Podobnie, reakcja RT-qPCR została omówiona w podrozdziale 2.5. DNA methods, chociaż znacznie wcześniejszy podrozdział 2.4.3. cDNA synthesis wydaje się bardziej oczywistym miejscem dla opisu tej metody. Uzyskane w pracy mutanty edycyjne MIR11889<sup>ed</sup> krzyżowano między sobą i z formą WT, ale dowiadujemy się o tym dopiero w Results na str 125. Opis metody krzyżowania roślin *Marchantia* powinien znaleźć się w rozdziale Material and Methods.

Zakres metod zastosowanych w pracy świadczy o wszechstronnym i nowoczesnym warsztacie badawczym Doktorantki, który obejmuje zarówno tradycyjne, jak i najnowsze narzędzia np. CRISPR/Cas9, w biologii molekularnej roślin. Opis tego ogromu technik i podejść badawczych na pewno nie był łatwy, co może częściowo usprawiedliwiać trudności jakie napotyka czytelnik. Na pewno klarowność tej części pracy poprawiłoby: (i) przeniesienie wszystkich szczegółowych, mniej istotnych i „technicznych” informacji, np. składów pożywek, roztworów do Suplementu (Aneksu); (ii) logiczne uporządkowanie podrozdziałów; i co wydaje mi się najważniejsze - (iii) stworzenie ogólnego schematu przedstawiającego zestaw metod/podejść badawczych stosowanych w pracy- jaki materiał, jakimi metodami i w jakim celu poddano analizie.



**Wyniki:**

W pracy przeprowadzono głębokie sekwencjonowanie małych cząsteczek RNA (sRNA NGS) w czterech rodzajach plechy *M. polymorpha* – męskich i żeńskich plechach wegetatywnych oraz męskich i żeńskich gametoforach (odpowiednio antheridiophorach i archegonioforach) *M. polymorpha*. Zidentyfikowano miRNA ulegające różnicowanej ekspresji w badanych fazach rozwojowych roślin oraz wyróżniono rodziny miRNA specyficzne dla *Marchantia*, wątrobowców oraz te, które są wspólne (konserwowane) u roślin. Poziom ekspresji dla wybranych miRNA potwierdzano techniką northern blot. Następnie, metodą głębokiego sekwencjonowania degradomu zidentyfikowano docelowe mRNA dla wybranych i specyficznych dla wątrobowców rodzin miRNA. **Praca przedstawia także pogłębioną analizę funkcjonalną jednej z cząsteczek miRNA (Mpo-miR11889) i tę część badań uważam za najbardziej nowatorską i interesującą.** Wyniki NGS i northern blotting zgodnie wykazały, że cząsteczki Mpo-miR11889 ulegają wysokiej ekspresji w męskich organach rozrodczych (plemniach), co wskazuje na ich zaangażowanie w generatywnym rozmnażaniu *Marchantia* i uzasadnia podjęcie przez Doktorantkę dalszych analiz tych cząsteczek. Dla przybliżenia funkcji miR11889 Doktorantka skonstruowała linie reporterową, w której pod promotorem genu *MIRNA* dla badanego miRNA znalazł się gen *GUS*. Analiza sygnału *GUS* w tych liniach potwierdziła wyjątkowo wysoką aktywność genu dla miR11889 w męskich organach tj. plemniach (Fig.41). Słaba aktywność *GUS* widoczna jest też w żeńskich rodnich, co widać na zdjęciach (Fig. 42), **jednak Doktorantka nie odnosi się do tych obrazów i w ogóle nie cytuje Fig. 42 w tekście, co wymaga wyjaśnienia.** Analiza degradomu pozwoliła na wskazanie mRNA prawdopodobnie docelowego dla miR11889. Jest nim gen kodujący DUAL SPECIFICITY PHOSPHATASE 12-like (*DUSP12*), białko występujące u *Marchantia* pod postacią dwóch izoform, z których jedna (Mapoly0062s0043.1) jak wykazała Doktorantka, jest down-regulowana w plemniach. Co ważne, transkrypty kodujące obie isoformy *DUSP12*, są silnie wyciszane w komórkach plemnikowych, co wzmacnia hipotezę o zaangażowaniu modułu miR11889-*DUSP12* w generatywnym rozmnażaniu *Marchantia*. Doktorantka przedstawiła także zdjęcia obrazujące sygnał *GUS* w różnych organach linii reporterowej Mp*DUSP12*<sub>pro</sub>:*GUS*. Analiza wykazała intensywną aktywność badanego promotora w wegetatywnych plechach, plechach z plemniami oraz samych plemniach. Wynik ten nie został jednak zinterpretowany w kontekście regulacji genu *DUSP12* i roli miR11889 w tym procesie. **Ciekawa jestem, czy analizowano także sygnał GUS w plechach żeńskich i rodnich?** Dla zbadania funkcji Mpo-miR11889 w pracy metodą CRISPR-Cas9 wyprowadzono mutanty edycyjne niosące delecje (3 linie) i insercję (1 linia) w genie kodującym badany miR11889. Wyselekcjonowano dwie żeńskie i dwie męskie linie niosące mutacje typu INDEL zaburzające powstawanie prawidłowej drugorzędowej struktury miRNA (Fig. 53), co potwierdził brak ekspresji miR11889 u obu zmutowanych linii męskich. W zgodzie z tą obserwacją, u linii zmutowanych wykazano wzrost transkrypcji genu docelowego *DUSP12*, oraz stwierdzono akumulację białka *DUSP12* w plemniach jednej ze zmutowanych linii (Fig. 54, 60, 61). Dodatkowo, zaangażowanie miR11889 w rozmnażanie generatywne *Marchantia* potwierdził zaburzony fenotyp zmutowanych linii męskich, które wykazywały zmiany rozwojowe dotyczące morfologii, w tym ułożenia plemni wytwarzanych przez gametofit męski oraz przyspieszony czas dojrzewania komórek plemnikowych. Co ważne dla potwierdzenia związku regulacyjnego miR11889-*DUSP12*, rośliny z nadekspresją niewrażliwego na cięcie miR11889 transkryptu genu docelowego *DUSP12* wykazały nadprodukcję białka *DUSP12* oraz zmiany morfologiczne męskich gametofitów podobne do obserwowanych w liniach mutantów ze zniesioną funkcją miR11889. Należy jednak zaznaczyć, że zaobserwowane u mutantów edycyjnych zmiany ilościowe nie były jednak istotne statystycznie- np. liczba plemni oszacowana była dla gametofitów formy WT i dla mutantu Mpo-miR11889<sup>#2ge</sup> wynosiła odpowiednio od 18-71 oraz 2-84 plemni. Doktorantka przyczyny w trudności ilościowego potwierdzenia zmian w morfologii gametofitów męskich u mutantów upatruje w ciągłym, asynchronicznym rozwoju plemni. Zgadzam się, że taki proces jest trudny ale nie niemożliwy (co sugeruje Doktorantka) do analizy. W mojej opinii, podstawowym słabym punktem zaproponowanej analizy ilościowej była zbyt mała liczba ocenianych form WT vs mutant (oceniano zaledwie plemnie powstające na 7. gametofitach każdego genotypu).



Za ciekawy wątek w badaniach nad funkcją miR11889 w rozwoju *Marchantia* należy uznać doświadczenia mające odpowiedzieć, czy badany miRNA bierze udział w rozwoju sporofitu. Dla uzyskania odpowiedzi, Doktorantka przeprowadziła krzyżówki między mutantami oraz między zmutowaną linią żeńską, a WT. **Zastanawia brak krzyżówki odwrotnej, tj. zmutowanej linii żeńskiej x WT, prosiłabym o wyjaśnienie dlaczego pominięto tę kombinację.** W sumie, w różnych kombinacjach skrzyżowano ogółem 46 rodni, ale znakomita ich większość (80%) nie wytworzyła sporofitu. Dane pokazane w Tab. 64 (str. 126) zestawiającej wyniki krzyżówek są niejasne. Jeśli kolejne kolumny oznaczone jako „rep” oznaczają kolejne krzyżowane rodnie, to suma analizowanych rodni wg tej tabeli to 23, a nie 46? Szkoda, że nie zamieszczono informacji ile skrzyżowano rodni w danej kombinacji, co ułatwiłoby wnioskowanie na temat istotności obserwowanej zmian w rozwoju sporofitu. Wpływ mutacji sugerują zdjęcia (Fig. 63) dokumentujące rozwój na krzyżowanych rodniach nietypowych „drugorzędowych” struktur (wegetatywnych plech z rodniami), struktury takie rozwijały się wyłącznie w krzyżówkach linii noszących mutacje w genie *MIR11889*; ani w kontroli pozytywnej (WTxWT), ani negatywnej (zastosowano wodę zamiast komórek plemnikowych) takich struktur nie obserwowano. Prosiłabym o komentarz, jak należy rozumieć sugestię, że przyczynami powstania tych nietypowych struktur może być „lack of fertilization” albo „spontaneous development of thallus from the apical cell localized in the archegonial disc” (str. 126)? **Czy, a jeśli tak, to w jaki sposób badana mutacji w miRNA wywołuje ten efekt?** Doktorantka wraca do tego problemu w Dyskusji (str. 140) konkludując, że mimo wielu wysiłków („Despite many attempts...”) nie udało się ustalić, która z dwóch sugerowanych przyczyn odpowiada za powstawanie anormalnych, „piętrowych” gametofitów. **Interesuje mnie jakie badania w tym kierunku były podejmowane?**

Ponadto, proszę o interpretację wyniku przedstawionego na Fig. 40 (str. 109): metodą RT-PCR oceniano poziom ekspresji *MIR11889*, wykazując specyficzną dla męskich gametofitów (antheridiophores) akumulację transkryptów tego genu. W tym doświadczeniu jako matrycy użyto także genomowy DNA, gDNA, z męskiego i żeńskiego genotypu Japońskiego, Tak-1 i Tak-2, i wykazano obecność produktów reakcji RT-PCR dla obu próbek.

## Dyskusja

W Dyskusji, Doktorantka podsumowuje uzyskane w pracy wyniki i zestawia je z aktualną wiedzą. Autorka podzieliła ten rozdział na dwa główne podrozdziały – jeden z nich (4.1) dotyczy wyników uzyskanych z analiz transkryptomu, a drugi (4.2) skupia się na roli modułu regulacyjnego *miR11889-DUSP12* w rozmnażaniu *Marchantia*.

Omawiając zidentyfikowane w transkryptomie *Marchantia* miRNA Doktorantka, wzorem Results, dzieli miRNA, które ulegały zróżnicowanej ekspresji pod względem ich specyfiki i wyróżnia podrozdziały poświęcone *Marchantia*-specyficznym miRNA (2), miRNA specyficzne dla wątrobowców (oraz miRNA konserwowane u roślin (9)). Dyskusja w dużej mierze jest powtórny opisem wyników, Autorka często odwołuje się do figur i tabel z Results. Podobnie, wielokrotne omawianie i przywoływanie szczegółowych wyników jednej pracy (Bowman et al. 2017) nie uważam za twórcze, mimo że cytowana praca jest obecnie w świecie podstawowym źródłem wiedzy o genomie i transkryptomie *M. polymorpha*. Dodatkowo, monotonna i lita forma tekstu nie pomaga w wyłuskaniu fragmentów ważniejszych i nowych dla nauki obserwacji. Na pewno przejrzysta edycja i organizacja tekstu polepszyłaby komunikatywność przekazu (np. pogrupowanie zagadnień w paragrafy zaczynające się z tzw. „wcięciem” pierwszej linijki, wyróżnienie boldem nazwy miRNA, omawianego w danym paragrafie). Przykładem utrudnień jakie napotyka czytający jest umieszczenie Tab. 65 dopiero na str. 135, chociaż Autorka odwołuje się do tej tabeli już na str. 130. Część informacji podanych w Dyskusji powinna być wprowadzona wcześniej i szerzej omówiona Introduction, jak np. zagadnienia sygnalizacji auksynowej u *Marchantia* z udziałem ARF3 (o czym pisałam omawiając Introduction).



Moje zainteresowanie budzą szczególnie *Marchantia*-specyficzne miRNAs: **miR11796** akumulowany w żeńskim gametoficie, który prawdopodobnie kontroluje jeden z 5. genów kodujących histonu H1 oraz **miR11887** mający wysoką ekspresję w męskim gametoficie i prawdopodobnie kontrolujący jeden z 5. genów kodujących  $\beta$ -tubulinę. Wynika, z tego, że miRNA specyficzne dla *Marchantia* kontrolują powstawanie białek o bardzo podstawowej roli u wszystkich organizmów eukariotycznych, i dlatego istnienie specyficznych dla gatunku miRNAs kontrolujących powszechnie występujące białka wydaje się zastanawiające. **Stąd moje pytanie- co wiadomo o regulacji tych (lub innych konserwowanych w ewolucji) białek i roli miRNA w tej regulacji?** Doktorantka słusznie konkluduje, że konieczne są dalsze badania dla potwierdzenia przedstawionych hipotez dotyczących *Marchantia*-specific miRNA. **Czy Doktorantka planuje dalsze badania w tym kierunku i jakie eksperymenty warto zaproponować?**

U roślin wyższych wśród genów kontrolowanych przez miRNA przeważają geny kodujące czynniki transkrypcyjne (TFs). Sieci regulacyjne, w których kluczowe dla procesów rozwojowych TFs podlegają wielopoziomowej kontroli z udziałem miRNA są w ostatnich latach identyfikowane, i wzbogacane o nowe elementy. Niektóre zależności regulacyjne miRNA-TF zostały także potwierdzone jako funkcjonujące w rozwoju *Marchantia*, w tym opisany przez Doktorantkę moduł miR160-ARF3 prawdopodobnie kontrolujący tranzycję do fazy rozmnażania płciowego (str. 136), oraz moduł miR319-MYB33 zaangażowany u roślin wyższych w rozwój pylników (str. 137), którego rola w rozwoju męskich gametofitów choć sugerowana wymaga potwierdzenia. **Informacje te nasuwają pytanie o skalę podobieństwa regulacji procesów rozwojowych (tym rozmnażania płciowego) kontrolowanych przez kluczowe dla roślin wyższych TFs.** TFs u *Marchantia* zostały zidentyfikowane i scharakteryzowane, co umożliwia dokonanie takiej porównawczej analizy. **Czy u *Marchantia* (wątrobowców) wyróżnia się tzw. pionierskie TF o kluczowej roli w regulacji rozwoju organizmów, w tym reprogramowaniu komórek (cell fate control) ze względu na ich zdolność do aktywacji transkrypcji w rejonach gdzie struktura chromatyny wycisza geny.** Jednym z pionierskich TF jest LEC1 reprezentujący silnie konserwowane w ewolucji Eukaryota NF-YB białka. LEC1 jest między innymi zaangażowany w reprogramowanie embriogeniczne komórek, **czy odpowiedniki tego lub innych pionierskich TF funkcjonują u roślin niższych?**

Proszę także o **wyjaśnienie powodów dla których** miRNA171 uznane za konserwowane u roślin lądowych, oraz miR536 konserwowane u roślin, nie zostały wykryte metodą NGS w badanych próbkach *Marchantia* (str. 138).

Innym zastanawiającym wynikiem jest akumulacja miR8166 i jego docelowego transkryptu w tej samej tkance- męskich gametofitach. Dla wyjaśnienia tej obserwacji Autorka sugeruje istnienie specyficznej regulacji z udziałem miRNA („...a specific type of miRNA-guided regulation”, str. 134). **Czy taki mechanizm został już opisany i na czym on polega?**

Analizy wskazują, że dość często wyniki uzyskane w badaniach NGS nie potwierdzają analizy northern blot (np. dyskutowany na str. 133 przypadek miR8170). Z dziewięciu „plant-specific miRNA” tylko dla czterech wynik northern blot analizy był zgodny z wynikami NGS (Fig. 34). Problem ten szczególnie dotyczy produktów rozpadu tRNAs tzw tRFs. **Chciałabym poznać opinię Doktorantki na temat możliwych przyczyn takiej rozbieżności wyników analiz i wynikających z tego implikacji dla badań małych RNA, w tym miRNA.**

## Wnioski (Conclusions)

Wyniki badań Doktorantka podsumowała w dziewięciu wnioskach, które w mojej opinii są raczej streszczeniem uzyskanych w pracy wyników (adekwatna do tej formy tekstu byłaby nazwa „Summary of results”) i nie spełniają formuły wniosków. W trakcie obrony **prosiłabym o sformułowanie krótkich wniosków wskazujących najważniejsze dla nauki osiągnięcia tej pracy.** Ponadto, wnioski powinny jednoznacznie wskazywać, które wyniki /hipotezy są nowe dla nauki, a które są potwierdzeniem znanej już wiedzy.

---

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
ul. Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec  
tel. 32 36 89 400, 32 20 09 351, e-mail: wnp@us.edu.pl

**Praca nie jest wolna od błędów natury językowej, stylistycznej i edycyjnej, poniżej wskazuję niektóre z nich:**

*Błędy terminologiczne*

-str. 42: sformułowanie „transcription of miR172” jest błędne, transkrypcja dotyczy genu czyli, w tym przypadku *MIR172*; podobnie legenda pod Fig. 21 mówi o ekspresji genów, a na schemacie zapis sugeruje cząsteczki miRNA , a nie geny;

-linie reporterowe nie służą do oceny poziomu ekspresji badanego genu, jak błędnie stwierdzono np. na str. 109 i 115, ale pozwalają wnioskować o funkcji genu na podstawie analizy czasowo-przestrzennego wzoru ekspresji genu;

str. 129: „The plants were genotyped using western blot approach” – termin “genotypowanie” w stosunku do analizy białek nie jest poprawny.

*Dokumentacja fotograficzna jest często nie wystarczającej jakości, a opisy zdjęć niepełne, np.*

- Fig. 7B (str. 26) – opis na zdjęciu (małe, czarne litery) jest niewidoczny

-Fig. 43, str.111: obrazy na fotografiach są nieczytelne, czy rzeczywiście, zgodnie z legendą, można na nich dostrzec akumulację *MIR11889* transkryptów w badanych męskich i żeńskich organach

-Fig. 57- nie podano jakie genotypy reprezentują pokazane na zdjęciach męskie gametofity (str.122), a zaznaczone strzałkami obrazy identyfikujące wskazane elementy są nierozpoznawalne.

-str. 127:Fig. 63, oznaczenie i opis pokazanych na zdjęciach struktur pomógłby zidentyfikować pokazane obrazy; podobnie zdjęcia z Fig. 64 są nie uwzględnione w tekście; nie wiadomo co pokazują strzałki.

-str. 128 – na Fig. 65 i 66: brakuje zdjęcia kontroli (WT) , które jest konieczne aby wnioskować o zmianach fenotypowych u mutanta; jakość zdjęć jest słaba.

*Błędy edycyjne:*

- lista skrótów jest niekompletna, np. brak sgRNA, R.T.;

- str. 115: opis w tekście dotyczy Fig. 49, a nie 48;

- częsty błąd to brak spacji np. przed numerem figury i tabel (np. Tab.8-10, str. 50 i inne), albo przy podawaniu danych liczbowych, np. 500µl zamiast 500 µl (str. 48 i inne), 740nm (str. 48 i inne), 10ml (str. 50 i inne); brak spacji po kropce kończącej zdanie np. str. 54 i inne;

- Rozdział LITERATURE zawierający spis cytowanych publikacji naukowych jest wyedytowany niestarannie, wielkość liter w tytułach prac jest różna (czasem każde słowo z dużej litery, w innych tytułach, nie) kolejne prace nie są wyróżnione (np. przez odstęp między wierszami, czy tzw. „wystający pierwszy wiersz”), co bardzo utrudnia wyszukiwanie prac na liście;

-sposób cytowania publikacji w tekście nieprawidłowy: zamiast nazwiska tylko pierwszego autora, często podawane jest kilka nazwisk z listy wieloautorskiej (np. str. 10, 42, 43),

**Wniosek końcowy**

Powyższe komentarze i uwagi krytyczne nie wpływają w sposób istotny na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej pracy p. mgr Haliny Pietrykowskiej i wkładu opisanych w niej badań w we współczesną naukę. Przedstawiona do oceny praca jest dowodem, że mgr H. Pietrykowska potrafi formułować interesujące i aktualne dla nauki pytania i dysponuje imponująco rozległym warsztatem badawczym z zakresu najnowszych metod biologii molekularnej roślin. W wyniku szeregu pracochłonnych doświadczeń przeprowadzonych we współpracy z innymi ośrodkami Doktorantka zgromadziła interesujące wyniki, które stanowią podstawę do dalszych badań nad mechanizmami miRNA-zależnej kontroli procesów rozmnażania u roślin. Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej mgr Haliny Pietrykowskiej istotnie rozszerzają wiedzę o roli miRNA w regulacji procesów rozwojowych u roślin niższych, a w szczególności rozmnażania generatywnego u *Marchantia polymorpha*. Mam nadzieję, że część opisanych w manuskrypcie wyników, przede wszystkim te wskazujące na udział modułu miR11889-DUSP12 w rozwoju organów reprodukcyjnych u *M. polymorpha*, zostaną wkrótce opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu, a komentarze zamieszczone w recenzji pomogą w przygotowaniu tej publikacji.

Niniejszym stwierdzam, że **rozprawa doktorska pani mgr Haliny Pietrykowskiej spełnia wymogi warunków określonych w art.13 ust.1 Ustawy a dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. Poz. 1789). Wobec powyższego wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Haliny Pietrykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Małgorzata D. Gaj