

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Kai
Tytuł rozprawy: Identyfikacja mikroRNA specyficznych dla podkładek u jabłoni

Promotor: Prof. dr hab. Izabela Makalowska

MikroRNA (miRNA) to małe niekodujące RNA, pełniące kluczową rolę w regulacji ekspresji genów kodujących mRNA, a także w mechanizmie interferencji RNA, polegającym na hamowaniu translacji lub indukcji degradacji docelowych mRNA, zawierających sekwencje komplementarne do miRNA. Regulacja ekspresji genów za pośrednictwem miRNA jest zjawiskiem powszechnym u roślin i zwierząt, a odkrycie i ustalenie roli zaangażowanych w ten proces białek uhonorowano w 2006 roku nagrodą Nobla. Zmiany ilościowe mRNA genów wywołane działaniem miRNA zależą od m.in. stanu komórki i odzwierciedlają dynamikę jej odpowiedzi na np. czynniki stresowe. Rozprawa doktorska Pani Magister Elżbiety Kai poświęcona została opisowi cząsteczek miRNA zidentyfikowanych u jabłoni odmiany „Gala”, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA warunkujących różne fenotypy jabłoni w zależności od zastosowanej podkładki. W sadownictwie przeszczepianie jabłoni na rośliny określane mianem podkładek, jest sposobem na zmianę/polepszenie cech fenotypowych. Rodzaj podkładki ma wpływ na wiele cech rośliny przeszczepianej (zrazu) m.in. pokrój, wigor, wielkość plonu oraz odporność na stresy zarówno bio- jak i abiotyczne. Mechanizmy leżące u podstaw regulacji cech fenotypowych zrazu przez podkładkę nie są do końca poznane, wiadomo jednak, że rodzaj podkładki wpływa na profil transkryptów w pędach zrazu. W świetle odkryć długodystansowego transportu cząsteczek takich jak miRNA w roślinie, można postawić hipotezę, że to one właśnie przemieszczając się między podkładką a zrazem modulują ekspresję genów. W rozprawie uwagę zwrócono także na miRNA warunkujące odporność jabłoni na zarazę ogniową i potencjalnie biorących udział w odpowiedzi na infekcję bakterii *Erwinia amylovora*. Identyfikację tychże miRNA oparto głównie na metodach głębokiego sekwencjonowania i analizach bioinformatycznych. Poziomy ekspresji wybranych miRNA weryfikowano przy użyciu metod eksperymentalnych. Przeprowadzone badania znacznie poszerzyły katalog znanych dla jabłoni cząsteczek

miRNA. W całym projekcie przewidzianych zostało 427 prekursorów oraz 378 unikatowych dojrzałych cząsteczek miRNA, z czego aż 323 to cząsteczki wcześniej nieznane.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty w sposób zwarty i rzeczowy opisują założenia, sposób realizacji oraz znaczenie badań. Wstęp selektywnie wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia, takie jak biogeneza i funkcja cząsteczek mikroRNA, metody ich identyfikacji oraz obecny stan wiedzy o miRNA u jabłoni. Autorka poświęca w nim uwagę znaczeniu uprawy jabłoni w Polsce, opisuje rolę i zasadność szczepień tego drzewa oraz problem zarazy ogniowej, bakteryjnej choroby odpowiedzialnej za szkody w sadownictwie. Ta część tekstu uzupełniona jest poglądowymi rysunkami (str. 11 i 17). Następny rozdział to precyzyjnie zdefiniowany (13 linii), jak na złożoność zjawiska jakim jest identyfikacja miRNA, cel pracy. Kolejne sekcje to: Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski końcowe. Rozprawę zamykają Suplement z informacją o prekursorach zidentyfikowanych miRNA, Spis rysunków, Spis tabel oraz Spis literatury. Do pracy nie dołączono materiałów w wersji elektronicznej. Swobodnym dopełnieniem rozprawy w wersji elektronicznej jest ogólnodostępna baza danych http://lemur.amu.edu.pl/share/apple_miRNAs/.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest zwięźle z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Dostrzegłem w pracy pewną liczbę błędów stylistycznych i edytorskich (np. linia 29 str. 16, linia 24 str. 30, linia 28/1 str. 31/32). Autorka czasem dość swobodnie/niepotrzebnie rozwija w tekście angielskie skróty np. linia 12 str. 27 (godziny po nacięciu?), linia 2 str. 34 (PCR), linia 14 str. 30 (tzw. CDS), linia 17 str. 36 (losowe startery). Niekiedy brak jest polskich określeń/opisu/rozwinęcia np. linia 11 str. 30. Niepotrzebne są także żargonowe sformułowania oraz angielskie zapożyczenia np. „reakcja DNazowania” str. 32, czy „zadnotowano” str. 18 oraz „program zwracał tylko transkrypty docelowe” str. 30. Jakość rysunków (Rys. 16, Rys. 17 str. 67) mogła by być lepsza (Co oznaczają kreskowania na słupkach? Brak informacji o tym w legendzie.). Całość rozprawy to 105 stron tekstu, 20 rysunków, 17 tabel, 212 cytowane publikacje.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pracy doktorskiej mgr Elżbiety Kai wyodrębnić można sześć zasadniczych części. Pierwszą z nich jest Wstęp, który Autorka rozpoczyna od wprowadzenia pojęcia cząsteczek miRNA i ich biogenezy oraz funkcji. Zasadnie zestawiono w formie porównania różnice

między roślinnymi a zwierzęcymi miRNA. Uwypuklono odmienności zarówno od strony strukturalnej jak i procesu biogenezy. Ten ostatni dobrze dla czytelnika ilustruje rysunek 1. W tekście Autorka przytacza także szereg przykładów procesów regulowanych przez zidentyfikowane roślinne cząsteczki miRNA (m.in. rozwój organów, odpowiedź na stres itp.).

W ogólnej natury Wstępie (zasadniczo dedykowanemu głównie miRNA) trochę zbyt dużymi, specjalistycznymi skrótami nazewnictwa małych niekodujących cząsteczek RNA (sRNA) są określenia: typu, siRNA, ta-siRNA, ml-siRNA oraz miRNA* . Wprowadzenie ich wszystkich razem, praktycznie w jednym zdaniu (linia 28/29 str. 13), bez słowa komentarza może budzić zakłopotanie. W podrozdziale poświęconym metodom identyfikacji cząsteczek miRNA praktycznym było by wyróżnić/zestawić ze sobą te eksperymentalne, służące identyfikacji nowych miRNA np. klonowanie razem z sekwencjonowaniem nowej generacji oraz te służące do śledzenia obecności/zmian poziomu ekspresji już znanych miRNA np. łańcuchową reakcję polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (ang. RT-PCR) razem z metodami hybrydyzacji. W tekście metody te, nie wiedzieć czemu, są wymieszane. W opisie metod identyfikacji, dość szczegółowym w odniesieniu do strony eksperymentalnej, ubogo wypadają metody *in silico*. Brak informacji jak *in silico* można poszukiwać/identyfikować potencjalne miRNA. W kolejnych podrozdziałach Wstępu Autorka rzeczowo odnosi się do obecnego stanu wiedzy o miRNA u jabłoni, pozycjonuje Polskę jako producenta jabłek na świecie oraz przybliża czytelnikowi znaczenie zakażeń *Erwinia amylovora* w sadownictwie.

W rozdziale Cel pracy Autorka definiuje obszar swoich zainteresowań jako podjęcie próby kompleksowej identyfikacji miRNA u jabłoni odmiany „Gala” i określenie zależnych od podkładki różnic w ich ekspresji, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA zaangażowanych w kształtowanie odporności na zarazę ogniową. Identyfikacja ta podzielona jest na dwa etapy, które różnicują miRNA odpowiednio w zależności od rodzaju podkładki lub zakażenia drzew bakterią *Erwinia amylovora*.

Kolejną część rozprawy stanowi opis Materiałów i Metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to 12 stron. W dużej mierze specyfika badań (np. analizy sekwencjonowania RNA nowej generacji) wymusza stosowanie dedykowanych rozwiązań bioinformatycznych. Ich opis jest bardzo skrótowy co wynika, być może, z komercyjnego charakteru stosowanego oprogramowania. Autorski wkład w analizy bioinformatyczne występuje w postaci skryptu zamieszczonego jako rysunek 3. W opisie metod eksperymentalnych czasem dość specyficznym rozmieszczono pewne informacje. Powoduje to konsternację w interpretacji np. rysunku 4 (str. 35). Przedstawia on przykładowe

produkty łańcuchowej reakcji polimerazy, jednak z opisu w tekście oraz legendy w tej części pracy nie wynika np. skąd taka a nie inna liczba prób. To znajduje swoje wyjaśnienie dopiero w sekcji Wyniki (str. 39 linia 23), w której znajduje się notabene wyodrębniony podrozdział (4.1.1) zatytułowany Materiał biologiczny (str. 39). Ten podrozdział razem z podrozdziałem w paragrafie 4.2.1 winny moim zdaniem znaleźć się w sekcji Materiały i Metody.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki badań. Te ostatnie podzielono na dwie wyraźne grupy dedykowane identyfikacji: (i) mikroRNA u zdrowych jabłoni utworzonych na różnych podkładkach oraz (ii) mikroRNA powiązanych z odpowiedzią na infekcję *Erwinia amylovora*. W prowadzonych badaniach istotne okazały się eksperymenty/analizy bioinformatyczne optymalizujące wybór/identyfikację miRNA z otrzymanych bibliotek poddanych sekwencjonowaniu. Identyfikację cząsteczek miRNA specyficznych dla podkładek zdrowych jabłoni przeprowadzono w oparciu o jasno przedstawiony analityczny schemat postępowania i na podstawie ogólnie przyjętych kryteriów definiujących roślinne miRNA. Rezultatem jest m.in. poznanie 252 prekursorów miRNA, z czego większość (138) stanowią cząsteczki specyficzne dla jabłoni, a wśród nich aż 78 nowych. Głębokie sekwencjonowanie pozwoliło na znalezienie także nielicznych miRNA różnicujących podkładki. Obecność dojrzałych miRNA powstających z prekursorów potwierdzano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy bądź poszukując znaczników sekwencji ulegających ekspresji (tzw. sekwencji EST ang. Expressed Sequence Tags). Wydajność tych metod jest jednak znikoma. Budzi to bardziej ogólne pytanie o niski poziom ekspresji gatunkowo specyficznych miRNA. Czym uwarunkowany może być ten fenomen? Porównując ze sobą dwie metody badań poziomu ekspresji miRNA zaproponowane w pracy chciałbym zapytać także czy poza miR227N podjęto próbę identyfikacji łańcuchową reakcją polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym wykorzystującą startery typu spinki (ang. stem-loop RT-PCR) transkryptów dla miR260N, miR285N, miR132M oraz miR200N (zidentyfikowanych wcześniej metodą klasycznej łańcuchowej reakcji polimerazy)? Jeśli nie, to dlaczego?

Trudne w interpretacji jest zestawienie przykładowych wyników głębokiego sekwencjonowania i łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym na rysunku 11. Brak na nim wartości założonego poziomu istotności statystycznej na przedstawionych wykresach, a odchylenia standardowe są tylko dla prób z głębokiego sekwencjonowania. Zastanawiam się czy testu Anova dla danej grupy prób nie można by wesprzeć testem Tukeya (Rozsądnej Istotnej Różnicy), który pokazałby różnice pomiędzy poszczególnymi podkładkami.

Bardzo ciekawe są wyniki dedykowane identyfikacji miRNA powiązanych z odpowiedzią jabłoni na infekcję bakterią *Erwinia amylovora*. Inne podejście bioinformatyczne w przypadku materiału infekowanego skutkuje poznaniem aż 330 loci miRNA (233 nowych). Podobnie jak dla miRNA u zdrowych jabłoni tylko dla nielicznych ze zidentyfikowanych (9) potwierdzono ekspresję metodą łańcuchowej reakcji polimerazy. Porównanie prób inokulowanych z kontrolnymi oraz między różnymi podkładkami pozwoliło wyodrębnić szereg (20) miRNA potencjalnie zaangażowanych w odpowiedź na zarzę ogniową. Rola tych ostatnich jest szeroko omawiana w dyskusji.

Dyskusja jest rozdziałem bardzo dobrze uzupełniającym wyniki. Zawiera refleksje o niemalże każdym aspekcie pracy. Od typowo technicznych jak np. metody identyfikacji miRNA do prób interpretacji funkcji/roli jaką mogą pełnić poszczególne miRNA w badanym materiale/procesach. Identyfikację cząsteczek miRNA specyficznych dla podkładek oraz zaangażowanych w odpowiedź jabłoni na zakażenie bakteryjne przeprowadzono różnymi metodami i brak jest wyraźnego stwierdzenia dlaczego. Intrygujące otwarcie stanowią analizy nadreprezentacji terminów ontologii genów dla prawdopodobnych transkryptów docelowych identyfikowanych miRNA. Dla zdrowych drzew rosnących na różnych podkładkach sugerują one, iż w kategoriach ontologicznych takich jak proces, funkcja molekularna czy element komórkowy dominują wśród nich składowe ważne dla mechanizmów obronnych odpowiednio: odpowiedź obronna, transportery ABC, proteasom. W jaki sposób interpretuje Pani te wyniki? Czy można pokusić się w tym przypadku o równie zgrabną hipotezę jak ta w odniesieniu do roli wybranych cząsteczek miRNA w kształtowaniu odporności na zarzę ogniową oraz odpowiedzi na zakażenie bakteryjne?

Wymienione tutaj drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na moją ocenę pracy. Stanowi ona zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autorka jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką i ugruntowaną wiedzę o tym jak identyfikować miRNA. Nie pokusiłbym się o głębsze wnioski biologiczne na podstawie uzyskanych wyników ale bez wątpienia stanowią one istotny wkład w gromadzenie wiedzy o miRNA jabłoni. Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie Magister Elżbiety Kai do dalszych etapów przewodu.

