

Prof. dr hab. Iwona Szarejko
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Smoczyńskiej
pt. „Rola jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego MADS27 i jego regulatora
mikroRNA444 w odpowiedzi rośliny na niedobór i nadmiar azotu”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Smoczyńskiej została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Przedmiotem rozprawy jest kompleksowa analiza funkcji i mechanizmów regulacji jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu w podłożu. Geny kodujące czynniki transkrypcyjne z domeną MADS-box, do których należy HvMADS27, biorą udział w regulacji wielu procesów rozwojowych roślin a także w ich odpowiedzi na różnorodne stresy abiotyczne. Odgrywają one kluczową rolę w interakcjach genetycznych, które łączą sygnały środowiskowe z poszczególnymi procesami rozwojowymi. Geny MADS regulowane są przez miRNA, w tym miRNA kodowane przez geny z rodziny MIR444, występującej tylko u roślin jednoliściennych. W ostatnich latach, w kierowanym przez Panią Prof. Zofię Szweykowską-Kulińską zespole naukowym, który należy do jednych z wiodących ośrodków badań nad metabolizmem RNA na świecie, zidentyfikowano dla jęczmienia geny z rodziny MIR444 i ich geny docelowe. Odkrycie to dało asumpt do podjęcia przez Doktorantkę badań nad rolą miRNA444 i związanego z nim czynnika transkrypcyjnego z rodziny MADS-box, jako elementów systemu odpowiedzi jęczmienia na nadmiar azotu w glebie.

Azot jest niezbędnym pierwiastkiem dla wzrostu i rozwoju roślin, jednak jego nadmiar w glebie może powodować negatywne skutki dla roślin uprawnych, takie jak skrócenie systemu korzeniowego, zahamowanie wzrostu, przedwczesne starzenie i w rezultacie zmniejszone plonowanie. Nadmiar azotu w glebach uprawnych jest nie tylko stresem abiotycznym dla roślin, lecz ma także negatywny skutek środowiskowy. Ponieważ rośliny pobierają mniej niż połowę stosowanych dawek nawozów azotowych, większość niewykorzystanego azotu zanieczyszcza wody gruntowe, negatywnie wpływając na zdrowie zwierząt i ludzi. Gleba i wody gruntowe z nadmiarem azotu stają się w dzisiejszych czasach dużym problemem środowiskowym w wielu miejscach na świecie. Poznanie molekularnego podłoża odpowiedzi na stres wywołany nadmiarem azotu dla ważnej rośliny uprawnej, jaką jest jęczmień, ma duże znaczenie dla zrozumienia procesów metabolizmu azotu u roślin, a także może stanowić podstawę do opracowania narzędzi biotechnologicznych służących do sterowania tym procesem. Z tych względów tematykę rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Smoczyńskiej uważam za bardzo aktualną i ważną merytorycznie.

Szczegółowe cele rozprawy, obiekt badań i zastosowane metody badawcze

Głównym celem badań podjętych przez Doktorantkę było poznanie biologicznej funkcji czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 i jego regulatora miRNA444c oraz ich roli w kształtowaniu interakcji łączących budowę systemu korzeniowego jęczmienia z odpowiedzią na stres wywołany przez nadmiar azotu w środowisku. Obiektem badań były rośliny WT i linie transgeniczne jęczmienia odmiany 'Golden Promise': 1) linia z obniżonym poziom

ekspresji genu dla czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 na skutek nadekspresji sztucznego mikroRNA (linia oznaczona jako *hvmads27 kd*) oraz 2) linia z nadekspresją genu dla czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 w fuzji z etykietą c-Myc, umożliwiającą oznaczenie poziomu białka (linia oznaczona jako *hvmads27 c-Myc OE*)..

Dla osiągnięcia postawionych celów, mgr A. Smoczyńska przeprowadziła szereg starannie zaplanowanych badań molekularnych i analiz bioinformatycznych, w których krok po kroku wyjaśniała mechanizm regulacji czynnika transkrypcyjnego HvMADS27, a następnie kontrolowanych przez niego genów zaangażowanych w odpowiedź na stresy środowiskowe u jęczmienia.

Szczegółowe doświadczenia i analizy obejmowały:

- identyfikację pełnych sekwencji genomowych genów *MIR444c* i *HvMADS27*
- analizę wzoru ekspresji dojrzałej cząsteczki miRNA444c oraz genu *HvMADS27* w czasie rozwoju jęczmienia i w jego różnych organach
- identyfikację elementów regulatorowych w promotorach *MIR444c* i *HvMADS27*
- wyprowadzenie linii transgeniczných jęczmienia z obniżonym poziomem ekspresji i nadekspresją genu *HvMADS27*
- analizę systemu korzeniowego uzyskanych linii transgeniczných w odpowiedzi na nadmiar i niedobór azotu
- identyfikację genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny HvMADS27

W prowadzonych badaniach mgr A. Smoczyńska zastosowała cały wachlarz nowoczesnych technik i metod z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii i bioinformatyki. Wykazała się biegłą znajomością technik analizy kwasów nukleinowych i białek, począwszy od ich izolacji z materiału roślinnego, poprzez badania ekspresji (RT-qPCR, Western i Northern blot, techniki głębokiego sekwencjonowania transkryptomu i sRNA). Przeprowadziła, analizy promotorów i ich oddziaływania z analizowanym czynnikiem transkrypcyjnym z zastosowaniem technik bioinformatycznych i immunoprecypitacji chromatyiny w połączeniu z ilościowym PCR. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt skonstruowania przez Doktorantkę wektorów niosących sekwencje genomowe pozwalające na wyciszenie lub nadekspresję genu *HvMADS27*, z wykorzystaniem, odpowiednio, amiRMADS27 i sekwencji kodującej genu *HvMADS27* w połączeniu z etykietą c-myc. Konstrukty te posłużyły następnie Doktorantce do transformacji genetycznej jęczmienia odmiany 'Golden Promise' za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* i uzyskania linii transgeniczných, stanowiących podstawowy materiał Jej badań. Tak więc Doktorantka wykazała się biegłością w konstruowaniu wektorów, a także sztuką transformacji genetycznej oraz regeneracji roślin w kulturze niedojrzałych zarodków jęczmienia, który jest gatunkiem trudno poddającym się obu tym procesom. Należy tu zaznaczyć, że w przeciwieństwie do gatunków modelowych, dla jęczmienia brak jest kolekcji mutantów w zdefiniowanych genach, a efektywność procesu transformacji genetycznej w bardzo dużej mierze zależy od genotypu transformowanej rośliny.

Zastosowane w ocenianej pracy obiekty i metody badawcze oceniam jako w pełni odpowiednie dla osiągnięcia założonego przez Doktorantkę celu badawczego. Doświadczenia zostały zaplanowane w sposób starannie przemyślany, a metody właściwie dobrane do każdego eksperymentu. Jedynie do opisu materiału badań i niektórych metod mam kilka uwag przedstawionych w dalszej części tej recenzji.

Najważniejsze uzyskane wyniki

W rozprawie przedstawiono wyniki logicznie zaplanowanych i opisanych analiz, a za najważniejsze z nich uważam:

1. Wykazanie, że czynnik transkrypcyjny HvMADS27 jest kodowany w chromosomie 2H na nici DNA przeciwległej do nici kodującej genu *MIR444c* i eksperymentalne

potwierdzenie, że w warunkach kontrolnych poziom transkrypcji genu *HvMADS27* jest regulowany przez miRNA444c.

2. Stwierdzenie, że *HvMADS27* ulega ekspresji głównie w korzeniach jęczmienia a poziom jego transkrypcji u roślin typu dzikiego (WT) jest znacznie obniżony pod wpływem stresu nadmiaru azotu, natomiast nie ulega zmianie w odpowiedzi na niedobór azotu.
3. Wykazanie, że w warunkach kontrolnych rośliny transgeniczne z obniżoną poziomem transkryptów *HvMADS27* wykazują znaczące skrócenie korzeni w stosunku do WT i roślin z nadekspresją tego genu (*hvmads27 c-Myc OE*), a także wyższe stężenie ABA w korzeniach niż dwie pozostałe formy.
4. Ustalenie, że stres nadmiaru azotu nie wpływa na długość systemu korzeniowego, zawartość azotu i poziom ABA w siewkach linii z obniżonym poziomem transkryptów *HvMADS27*, w przeciwieństwie do roślin WT i z nadekspresją genu, które reagują skróceniem korzeni i podniesieniem w nich zawartości azotu oraz ABA w odpowiedzi na ten stres
5. Zidentyfikowanie genów potencjalnie regulowanych przez *HvMADS27*.
6. Wyjaśnienie roli *HvMADS27* w wywołaniu zmian fenotypowych systemu korzeniowego jęczmienia poddanego stresowi azotowemu, poprzez udowodnienie, że *HvMADS27* reguluje ekspresję genu *BGI* odpowiedzialnego za uwolnienie ABA z nieaktywnego koniugatu z glukozą, co prowadzi do akumulacji ABA w korzeniach jęczmienia i skrócenia ich długości.

Ocena formalnej strony pracy, pytania i komentarze

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. We Wstępie wyczerpująco przedstawiono aktualne zagadnienia związane z metabolizmem azotu i reakcją roślin na stres jego niedoboru lub nadmiaru. W kolejnym podrozdziale przedstawiono rodzinę miRNA444 regulujących aktywność genów kodujących czynniki transkrypcyjne z domeną MADS-box. Szkoda, że ten rozdział Doktorantka potraktowała raczej skrótowo, przede wszystkim w odniesieniu do roli czynników MADS-box w procesach rozwoju roślin i odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Doktorantka nie ustrzegła się także pewnych błędów merytorycznych, opisując czynnik transkrypcyjny OsMADS57 i regulowane przez niego geny. Gen *DWARF14* nie bierze udziału w biosyntezie brassinosteroidów, jak stwierdzono w pracy, lecz koduje receptor strigolaktonów (Yao et al., Nature. 2016 Aug 25;536 (7617):469-73), z kolei kluczowy gen biosyntezy brassinosteroidów u ryżu to *BR-deficient dwarf 1* (*OsBRD1*), opisany w pracy Jiao et al. (2020) Plant Physiol. 3: 1454-1466, która cytowana jest przez Autorkę w rozprawie. Wymienione geny są regulowane przez czynniki MADS-box i miRNA444, dlatego chciałabym w tym miejscu prosić Doktorantkę o wyjaśnienie zależności między miRNA444, czynnikami transkrypcyjnymi z domeną MADS-box a biosyntezą bądź signalingiem brassinosteroidów i strigolaktonów i ich wpływem na architekturę części nadziemnej i systemu korzeniowego u ryżu. Czy wiadomo, ortologiem których genów Arabidopsis i ryżu jest *HvMADS27*?

Cele pracy są jasno sformułowane i dobrze uzasadniają podejmowanie przez Doktorantkę kolejnych etapów badań. Natomiast rozdziały przedstawiające materiał i metody, choć bardzo obszerne, nie zawierają wszystkich informacji, przede wszystkim odnośnie materiału wykorzystanego w badaniach. Które pokolenie uzyskanych przez Doktorantkę linii transgenicznych z obniżoną ekspresją i nadekspresją genu *HvMADS27* wykorzystano w poszczególnych doświadczeniach? Z ilu roślin i którego pokolenia pobierano materiał do badań molekularnych i analiz systemu korzeniowego? W ilu powtórzeniach biologicznych prowadzono poszczególne analizy i co stanowiło jedno powtórzenie? Pytania te dotyczą większości przeprowadzonych przez Doktorantkę doświadczeń. Ponadto, przedstawiony w Metodach opis uzyskanych linii transgenicznych jest bardzo lakoniczny, przydatne w tym miejscu byłyby schematy insertów wstawionych do każdej z linii. Przedstawione w Materiałach wektory wykorzystane do otrzymania konstrukcji i transformacji jęczmienia nie

zawierają legendy. Mam jeszcze inne pytanie dotyczące Metod: czy w doświadczeniu nad wpływem braku światła rośliny rosły w ciemności przez dwa tygodnie, jak napisano w tym rozdziale, czy tylko 48 godzin, jak przedstawiono w podpisie Ryc. 5 ?

Wyniki badań Doktorantka ujęła w 9 podrozdziałach, przedstawiających opis rezultatów doświadczeń i analiz bioinformatycznych. Dokumentacja wyników jest kompletna, choć nie zawsze przejrzysta, (o czym piszę poniżej). Nie znalazłam jedynie informacji, ile z genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję między linią *hvmads27 kd* a WT posiadało w promotorach motywy *cis* rozpoznawane przez czynniki z domeną MADS-box i co kierowało wyborem do analizy ChIP-qPCR sześciu konkretnych genów, przedstawionych na Rys. 10. Ponadto, zdając sobie sprawę, że doświadczenie dotyczące transformacji genetycznej jęczmienia było jedynie narzędziem do uzyskania materiału badań, brakuje mi jednak pełnej informacji o jego przebiegu, tj. podania efektywności procesu transformacji, analizy pokolenia T0 i T1 pod kątem liczby kopii transgenu i częstotliwości homozygot. Te informacje, umieszczone jako osobny podrozdział Wyników lub uzupełnienie odpowiedniego podrozdziału w Metodach, pozwoliłyby czytelnikowi ocenić, czy transformacja genetyczna jęczmienia nadal jest trudnym problemem metodycznym, czy też zastosowana przez Doktorantkę procedura gwarantuje wysoką efektywność tego procesu, przynajmniej dla odmiany 'Golden Promise'.

Dyskusja, stanowiąca zawsze największe wyzwanie dla Doktoranta, została opracowana w sposób wyczerpujący i, co warto podkreślić, nie stanowi dodatkowego rozdziału przeglądu literatury, lecz bardzo interesujące tłumaczenie uzyskanych wyników w konfrontacji z literaturą. Szczególnie ciekawa jest część, w której Autorka stawia hipotezy wyjaśniające obniżenie, pod wpływem nadmiaru azotu, poziomu białka fuzyjnego HvMADS27 z etykietą c-Myc w liniach z nadekspresją cDNA kodującego to białko pod kontrolą promotora ubikwitynowego. Równie interesująco przedstawiona jest konfrontacja zidentyfikowanej przez Doktorantkę roli ABA w skróceniu korzeni u jęczmienia pod wpływem nadmiaru azotu, z molekularnymi mechanizmami tego procesu u *Arabidopsis*. Rozprawę kończy (poza spisem literatury) rozdział Podsumowanie, w którym Autorka klarownie sformułowała wnioski ze swoich badań.

Należy jeszcze wspomnieć o zamieszczonym na początku pracy, wykazie stosowanych skrótów, co zwykle jest bardzo cenne dla czytelnika. Niestety, wykaz ten jest mocno niepełny i brakuje w nim wyjaśnienia większości skrótów nazw wielu genów lub białek używanych w pracy. A chyba niepotrzebnie umieszczono wyjaśnienia skrótów dla mRNA czy miRNA.

Na koniec formalnej oceny pracy chciałabym zwrócić uwagę na dwie kwestie dotyczące całego manuskryptu. Pierwsza, to całkowicie dowolny sposób używanej przez Autorkę pisowni nazw genów, białek i mutantów. W jednym zdaniu Autorka używa skrótów HvMADS27, hvMDAS27, MADS27 (bez kursywy) i dopiero z kontekstu całego akapitu czytelnik może się domyśleć, że jest mowa o jednym i tym samym genie jęczmienia, a nie o trzech różnych białkach. Podobne niekonsekwencje można znaleźć na wykresach i podpisach pod nimi. Ta niestaranność w stosowaniu zasad pisowni nazewnictwa genetycznego bardzo utrudnia czytanie pracy i mam nadzieję, że Doktorantka nie dostarczy recenzentom przygotowywanej publikacji swojego doktoratu powodów do podobnych uwag.

Mój drugi komentarz dotyczy zamiennego używania przez Doktorantkę terminu linia transgeniczna i mutant. W tym miejscu poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie w czasie obrony doktoratu, dlaczego tylko ten pierwszy termin jest prawidłowy w odniesieniu do badanych przez nią linii.

Powyższe uwagi krytyczne i komentarze dotyczą przede wszystkim kwestii edycyjnych i nie wpływają na moją wysoką opinię o merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Smoczyńskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa Pani mgr Aleksandry Smoczyńskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wyzwanie, jakie podjęła Doktorantka było ogromne, biorąc pod uwagę, że dla jęczmienia, stanowiącego obiekt jej badań, nie ma kolekcji narzędzi molekularnych dostępnych dla roślin modelowych. Kandydatka musiała więc najpierw stworzyć te narzędzia w postaci linii transgeniczných z wyciszoną ekspresją i nadekspresją analizowanego przez siebie genu, a dopiero potem przystąpić do badania jego biologicznej funkcji. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej dotyczącej problematyki swych badań, umiejętnością stawiania hipotez naukowych, planowania eksperymentów i stosowania najnowszych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii i bioinformatyki. Wykazana w rozprawie zdolność mgr Aleksandry Smoczyńskiej do krytycznej oceny uzyskanych wyników i wyważonego wnioskowania świadczy o Jej dojrzałości naukowej. Otrzymane wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa w pełni spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Smoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katowice, 13.04.2022

Prof. dr hab. Iwona Szarejko