

Radzików, 14.03.2019.

Recenzent:

Prof. dr hab. Wacław Orczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Radzików, 05-870 Błonie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Działo pt. „Opracowanie strategii genetycznej i epigenetycznej modulacji aktywności genu syntazy chalkonu w lnieniu” wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Magdaleny Żuk

Wprowadzenie

Historia cech, których dziedziczenie nie podlega prawom Mendla jest prawie tak długa jak sama genetyka mendlowska. Termin epigenetyka był używany od połowy XX wieku, ale obecna definicja i współczesne rozumienie zostało doprecyzowane dopiero na przełomie XX i XXI wieku. Zgodnie z nią, epigenetyka jest nauką o zmianach dziedzicznych, które są warunkowane zmianami innymi niż zmiana sekwencji DNA. Tak sformułowana definicja jest bardzo pojemna i na pewno będzie uwzględniała nieodkryte jeszcze rodzaje zmian molekularnych warunkujących dziedziczenie niemendlowskie. Rosnące zainteresowanie tą dziedziną przekłada się na bardzo dużą liczbę publikacji w szczególności dotyczących epigenetyki człowieka.

Z wielu wyróżników tej dziedziny najważniejsze jest to, że związek przyczynowo skutkowy zmiany epigenetycznej i określonej cechy fenotypowej wymaga w każdym przypadku szczegółowej analizy molekularnej. Bez takiej wiedzy zmiana epigenetyczna może być uważana za najwyżej marker danej cechy. Nawet w odniesieniu do dobrze opisanej i najprostszej ze zmian epigenetycznych tj. metylacji cytozyny nie możemy przewidzieć czy i w jakim zakresie zmiana ta będzie oddziaływała na ekspresję określonego genu a w dalszej kolejności na fenotyp.

Opis i recenzja dysertacji

Strukturę dysertacji, liczącej 147 stron, charakteryzuje podział na *Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Literaturę*. Dodatkowo Autorka wykonała *Wykaz skrótów i symboli oraz Spis rycin, tabel i wykresów*.

W kolejnych podrozdziałach *Wstępu* Doktorantka opisała wszystkie zagadnienia bezpośrednio związane z dysertacją. Autorka zaczęła wstęp od opisu gatunku rośliny wybranego jako obiekt badań. Zebrała wiedzę z dziedzin bezpośrednio związanych z dysertacją. Było to indukowanie zmian epigenetycznych, rola niekodujących RNA, procesów RNAi i RNAa, metylacji DNA, zmian struktury chromatyny, wszystko w kontekście dziedziczenia epigenetycznego. W kolejnej części Doktorantka przybliżyła strategię wykorzystania oligonukleotydów do generowania zmian w roślinach.

Prosiłbym Doktorantkę o wymienienie rodzajów zmian, które mogą być indukowane w roślinach traktowanych zawiesiną oligonukleotydów. Czy znane są przykłady komercjalizacji roślin uzyskanych przy wykorzystaniu tej strategii?

Dobrze napisane są podrozdziały na temat syntazy chalkonu, genów kodujących ten enzym oraz jego roli w reakcji na stres. Informatywny jest opis szlaku fenylopropanoidowego, grupy związków flawonoidowych, ich roli w procesach biologicznych i ich właściwości prozdrowotnych. W tym zestawieniu podrozdział 1.3 poświęcony transgenezie jest bardziej niż niepełny. Rośliny transgeniczne to znacznie więcej niż złoty ryż, transgeniczna papaja, szczepionki i bioplastiki. Podrozdział dotyczący sprzeciwu wobec GMO jest 2 x dłuższy. W jednym, i drugim przypadku cytowane są 3 główne źródła Key i in 2008. *Journal of the Royal Society of Medicine*, de Santis i in., 2018 *Food and Chemical Toxicology*, Kamthan, i in., 2016 *Theor Appl Genet*. W pierwszym akapicie rozdziału 1.3.2 Autorka napisała, że komórki genetycznie zmodyfikowane można uzyskać poprzez „*embryo rescue*”, selekcję komórek, fuzję protoplastów czy zmienność somaklonalną.

Czy rzeczywiście użycie tych technik prowadzi do genetycznej modyfikacji?

Z ogólnych uwag dotyczących Wstępu wskazałbym na jedno – w wielu miejscach istotne stwierdzenia ogólne nie zostały poparte cytowaniem źródłowym, zbyt często jest to cytowanie jednej i tej samej pracy.

Cel pracy został opisany w oddzielnym rozdziale. W przyszłości, sugerowałbym redagowanie celów pracy tak, żeby kolejne zdania, najlepiej krótkie i oznajmujące, odnosiły się do zadań zaplanowanych i realizowanych. Np. czy głównym celem prezentowanych badań może być „modulacja ekspresji genu (...) na wzór zmian (...) uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej” (str. 60)? Głównym celem jest raczej sprawdzenie czy uzyskane, przy użyciu odpowiednich metod, rośliny lnu będą charakteryzowały się wzorem ekspresji *CHS* podobnym do założonego, oraz czy zmiany te będą dziedziczone w kolejnych pokoleniach. Zdaniem Doktorantki, pozytywny wynik takiej weryfikacji pozwoliłby uznać strategię ODN za potencjalną alternatywę transformacji genetycznej.

Materiałem badawczym były rośliny lnu wybranych odmian oraz linie transgeniczne tego gatunku z transgenem z cDNA genu *Petunia hybrida* kodującego syntazę chalkonu *CHS*. Zaprojektowano i użyto 11 cząsteczek oligonukleotydów o długości od 16 do 21nt w tym 3 cząsteczki zostały zmodyfikowane chemicznie w celu podniesienia ich stabilności i przedłużenia czasu półtrwania w komórkach. Autorka charakteryzując oligonukleotydy pisze, że są one „homologiczne” do określonych regionów genu *CHS*. Termin homologia, homologiczne odnosi się do genów lub białek o podobnej sekwencji nukleotydów lub aminokwasów. Cząsteczki jednoniciowego DNA, jakim są oligonukleotydy mogą być komplementarne (a nie homologiczne) do nici wiodącej (*forward*) lub opóźnionej (*reverse*) określonego genu, w tym przypadku *LuCHS* (str. 66). Dopiero taki opis pozwoliłby jednoznacznie wskazać na relację określonego oligonukleotydu z genem docelowym. Sekwencje nukleotydowe oligo zostały przez Doktorantkę dobrane tak, aby ich struktura drugorzędowa oraz energia wiązań z komplementarną nicią DNA były optymalne.

Prosiłbym o wyjaśnienie, dlaczego Doktorantka opisując oligo najpierw wskazuje na homologię do docelowego genu (czyli do DNA) a następnie analizuje energię wiązania tego oligo z „docelową cząsteczką RNA” (str. 77)?

Czy zakłada, że mechanizm działania oligo jest efektem tworzenia heterodupleksu DNA:RNA?

W roślinach lnu traktowanych określonymi cząsteczkami oligo obserwowano zmiany ekspresji genów *CHS6* i *CHS7*. Szczegółowa analiza ilościowa 24 godziny po traktowaniu (gpt) wykazała różny, dla 3 wybranych oligo, efekt zmian ekspresji (rys. 3 str.81). Sugerowałbym nie używać terminu „geny izoform CHS”. Obserwowano zmiany ekspresji genów paralogów *LuCHS6* i *LuCHS7*.

Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie terminów homolog, ortolog i paralog oraz izoforma.

Efekt traktowania roślin zawieszoną oligo były zmiany ekspresji *LuCHS6* i *LuCHS7* obserwowane 24 gpt oraz zmiany poziomu 5-metylocytosyny obserwowane 48 gpt. Interesująca jest zgodność kierunku zmian poziomu 5-metylocytosyny po traktowanych wybranymi oligo ze zmianami ekspresji. W porównaniu z kontrolą w roślinach traktowanych **oligo1** i **oligo11** obserwowano wyższy poziom 5-metylocytosyny i niższą ekspresję (rys. 1B, 2 i 4). Natomiast użycie **oligo6** wywoływało skutek przeciwny tj. niższy niż w kontroli poziom metylacji cytosyny i wyższą ekspresję (rys. 1A, 2 i 4). W dalszej części szczegółowo badano metylację cytosyny w motywach CCGG w wybranych kombinacjach eksperymentalnych tj. rodzaju oligo, lokalizacji regiony CCGG oraz czasu po traktowaniu. Zmiany obserwowano już 3 gpt, ale najsilniejsze były 24 i 48 gpt i ten ostatni czas był wybrany do pozostałych analiz.

Jedna uwaga na temat wyboru czasów próbkowania w tym doświadczeniu. Zmiany epigenetyczne, w tym metylacja cytosyny, skutkują zmianami ekspresji genów a nie odwrotnie. Tak, więc czas pomiaru ekspresji (24 gpt) nie powinien poprzedzać czasu analizy metylacji (48 gpt). Również czytelność opisu wyników byłaby lepsza, gdyby najpierw przedstawiono wyniki zmian epigenetycznych a po nich zmiany ekspresji. Kolejność w dysertacji jest najprawdopodobniej kolejnością chronologiczną wykonywania doświadczeń.

Po traktowaniu wybranymi cząsteczkami oligo obserwowano duże istotne statystycznie zmiany metylacji motywów CCGG w badanych genach *LuCHS6* i *LuCHS7*. W roślinach tych obserwowano również zmiany ekspresji genów uczestniczących w procesach epigenetycznych. Jakkolwiek na podstawie tych analiz trudno wnioskować o kierunku określonych zmian epigenetycznych to wyraźnie widać, że obecność obcego DNA w komórce powoduje aktywację procesów związanych z metylacją DNA i zmianą struktury chromatyny.

Wprowadzone modyfikacje chemiczne cząsteczek oligo skutkowały zmianami regulacji genu docelowego. Jest to bardzo interesująca obserwacja i warto byłoby w dalszych badaniach sprawdzić związek efektu biologicznego z określonym rodzajem modyfikacji. W odniesieniu do tej analizy (rys. 8) wyniki należałoby porównać z kontrolą tj. roślinami traktowanymi oligo niemodyfikowanymi a nie kontrolą w ogóle nietraktowaną oligo. Zmienną w tym doświadczeniu była modyfikacja cząsteczki oligo a nie samo traktowanie roślin. Analiza statystyczna wyników powinna być zrobiona dla tak wybranej kontroli.

Wyniki dalszych eksperymentów potwierdziły, że modyfikacje chemiczne cząsteczek oligo powodują utrzymanie efektu zmian metylacji motywów CCGG w roślinach 10 dni po traktowaniu oligo. Analiza roślin pokolenia generatywnego F1 wykazała, że zmiany ekspresji genu *CHS* były utrzymane po jednym cyklu rozmnażania generatywnego. Bardzo interesujące są dane wskazujące, że zmiany generowane przez **oligo11** były dziedziczone w 86% roślin F1. Zmiany wywołane przez **oligo11** z modyfikacją PTO były dziedziczone w 100% jednak tutaj analizowano tylko 2 rośliny F1.

Dalsze badania potwierdziły stabilność wcześniej opisanych zmian w roślinach uprawianych w warunkach polowych. W pokoleniu F2 indukcja ekspresji *CHS*, pierwotnie indukowanej przez **oligo11** była obserwowana w 75 % roślin F2. Mimo iż zmiany indukowane przez pozostałe oligo były dziedziczone w znacznie mniejszym stopniu lub nie były dziedziczone to ten pojedynczy przypadek **oligo11** wskazuje, że technologia oligo jest skuteczną metodą generowania zmian epigenetycznych. Moja opinia w tym względzie jest znacznie bardziej stonowana niż opinia Doktorantki wyrażona w p. 7, 8 i 9 podsumowania. Analizy metabolomiczne wykazały zmiany zawartości związków fenolowych związanych i niezwiązanych ze ścianą komórkową w roślinach traktowanych oligo i, podobnie jak to opisano wcześniej dla zmian ekspresji, profile tych zmian były różne dla różnych oligo. Najważniejszy wniosek to potwierdzenie skuteczności tego podejścia eksperymentalnego. W kolejnych dwóch ścieżkach eksperymentów badano zmiany epigenetyczne w roślinach traktowanych fitohormonami oraz w roślinach transgenicznym. Związki SA, ABA i JA są regulatorami procesów odpowiedzi roślin na czynniki biotyczne i abiotyczne. Doktorantka wykazała, że egzogenna aplikacja tymi substancjami indukuje zmiany epigenetyczne skutkujące m.in. zmianami regulacji ekspresji genów *CHS* w lnie. Podobnie jak po działaniu oligo tutaj również zmianie ulegały wzory ekspresji genów, poziom metylacji / demetylacji DNA oraz metylacji / acetylacji histonów. Podobne serie badań zostały wykonane przez Doktorantkę z użyciem roślin transgenicznym. W roślinach tych obserwowano zmiany epigenetyczne analogiczne do opisanych wcześniej. Duża różnorodność wyników z trzech równorzędnych serii eksperymentów jest systematyzowana i dyskutowana z danymi literaturowymi.

W dyskusji Doktorantka zawarła stwierdzenia, które nie znajdują się w części przedstawiającej wyniki. Jeden z akapitów (str.128) poświęcono korelacji (mowa o korelacji Pearsona) struktury oligo z obserwowanym efektem biologicznym, jednak w całej pracy brak analiz statystycznych tego rodzaju. Zdanie na str. 128 „Powiązania właściwości oligo z odpowiednimi modyfikacjami umożliwia precyzyjną regulację aktywności genu” mogłoby sugerować, że takie powiązanie wynika z tej pracy. W rzeczywistości taki związek nie jest możliwy nawet teoretycznie. Rodzaje modyfikacji chemicznej nukleotydu lub histonu stanowią tylko jeden poziom zmian epigenetycznych. Równie ważna jak rodzaj modyfikacji jest biologiczna funkcja modyfikowanego genu. Tak sformułowana ogólna uwaga znajduje dobre potwierdzenie w wynikach prezentowanych przez doktorantkę.

Dysertację kończy podsumowanie, na które składa się 11 stwierdzeń. Wiele z nich wymagałoby moim zdaniem przeredagowania i/lub doprecyzowania. W p. 2 Doktorantka napisała, że tendencje zmian ekspresji *CHS* były podobne (w 3 grupach eksperymentów), „co może sugerować podobne mechanizmy zachodzące w wyniku traktowania OLIGO, indukcji odpowiedzi na stres czy wprowadzenia transgenu”. Rzeczywistość niestety (albo na szczęście) nie jest tak prosta. Ponadto mechanizmy warunkujące obserwowane zmiany nie były przez Doktorantkę badane. Szczegółowe uzasadnienie może być przedmiotem dyskusji w czasie obrony. W p. 6 Doktorantka pisze o korelacji, jednak w pracy nie wykonano analizy korelacji. Sformułowania w p. 7 „Wykazano, że technologia OLIGO prowadzi do ukierunkowanej indukcji zmienności u roślin” i w p. 8 „Zmodyfikowane OLIGO (...) umożliwiły utrzymanie w czasie wyindukowanych zmian epigenetycznych” są za daleko idące.

Z najważniejszych uwag około-redaktorskich zanotowałbym i) brak cytowania publikacji Wang et al., Plant J. (2012) DOI:10.1111/j.1365-313X.2012.05093.x nt. złożenia sekwencji genomu lnu. Wyniki tam zawarte są podstawą bazy danych Phytozome, https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Lusitatissimum, bez której nie byłoby możliwe wykonanie tej pracy oraz ii) skorygowanie pisowni tytułów czasopism, wszystkie wyrazy powinny być pisane z dużej litery.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki zaliczyłbym:

- 1) zaprojektowanie oligonukleotydów komplementarnych do wybranego genu i charakteryzujących się różnymi wartościami wolnej energii wiązań, składem nukleotydów i strukturą drugorzędową,
- 2) testowania dwóch modyfikacji chemicznych cząsteczek oligo, której celem było podniesienie stabilności tych molekuł w układzie biologicznym,
- 3) uzyskanie zmian ekspresji genu docelowego,
- 4) porównanie zmian indukowanych przez strategię oligo ze zmianami obserwowanymi w roślinach z heterologiczną ekspresją transgenów i roślinach traktowanych egzogennymi regulatorami wzrostu
- 5) szczegółowe zbadanie zmian epigenetycznych w wybranych regionach genu docelowego.

Interesujące, ale jednocześnie wymagające dalszej weryfikacji, były obserwacje (p.5 str.136) wskazujące, że zwiększony poziom metylacji badanej sekwencji CCGG wiązał się z wyższą ekspresją genu CHS. Pozytywna weryfikacja tej obserwacji poszerzałaby możliwości zmian indukowanych przez tą strategię.

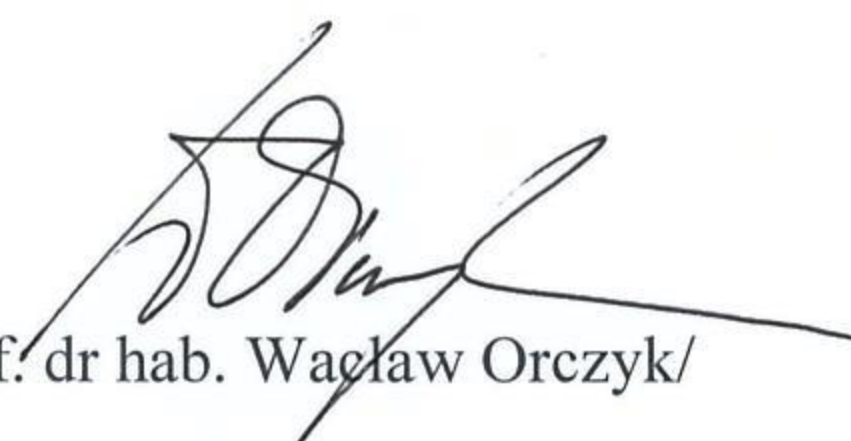
Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników została już opublikowana w czasopiśmie o dobrym współczynniku wpływu tj. *Frontiers in Plant Science*.

Końcowe podsumowanie

Uwagi zawarte w recenzji nie umniejszają wartości dysertacji. Rozprawę doktorską oceniam, jako właściwą pod względem formalnym oraz wartościową merytorycznie. Analiza dysertacji dowodzi, że Autorka jest naukowcem zasługującym na awans naukowy.

Uzyskane wyniki oraz przedstawiona dysertacja spełniają wszystkie warunki Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym i uzasadniają nadanie kandydatce stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Magdaleny Działo do dalszych części przewodu doktorskiego.


/prof. dr hab. Wacław Orczyk/