

dr hab. Grzegorz Bartoszewski (prof. SGGW)
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
02-776 Warszawa

Warszawa, 7 sierpnia 2018r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Kostyn pt. „Manipulacja biosyntezą terpenoidów w lninie (*Linum usitatissimum* L.) metodami przejściowej transformacji”

Wprowadzenie

Lin (*Linum usitatissimum* L.) należy do gatunków roślin uprawnych, które odegrały niezwykle ważną rolę w rozwoju cywilizacyjnym człowieka. Lin towarzyszył człowiekowi już od epoki kamienia łupanego i był uprawiany przede wszystkim w celu pozyskiwania włókna. Od dawna znane były także właściwości prozdrowotne nasion i oleju lnianego. Lin był jednym z pierwszych udomowionych gatunków roślin i należał do najważniejszych roślin uprawnych już w starożytnym Egipcie. Przez wiele stuleci len był także jedną z najważniejszych roślin uprawnych w Europie. Znaczenie lnu jako rośliny uprawnej uległo zmniejszeniu gdy włókno lniane zostało zastąpione przez inne materiały włókiennicze. Obecnie w Polsce len jest uprawiany na niewielkich arealach. W ostatnich latach obserwuje się jednak wzrost zainteresowania jego uprawą, głównie ze względu na możliwości pozyskiwania cennych biosurowców na potrzeby przemysłu spożywczego, kosmetycznego i farmaceutycznego. Ze względu na swoje unikalne cechy len budzi zainteresowanie biotechnologów. W Polsce zaawansowane prace nad lnem, ukierunkowane na nadawanie nowych właściwości zarówno włóknu jak i olejowi lnianemu, prowadzone są przez zespół badawczy z Uniwersytetu Wrocławskiego. Zespół ten posiada znaczące osiągnięcia biotechnologiczne w tym obszarze. Badania Autorki wykonane pod opieką Pani dr hab. Anny Kulmy wpisują się w problematykę badawczą tego zespołu.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy ważnego i złożonego zagadnienia inżynierii metabolicznej u roślin wyższych. Inżynieria metaboliczna jest ważnym obszarem współczesnej biotechnologii i szybko rozwijającej się biologii syntetycznej. Podstawowym wyzwaniem inżynierii metabolicznej jest dobre poznanie szlaków metabolicznych i zrozumienie zależności oraz powiązań pomiędzy nimi, tak aby możliwe było stabilne regulowanie (programowanie) tych szlaków w celu uzyskiwania zaplanowanego poziomu określonych metabolitów. Do najbardziej znanych przykładów inżynierii metabolicznej roślin można zaliczyć uzyskanie ryżu akumulującego duże ilości β -karotenu w ziarniakach (złoty ryż), czy też uzyskanie goździków i róż o niebieskich kwiatach w wyniku przekonstruowania szlaku biosyntezy flawonoidów tak, że w płatkach kwiatów wytwarzana jest delfinidyna.

Autorka za swój model badawczy wybrała szlak metaboliczny terpenoidów u lnu. Szlak ten jest bardzo złożony i kluczowy dla wzrostu oraz rozwoju roślin. Budzi także duże zainteresowanie biotechnologiczne gdyż w obrębie tego szlaku syntetyzowane są ważne dla człowieka związki o walorach prozdrowotnych, m.in. karotenoidy i tokoferole. Ponadto Autorka podjęła próbę odpowiedzi na pytanie czy metody transformacji przejściowej mogą być wykorzystane do uzyskiwania zmian epigenetycznych u lnu. Jedną z nowych technik hodowli roślin budzących duże zainteresowanie w ostatnich latach jest hodowla epigenetyczna opierająca się na wykorzystywaniu naturalnych bądź indukowanych epialleli. Opracowanie wydajnych metod uzyskiwania zmian epigenetycznych determinujących ważne cechy użytkowe roślin uprawnych jest jednym z wyzwań współczesnej biotechnologii. Badania wykonane przez Autorkę uważam za celowe i w pełni uzasadnione gdyż wzbogacają one wiedzę zarówno w zakresie inżynierii metabolicznej lnu jak i nowych technik hodowlanych u tego gatunku.

Dane formalne o rozprawie

Rozprawa składa się z rozdziałów w układzie typowym dla nauk przyrodniczych, które stanowią: wstęp literaturowy (32 strony), cel pracy (1 strona), materiały i metody (14 stron), wyniki (96 stron), dyskusja (16 stron), podsumowanie i najważniejsze wnioski (1 strona) oraz spis literatury (34 strony). Rozprawę poprzedza rozbudowany spis treści oraz wykazy wykresów, tabel, rycin i skrótów. Ponadto główne rozdziały rozprawy są poprzedzone streszczeniami w języku polskim i angielskim. Spis literatury stanowi 345 pozycji i są to prace z anglojęzycznych pism naukowych, z wyjątkiem 2 pozycji polskojęzycznych. W rozprawie zamieszczono 78 wykresów, 9 tabel i 7 rycin. Ponadto na końcu rozprawy zamieszczono materiały uzupełniające, zawierające sekwencje kodujące badanych genów ze wskazaniem miejsc przyłączania się syntetycznych antysensownych oligodeoksynukleotydów zaprojektowanych i badanych w ramach tej pracy.

Ocena rozprawy

Część doświadczalną pracy poprzedza rozbudowany i wielowątkowy wstęp literaturowy. We wstępie tym Autorka przedstawiła ważne informacje dotyczące znaczenia gospodarczego lnu i najważniejszych metod ulepszania roślin oraz omówiła właściwości i biosyntezę terpenoidów. Podrozdziały wstępu literaturowego dotyczące metody wyciszania przejściowego za pomocą antysensownych oligodeoksynukleotydów i biosyntezy terpenoidów uważam za szczególnie interesujące i cenne. Autorka wykazała się dużą znajomością najnowszej literatury, którą potrafiła przedstawić w sposób przemyślany i syntetyczny. Najważniejsze gałęzie szlaku biosyntezy terpenoidów zostały zilustrowane przejrzystymi schematami co umożliwia czytelnikowi dobre zrozumienie uzyskanych wyników. W podrozdziałach dotyczących uzyskiwania roślin genetycznie modyfikowanych doszukałem się drobnych nieścisłości. Przykładowo, za myłące uważam stwierdzenie o uprawie odmian genetycznie modyfikowanych buraka ćwikłowego w USA (str. 34) – z tego co mi wiadomo do uprawy wprowadzono tam odmiany genetycznie modyfikowane ale buraka cukrowego.

Głównym celem badań Autorki było poznanie możliwości manipulacji poziomem ekspresji genów szlaku terpenoidowego w lnie z wykorzystaniem dwóch technik wyciszania przejściowego genów. Autorka zrealizowała ten cel wykonując szereg zadań szczegółowych, obejmujących między innymi: (1) optymalizację i określenie efektywności dwóch metod wyciszania przejściowego genów u lnu, (2) uzyskanie roślin z wyciszeniami i ocenę poziomu oraz stabilności wyciszenia kluczowych genów szlaku biosyntezy terpenoidów, (3) profilowanie transkryptomyczne i metabolomiczne roślin z wyciszonymi poszczególnymi genami strukturalnymi, (4) zbadanie poziomu metylacji i ekspresji genów zaangażowanych w regulację epigenetyczną, a także potencjału antyoksydacyjnego u roślin z wyciszeniami. Dodatkowym aspektem badań było profilowanie transkryptomiczne i metabolomiczne szlaku biosyntezy terpenoidów oraz ogólnego poziomu metylacji i potencjału antyoksydacyjnego wykonane dla wybranych odmian i linii transgeniczných lnu rosnących w polu. Przedstawiony cel badań uważam za bardzo ambitny, a zaplanowane badania za wielowątkowe i kompleksowe. Aby osiągnąć wyznaczony cel Autorka wykorzystwała szereg zaawansowanych metod badawczych inżynierii genetycznej, genetyki molekularnej, czy też najnowszych metod analitycznych.

W swoich badaniach Autorka zastosowała dwie metody wyciszania przejściowego głównych genów związanych z metabolizmem terpenoidów. Pierwszą metodą była metoda biolistyczna zaś druga opierała się o syntetyczne antysensowne oligodeoksynukleotydy (ODN-y). Metody przejściowego wyciszania genów umożliwiają obniżenie ekspresji genu docelowego, bez wbudowywania się transgeny na stałe w genomie biorcy, co umożliwia szybkie zbadanie efektów wyciszenia. Metody te są niezwykle przydatne u gatunków roślin, dla których nie są dostępne mutanty lub szybkie procedury transgenezy, a do takich właśnie gatunków należy len. Metody wyciszania przejściowego pozwalają na szybkie wykonanie analiz funkcjonalnych jednakże cechują się małą stabilnością, co prowadzi w konsekwencji do uzyskiwania dużego rozrzutu wyników, czego doświadczyła Autorka pracy analizując statystycznie swoje wyniki. Wybór tych metod dla lnu uważam za uzasadniony, tym bardziej, że Autorkę interesowało także sprawdzenie czy metody te mogą być stosowane do uzyskiwania ulepszonych linii lnu nie będących GMO.

W przypadku metody biolistycznej Autorka wykorzystwała konstrukcje antysensowne dla 16 genów szlaku biosyntezy terpenoidów. Ekspresja fragmentów antysensownych była regulowana przez promotor 35SCaMV, który jest powszechnie stosowanym promotorem konstytutywnym. Wybór tego promotora uważam za w pełni uzasadniony. Konstrukcje wyciszające wklonowano do plazmidu binarnego pBinAR. Miałbym prośbę do Autorki, aby wyjaśniła jakie przesłanki/kryteria były związane z wyborem plazmidu i dlaczego właśnie ten plazmid został wykorzystany do sporządzania konstrukcji antysensownych. W przypadku drugiej metody ODN-ów, która jest stosunkowo rzadko stosowana u roślin, do każdego z 17 genów docelowych zaprojektowano po 2-3 syntetyczne antysensowne oligodeoksynukleotydy (ODN-y). Oligonukleotydy te różniły się strukturą drugorzędową. Ponadto Autorka przetestowała serię ODN-ów o zwiększonej stabilności posiadających grupę tiofosforanową (ODN PTO). Należy podkreślić, że zaprojektowanie konstrukcji wyciszających było możliwe

dzięki wcześniejszemu poznaniu genów szlaku biosyntezy terpenoidów przez zespół badawczy, w którym Autorka realizowała pracę doktorską.

Do transformacji przejściowej Autorka wykorzystała 3-4 tygodniowe rośliny lnu odmiany 'Linola' uprawiane w warunkach *in vitro*. W eksperymentach wstępnych zoptymalizowała metodykę transformacji przejściowej, dobierając m.in. punkty czasowe pobierania tkanki do profilowania transkryptomocno-metabolicznego i badania metylacji oraz potencjału antyoksydacyjnego, a także metodykę stosowania ODN-ów dobierając ich stężenie. Udało się wykonać transformację przejściową i uzyskanie roślin z wyciszeniami oraz potwierdzenie poziomu wyciszenia genów docelowych wymagało niewątpliwie dużego wysiłku ze strony Doktorantki i było kluczowym etapem badań.

Autorka uzyskała rośliny z wyciszeniami dla większości badanych genów, przy czym metoda biolistyczna była bardziej skuteczna. Wyciszenie na poziomie transkryptomocnym określiła z wykorzystaniem standardowej metody Real Time PCR, a efekty na poziomie metabolicznym z wykorzystaniem ultrasprawnego chromatografu cieczowego z detektorem PDA (UPLC). Analiza roślin z 7 genami wyciszonymi za pomocą dwóch różnych metod wyciszenia umożliwiła ich porównanie. Autorka obserwowała różne poziomy wyciszenia genów w zależności od zastosowanej metody i genu docelowanego. Dla niektórych genów bardziej efektywna była metoda biolistyczna (np. dla genów kodujących izomerazę pirofosforanu izopentenylu *IDI*, syntazę fitoenu *PSY*, fitylotransferazę homogentyzynianową *VTE2* i metylotransferazę fitylobenzochinolu *VTE3*), dla innych genów metoda ODN-ów (np. dla genów kodujących desaturazę zeta-karotenu *ZDS*, izomerazę prolikopenu *CRTISO*, cyklazę tokoferolu *VTE1*), czasami wyniki wyciszenia były podobne dla obydwu metod (np. dla genu kodującego syntazę farnesylu *FDS*), a dla niektórych genów wyciszenia nie uzyskano. Szkoda, że Autorka nie przedstawiła tych wyników w postaci zbiorczej tabeli porównawczej sumującej uzyskane efekty wyciszenia.

Dopełnieniem tych analiz była próba powiązania właściwości strukturalnych ODN-ów ze skutecznością wyciszania genów docelowych. Znalezienie takich relacji byłoby bardzo wartościowe i pozwoliłoby na skuteczne projektowanie wyciszających ODN-ów. Autorka nie stwierdziła jednak bezpośrednich zależności pomiędzy cechami strukturalnymi ODN-ów i efektywnością wyciszania. Niemniej zaobserwowała, że w przypadku ODN-ów, które potencjalnie tworzą struktury drugorzędowe, znacznie częściej otrzymywano wysoki poziom wyciszenia genu docelowego.

W kolejnym etapie badań Autorka wytypowała rośliny z potwierdzonym wyciszeniem genów szlaku biosyntezy terpenoidów i wykonała dla nich analizy transkryptomocne, metaboliczne i epigenetyczne oraz ocenę potencjału antyoksydacyjnego. Umożliwiło to wskazanie kluczowych genów szlaku biosyntezy terpenoidów u lnu i zidentyfikowanie nowych zależności w obrębie tego szlaku, spośród których najważniejsze jest powiązanie wzrostu poziomu α -tokoferolu z obniżoną ekspresją głównych genów szlaku biosyntezy karotenoidów. Uzyskane wyniki sugerują przepływ jednostek budulcowych pomiędzy szlakami biosyntezy karotenoidów i tokoferoli w lnie. Autorka obserwowała także różnice w ogólnej metylacji i profilu ekspresji genów związanych z regulacją epigenetyczną u roślin z

wyciszeniami. Wskazanie nowych powiązań pomiędzy poziomem metabolitów i poziomem ekspresji głównych genów szlaku biosyntezy terpenoidów może mieć w przyszłości zastosowania biotechnologiczne.

Ważnym etapem pracy było określenie stabilności uzyskanych wyciszeń dla najbardziej efektywnych ODN-ów. Autorka obserwowała zmiany w poziomie wyciszenia genów docelowych 14 tygodni po inkubacji z ODN-ami, a w pewnych przypadkach nawet 12 miesięcy po traktowaniu ODN-ami. Trzeba zaznaczyć, że wyniki te uzyskano dla warunków *in vitro*. Szkoda, że Autorce nie udało się poszerzyć przeprowadzonych badań o potomstwo badanych roślin co pozwoliłoby na stwierdzenie czy opisane zmiany w profilach transkryptomczno-metabolicznym i ogólnej metylacji są dziedziczne. Ważną konkluzją przedstawioną przez Autorkę jest wskazanie, że metoda ODN-ów może być przydatna na potrzeby hodowli epigenetycznej jednakże wymaga to dalszych badań.

Analizy korelacji wykonane dla poziomu ekspresji badanych genów pozwoliły na zdefiniowanie hipotetycznych kompleksów multienzymatycznych, które mogą tworzyć enzymy zaangażowane w biosyntezę karotenoidów. Zaproponowane przez Autorkę kompleksy multienzymatyczne charakteryzują się innym składem w porównaniu z wcześniej postulowanymi, jednakże jak zaznacza Autorka w dyskusji potrzebne są dalsze prace, aby potwierdzić ich funkcjonowanie.

Wyniki uzyskane przez Autorkę są oryginalne i wzbogacają dotychczasową wiedzę dotyczącą funkcjonowania szlaku biosyntezy terpenoidów i stosowania nowych metod hodowlanych u lnu. Autorka umiejętnie przedstawiła uzyskane wyniki i przedyskutowała je w interesujący i krytyczny sposób przedstawiając ciekawe tezy, które mogą ukierunkować dalsze badania nad opracowaniem skutecznych strategii modyfikowania szlaku biosyntezy terpenoidów u lnu, prowadzące do uzyskania linii charakteryzujących się wytwarzaniem pożądaných metabolitów z tej grupy. Rozprawa jest napisana starannie i właściwie zredagowana pod względem edytorskim. Zamieszczone liczne wykresy dobrze ilustrują uzyskane wyniki. Pewnym utrudnieniem podczas czytania pracy są drobne niedociągnięcia językowe: stylistyczne, gramatyczne, czy też używanie niewłaściwych terminów, skrótów myślowych i żargonu laboratoryjnego, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Uwagi do pracy

- (1) Stwierdzenie wynikające z analiz bioinformatycznych ODN-ów, że ODN-y, które wykazują podobieństwo sekwencyjne 72-98% do genu docelowego *PSY* powodują wyciszenie wszystkich izoform tego genu nie do końca mnie przekonuje. Czy podobieństwo na poziomie 72% jest wystarczające do wyciszenia genu docelowego? Czy można to wykazać metodami bioinformatycznymi?
- (2) W moim odczuciu przedstawione najważniejsze wnioski mogłyby być lepiej zredagowane, przykładowo ostatni wniosek dotyczący kompleksów enzymatycznych jest trudny w zrozumieniu, szczególnie część dotycząca modyfikacji trzeciego kompleksu.

- (3) Uważam, że Autorka nie zawsze właściwie wykorzystuje określenie „sekwencja DNA”. Sekwencja zasad jest jedynie cechą DNA. Przykładowo w wektorze do transformacji umieszczany jest fragment DNA o określonej sekwencji, a nie sekwencja DNA jak pisze Autorka (str. 75), podobnie białko VirE2 chroni T-DNA a nie sekwencję T-DNA (str. 37), mikronośniki w metodzie biolistycznej są opłaszczane DNA a nie sekwencjami DNA (str. 39).
- (4) Użycie określenia „stworzenie” w odniesieniu do roślin z przejściowym wyciszeniem genów (str. 75) w moim odczuciu nie jest do końca poprawne. Termin „stworzenie” kojarzy się raczej z aktem stwórczym *de novo*. W kontekście uzyskania roślin z przejściowym wyciszeniem genów zastosowałbym raczej określenie bardziej technologiczne, np. uzyskanie, skonstruowanie lub podobne.
- (5) W kilku miejscach Autorka nie stosuje poprawnej terminologii polskojęzycznej, na przykład pisząc o kukurydzy odpornej na insekty (str. 34 wiersz 25) - bardziej poprawne byłoby pisanie o kukurydzy odpornej na szkodniki lub bardziej precyzyjnie o kukurydzy odpornej na omacnicę prosowiankę, która jest jednym z kilku szkodników kukurydzy.
- (6) W pracy począwszy od metodyki (str. 66) Autorka stosuje określenie „roztwór cukru” w odniesieniu do roztworu, w którym zawieszano antysensowne oligodeoksynukleotydy nie precyzując o jaki związek chemiczny chodzi i nie podając źródła pochodzenia tego związku. Cukier ten powinien być lepiej zdefiniowany.
- (7) Sporadycznie w tekście pracy Autorka niewłaściwie odwołuje się do źródeł literaturowych podając niepotrzebnie obok nazwiska autora jego imię lub inicjały (np. str. 44 wiersz 14, str. 47 wiersz 26).
- (8) W spisie literatury występują niespójności związane ze sposobem cytowania artykułów Autorka stosuje różne style cytowania, przykładowo: czasami podane są pełne tytuły pism, a innym razem skróty, czasami w tytułach prac są stosowane duże litery a innym razem małe, nazwy łacińskie powinny być zapisane kursywą a najczęściej nie są. Styl cytowania artykułów powinien być jednolity dla całego spisu literatury.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kostyn dotyczy trudnej i kompleksowej problematyki badawczej jaką jest zrozumienie mechanizmów regulacji metabolizmu terpenoidów u roślin oraz wskazanie metod sterowania tym szlakiem na potrzeby ulepszania lnu. Prace badawcze zostały przeprowadzone z wykorzystaniem szerokiego spektrum metod badawczych, a uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią wartościowe podłoże do dalszych prac nad ulepszaniem lnu. Autorka rozprawy opanowała liczne techniki badawcze obejmujące metody inżynierii genetycznej, kultur tkankowych roślin, profilowania transkryptomycznego i metabolicznego. W realizację swej pracy doktorskiej Autorka włożyła ogrom pracy pokazując, że potrafi rozwiązywać problemy badawcze i umiejętnie analizować uzyskane wyniki badań. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe elementy stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu

Wrocławskiego o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Grzegorz Bartoszewski (prof. SGGW)