

Dr hab. Magdalena Wróbel-Kwiatkowska

Wrocław, 2.08.2018

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Nauk o Żywności

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Kostyn pt. „Manipulacja biosyntezą terpenoidów w lnie (*Linum usitatissimum* L.) metodami przejściowej transformacji”, wykonanej w Zakładzie Genetyki Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego

Promotor: dr hab. Anna Kulma (z Zakładu Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego)

Praca doktorska Pani mgr Anny Kostyn wpisuje się w tematykę z zakresu biotechnologii roślin i dotyczy manipulacji ekspresją genów, kodujących kluczowe enzymy ze szlaku biosyntezy terpenoidów w lnie. Terpenoidy to zróżnicowana grupa związków o podstawowym znaczeniu dla fizjologii i metabolizmu roślin, stanowią one barwniki fotosyntetycznie czynne (np. karotenoidy), składniki błon komórkowych (sterole), hormony roślinne (np. kwas abscysynowy). Związki te posiadają również duże znaczenie dla człowieka, gdyż wykorzystywane są jako substancje zapachowe (np. pinen, limonen), insektycydy (pyretryny), leki (paklitaksel, znany pod nazwą handlową Taksol) oraz w produkcji polimerów np. gumy (kauczuk).

W pracy wykorzystano dwie metody w celu przeprowadzenia przejściowego wyciszenia genów związanych z biosyntezą terpenoidów, tj. metodę biolistyczną i antysensownych oligodeoksynukleotydów (ODN). Tematyka podjęta w pracy jest bardzo aktualna i wpisuje się z jednej strony w nurt badań, dotyczących poszukiwania nowych metod modyfikacji roślin, które nie powodują zmian w genomie, a co się z tym wiąże rośliny wytworzone wskutek

zastosowania tych technik nie są traktowane jako genetycznie modyfikowane, a z drugiej strony dotyczy ona manipulacji biosyntezą ważnych dla człowieka związków. Podkreślić należy kolejny aspekt naukowy tych badań realizowany przez zbadanie szlaków metabolicznych związanych z syntezą terpenoidów w lnie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest bardzo obszernym opracowaniem, liczącym 231 stron wydruku komputerowego (wraz z bibliografią i materiałami uzupełniającymi). Układ pracy jest typowy dla prac doktorskich. Rozprawę rozpoczyna Streszczenie w języku polskim i angielskim. Wstęp (liczący 32 strony) wprowadza w tematykę rozprawy i dotyczy przedmiotu badań Doktorantki czyli lnu, jego właściwości i zastosowań. Następnie Doktorantka charakteryzuje terpenoidy, ich właściwości i szlaki biosyntezy oraz różne metody transformacji roślin, ze szczególnym uwzględnieniem metod stosowanych w pracy. Jako cel Doktorantka postawiła sobie zbadanie możliwości manipulacji poziomem ekspresji genów kodujących enzymy ze szlaku terpenoidowego w lnie z wykorzystaniem dwóch technik: tj. biolistycznej oraz metody z wykorzystaniem antysensownych oligodeoksynukleotydów. Autorka sformułowała 6 celów szczegółowych, które następnie realizowała w trakcie badań.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka opisała materiał roślinny, odczynniki i zastosowaną w pracy metodykę. W rozdziale tym według mojej oceny zabrakło kompletnego odnośnika do opisywanej przez Autorkę bazy sekwencji genów lnianych szlaku terpenoidowego, która jak podaje Doktorantka została wcześniej opublikowana przez A. Bobę wraz ze współpracownikami. W rozdziale tym nie ma również pełnej informacji na temat użytych w pracy roślin transgenicznnych lnu różnych linii, wytworzonych wcześniej w Zakładzie Biochemii Genetycznej Uniwersytetu Wrocławskiego. Wydaje się, że celowe byłoby napisanie w tym miejscu, które pokolenia roślin wybranych linii transgenicznnych były badane, z jakich odmian zostały one wyprowadzone i jakie odmiany roślin kontrolnych użyto w pracy. Ponieważ odnośnie metody wyciszenia poziomu ekspresji genów z użyciem techniki ODNów w pracy podano tylko, iż „Antysensowne oligodeoksynukleotydy (ODNy) rozpuszczono w 100 mM roztworze cukru”, należałoby uściślić w roztworze jakiego cukru rozpuszczono antysensowne oligodeoksynukleotydy użyte do transformacji.

W rozdziale Wyniki, Doktorantka dokonuje analizy wytworzonych roślin na poziomie ekspresji genów związanych z biosyntezą terpenoidów oraz zmian w profilu metabolicznym. Opisuje również towarzyszące przeprowadzonym transformacjom zmiany w poziomie metylacji genomu i zmiany potencjału antyoksydacyjnego. Następnie Doktorantka zbadala poziom ekspresji genów związanych z biosyntezą terpenoidów i samych metabolitów w różnych liniach

transgenicznych lnu. Otrzymane dane wykorzystano do sporządzenia macierzy korelacji i wysunęła wniosek o istnieniu kompleksów multi-enzymatycznych w szlaku terpenoidowym w lnie. Wykazała również, iż izomeraza pirofosforanu izopentenylu (IDI) jest kluczowym enzymem dla funkcjonowania szlaku mewalonowego (MVA) i niemewalonowego tzw. szlaku fosforanu metylerytritolu (MEP) oraz dowiodła istnienia przepływu metabolitów między szlakiem biosyntezy karotenoidów i tokoferoli w lnie.

W prezentowanych wynikach zabrakło kilku ważnych konkluzji:

- jak Doktorantka zinterpretuje fakt, iż w przypadku niektórych genów tj. syntazy i reduktazy 3-hydroksy-metylo-glutarylo-CoA (*HMGS*, *HMGR*) oraz syntazy 5-fosforanu 1-deoksy-ksylulozy (*DXS*), syntazy pirofosforanu geranylu (*GDS*), syntazy skwalenu (*SQS*), desaturazy fitoenu (*PDS*), β -cyklazy likopenu (*LCYB*) oraz cyklazy tokoferolu (*VTE1*) nie udało się obniżyć ekspresji metodą mikrowstrzeliwania? Czy badana próba nie była zbyt mała? I jaką formę miał stosowany do transformacji konstrukt?
- jestem też ciekawa komentarza Doktorantki na temat tego, że nie wyciszono genów kodujących kluczowe enzymy ze szlaku mewalonowego (*HMGS*, *HMGR*) z wykorzystaniem alternatywnej techniki z antysensownymi oligodeoskynukleotydami, jak również kilku innych genów w tym m.in. *GDS* i *SQS*.
- czy rośliny uzyskane po transformacji dwiema wybranymi metodami wykazywały jakieś zmiany fenotypowe w stosunku do roślin kontrolnych?
- czy wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały opublikowane lub są w trakcie publikacji, a jeśli nie czy planuje ona opublikować te wyniki?

Mimo powyższych uwag, należy uznać, iż uzyskane wyniki Doktorantka opisała w sposób jasny, rzeczowy i bardzo staranny.

Podkreślić trzeba fakt, iż w pracy przedstawiono aż 78 wykresów ilustrujących wyniki, otrzymane przez Doktorantkę, ponadto zaprezentowano 9 tabel i 7 rycin.

Pracę zamyka Dyskusja, licząca 16 stron oraz Podsumowanie i najważniejsze wnioski, wysunięte przez Doktorantkę na podstawie przeprowadzonych badań.

Rozprawa jest napisana w sposób przejrzysty i zwarty. W tak obszernej pracy nie udało się jednak Doktorantce uniknąć kilku błędów językowych i literowych np. „arecheony”, „kompleksy muli-enzymatyczne”, „heterochormatna”, „agrobakterie”, sformułowanie

„komercyjnie atrakcyjne” czy stwierdzenie, że większość genów „była regulowana w dół” etc., błędy te jednak w żaden sposób nie umniejszają ogólnej bardzo wysokiej oceny pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa świadczy o ogromnej wiedzy posiadanej przez Doktorantkę w zakresie biologii molekularnej oraz metabolizmu roślin, a także umiejętności formułowania wniosków i ich interpretowania. Za największe osiągnięcie Doktorantki uważam, wykazanie długotrwałego wpływu zastosowanej techniki ODN na profil genetyczny i metaboliczny, modyfikowanych tą techniką roślin. Dowiodła ona m.in., iż wyciszeniu ekspresji genu *ZDS* (desaturazy ζ -karotenu) oraz *CRTISO* (izomerazy prolikopenu) towarzyszył obniżony poziom β -karotenu w roślinach po 24 i 48 godzinach od transformacji, natomiast po 14 tygodniach obserwowano zwiększony poziom β -karotenu, a w przypadku manipulacji genem *CRTISO* obniżony poziom luteiny, wiolaksantyny i neoksantyny. Doktorantka wykazała również, iż poziom ekspresji wyciszanych genów po 12 miesiącach od czasu inkubacji z ODNami, był o około 14% niższy w przypadku genu *ZDS*, w porównaniu do kontroli. W przypadku genu *CRTISO* nie obserwowano obniżenia zawartości transkryptu, a dla genu *VTE1* odnotowano wzrost w ekspresji genu rzędu 15% lub 89%, w zależności od struktury stosowanych ODNów. Doktorantka obserwowała również długotrwale utrzymujące się zmiany w poziomie metabolitów terpenoidowych, co jak sugerowała może być skutkiem zmian epigenetycznych w genomie tych roślin. Wyniki te potwierdzają więc, że jest to technika transformacji przejściowej, wymagająca, z całą pewnością, dalszych badań. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią ważny wkład w poznanie tej metody i możliwości jej aplikacji w modyfikacji roślin.

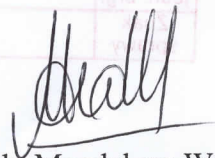
Recenzowana rozprawa doktorska posiada ogromną wartość poznawczą oraz aplikacyjną, zwłaszcza w zakresie poszukiwania nowych, alternatywnych metod transformacji roślin.

Podsumowanie

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Kostyn zatytułowana „Manipulacja biosyntezą terpenoidów w lnieniu (*Linum usitatissimum* L.) metodami przejściowej transformacji” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Kostyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę ogromny wkład pracy Doktorantki oraz znaczenie naukowe uzyskanych wyników wnoszę do Wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie przedmiotowej dysertacji.



dr hab. Magdalena Wróbel-Kwiatkowska