

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mileny Kulasek pt. "Udział genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn, regulowanych przez mikro RNA w kontroli rozwoju kwiatów łubinu żółtego"

Wprowadzenie

Udomowienie roślin i postęp biologiczny w hodowli wiąże się często z wyciszeniem cech, które wykształciła ewolucja celem przetrwania trudnych warunków. Pozwala to na optymalizację agrotechniki, często skutkuje radykalnym zwiększeniem plonu w warunkach uprawy. Jedną z takich cech u łubinu żółtego jest odcinanie kwiatów, co u obecnie uprawianych odmian prowadzi do zawiązywania strąków przez mniej niż 40% kwiatów. Widząc w tej cesze duży potencjał hodowlany Pani mgr Milena Kulasek podjęła się badania mechanizmu regulacji odcinania kwiatów u łubinu żółtego skupiając się na transkryptomowym wycinku regulacji zależnej od auksyny, by w końcu zidentyfikować moduły regulacyjne miRNA/mRNA. Podstawowym modelem badawczym były kwiaty ułożone w okółkach na pierwszych kilku piętach w kwiatostanie, na których rozwijają się kwiaty przechodząc 4 podstawowe stadia rozwojowe. Przedstawione badania obejmują dogłębną i rozbudowaną analizę bioinfor, wcześniej odczytanych przez członków zespołu transkryptomów, z naciskiem na geny uczestniczące w biosyntezie, transporcie i przekazie sygnału auksyny, hormonu wpływającego niemal na wszystkie funkcje rozwojowe i reakcje rośliny. Analizy bioinformatyczne były dalej poszerzone o poszukiwanie potencjalnych par miRNA –transkrypt genu docelowego w oparciu o dane degradomowe w posiadaniu zespołu badawczego. Oprócz głębokiej analizy porównawczej z obszerną literaturą opisującą badania na innych gatunkach doktorantka zweryfikowała eksperymentalnie kilka hipotez dotyczących funkcjonowania kwiatów, dystrybucji IAA, ekspresji genów, miRNA i metabolitów wraz ze sprawdzeniem kilku domniemych par miRNA/mRNA w stresie suszy.

Dane formalne o rozprawie

Recenzowana praca została przygotowana pod kierunkiem promotora dr hab. Jacka Kęsego, prof. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK) i promotorki pomocniczej dr Pauliny Glazińskiej w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii i przedłożona Radzie Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK. W pracy podano pięć źródeł finansowania – 2 wewnętrzne minigranty dla doktorantów UMK, ministerialny wieloletni program, oraz NCNowe, Sonata promotorki pomocniczej i, co najważniejsze, Preludium dla autorki rozprawy (w roli kierowniczk).

Praca jest napisana w języku polskim i ma format standardowej rozprawy doktorskiej zawierającej wszystkie wymagane elementy. Rozprawa liczy 152 strony. W całej pracy znajdują się cytowania aż 277 pozycji literaturowych, w tym 22% (62) to pozycje z ostatnich 5 lat. Cytowane prace bardzo dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w interesującej tematyce. Proporcje objętości tekstu pomiędzy „przełogiem literatury” - 21 str., „materiałami i metodami” - 23 str., „wynikami” - 44 str. i „dyskusją” - 21 str. są wyważone. W tekst wkomponowano 50 rycin i 20 tabel opatrzonych zwykle w informatywne podpisy. Język przejrzysty bez poważnych błędów językowych, a terminologia naukowa profesjonalna, choć czasem zdarzają się potknięcia, czy pojedyncze literówki, np.: nie „wyrzucanie nasion”, a osypywanie; nie „roślina żywieniowa”, a paszowa; nie neologizm „annotacja” (dosyć często niestety spotykany), a stara, dobra adnotacja; nie „geny markerowe”, a reporterowe (oczywiście g. markerowe istnieją, ale to nie te z tekstu); nie „narządy nektarowe”, a miodniki (czy nektarniki); tautologie jak „zwiększyć ilość uzyskanego plonu”, „geny (...), które wykazywały największe podobieństwo do homologów obecnych u najbliższej spokrewnionego spośród analizowanych gatunków...” itp. Wymienione potknięcia wynikają raczej z tłumaczenia z angielskiego na polski, a więc pewnie do uniknięcia przy publikacjach. Sposób sformułowania celu (w podrozdziale „Cel pracy”), opisu wyników, prowadzenia dyskusji i wyciągania wniosków - poprawne, znajdujące odzwierciedlenie w zaprezentowanych wynikach.

Ocena rozprawy

Tytuł bardzo dobrze oddaje treść i cele rozprawy.

Przełog literatury jest dobrym omówieniem i usystematyzowaniem informacji z zakresu tematyki pracy. Przedstawia sam gatunek i jego znaczenie w rolnictwie, a przede wszystkim biologię kwitnienia. Następnie omawiany jest udział auksyn w indukowaniu odcinania kwiatów w różnych zbadanych modelach i choć wspomniany jest współdziałanie etylenu, to zdaniem recenzenta zbyt ogólnikowo, choć rozumiem też chęć skupienia na IAA. Rozwój kwiatu, jego genetyczna regulacja, a szczególnie udział auksyn są dobrze omówione ale w przypadku omawiania rozwoju kwiatu wolałbym, żeby doktorantka posługiwała się szerszym modelem współdziałania funkcji ABC i E. Potem jednak jest bardzo dobre omówienie rozmieszczenia auksyny oraz egzekucji i przekazywania sygnału tego hormonu wraz z ciekawymi dywagacjami ewolucyjnymi. Tak więc omówiono geny i kodowane białka receptorów auksyny (TIR1/AFB), represorów odpowiedzi (Aux/IAA) oraz czynników odpowiedzi na auksynę (ARF) – ich budowę i mechanizm działania, przy czym nie ograniczono się do modelowego rzodkiewnika i podano liczebność poszczególnych klas genów u 12 innych gatunków. Dywagacje o ARF uzupełniono omówieniem elementów promotorowych warunkujących odpowiedź na auksynę AuxRE. Na koniec doktorantka przedstawiła pokrótce mechanizm działania miRNA i przedstawiła znane moduły miRNA/mRNA w sygnalingu auksyn. Recenzent nie ma się tu do czego przyczepić.

Materiały i metody są przedstawione profesjonalnie i zawierają wszystkie niezbędne informacje techniczne. Dobór materiałów i metod jest jak najbardziej właściwy pod kątem wykonywanych eksperymentów i wyróżnia się przejrzystością i płynnością opisu wykonywanych procedur. Czytelnik odnosi wrażenie że osoba wykonująca i opisująca metodykę dobrze rozumie znaczenie otrzymywanych wyników. Doceniam przedstawienie parametrów pogodowych w poszczególnych latach prowadzenia doświadczeń, ale ciekaw jestem czy w jakiś sposób standaryzowano porę dnia i warunki pogodowe w czasie zbierania materiału do analiz. Podobnie, niepokojąca jest deklaracja używania różnych zestawów do izolacji, RT i qPCRu, ale doceniam rzetelność opisu. Tytuł podrozdziału „Reakcja real-time qPCR” jest niepotrzebnym powtórzeniem równoważnych określeń: real-time PCR = qPCR. Dobór narzędzi do analiz bioinformatycznych jest poprawny, a ich użycie opisano dobrze.

Rozdział wyniki obejmuje treściwy opis rezultatów. Najpierw doktorantka przedstawiła wyniki obserwacji morfologii i funkcjonalności kwiatów łubinu żółtego, które niestety jakościowo nie zachwycają – zdjęcia znamienia mające obrazować retencję pyłku są słabej jakości, a zdolność kiełkowania pyłku jest niepokojąco niska (literatura, np. Kazimierski & Kazimierska sprzed ponad 55 lat pokazuje wartości kilkukrotnie wyższe u łubinu żółtego przy podobnym stężeniu sacharozy) wskazując na jakiś problem metodyczny.

Następnie w wynikach doktorantka przystępuje do obszernej części (szereg podrozdziałów) zawierającej zogniskowaną głównie na genach szlaku transdukcji sygnału auksynowego, analizę dostępnych danych transkryptomowych otrzymanych w zespole, w którym realizowana była praca doktorska. Większość analiz transkryptomowych ukazuje wyniki dla czterech faz rozwojowych kwiatów dolnego piętra i czterech górnego. Najpierw wyfiltrowano z w/w danych transkrypty kodujące rodziny białek uczestniczących w biosyntezie (YUCCA), transporcie (Aux/LAX, ABCB, PIN, PINS i PILS) i metabolizmie (GH3) IAA, dostrzegając pewne różnice ekspresji, co może się przełożyć na funkcjonowanie kwiatów na skrajnych analizowanych piętrach. Pomijając weryfikację poziomu ekspresji inną metodą doktorantka przeprowadziła dosyć trudną analizę immunolokalizacyjną IAA w całych organach i w skrawkach, przy czym ze względu na subtelne różnice w intensywności wybarwienia preparatów dobrze by było prezentować na figurze więcej niż jeden kwiat/organ na stadium na piętro. Ponadto nie bardzo wiem jak to możliwe, że zbliżenie na organ na Ryc. 17 ma krótszą belkę skali niż obraz całej struktury. Jeśli chodzi o immunolokalizację na skrawkach parafinowych pochodzenia roślinnego, to nie jest technika, która umożliwia rozróżnienie sygnałów na poziomie subkomórkowym, więc takie wnioski na podstawie przedstawionych wyników są przedwczesne. Następnie autorka wróciła do poszerzonych analiz bioinformatycznych, koncentrując się na szlaku transdukcji sygnału auksyny. Analizy rozpoczęto od filtrowania transkryptów potencjalnych receptorów auksyny i nie poprzestając na podobieństwie wykonano analizę kompletności obecności domen, a potencjalną funkcjonalność oceniano poprzez symulację dokowania *in silico* dla trzech potencjalnych receptorów auksyny – TIR1a, TIR1b i AFB2 z ligandami IAA, NAA, pikloramem, tryptofanem

i kw. jasmonowym. Następną grupą analizowanych *in silico* transkryptów były koreceptory z liczniejszej rodziny Aux/IAA – zidentyfikowano 18 genów kodujących 44 przypuszczalne białka. Analizowano architekturę i podobieństwo czterech kanonicznych domen i innych rejonów konserwowanych tych białek. Trzecią analizowaną bioinformatycznie grupą białek jest rodzina czynników transkrypcyjnych ARF, która w danych transkryptomowych zespołu reprezentowana jest przez 69 transkryptów pochodzących od 16 genów. Dla nich również przeprowadzono analizę architektury domen wraz z próbą oceny responsywności na IAA, podziału na domniemane aktywatory i represory oraz analizę filogenetyczną homologów u pięciu gatunków. Analizy uzupełniono krótkim opisem trzech białek kodowanych przez homologi korepresora TOPLESS porzeczając jednak na dopasowaniu ich sekwencji aminokwasowych do ortologa z *A. thaliana*.

Kolejna część wyników to analiza interakcji miRNA/mRNA rozpoczynająca się od analizy dostępnego degradomu i identyfikacji par oddziaływań. Tu na Ryc. 32 brakuje legendy dot. kolorów nukleotydów w sekwencji. Analogiczna analiza została wykonana także programem psRNAtarget identyfikując więcej domniemanych par miRNA/mRNA. Następnie w wynikach opisano poszukiwanie odwrotnej zależności poziomu transkryptów i korespondującego miRNA w oparciu o szacunki poziomu transkryptu i miRNA w kwiatach różnych pięter wykonane met. RT-qPCR lub w większości w oparciu o dane transkryptomowe, wyliczając wsp. korelacji Pearson'a (PCC). Analizy te wykonano zgodnie z podziałem: receptory z rodziny TAAR, koreceptory Aux/IAA i regulatory transkrypcji ARF. Analizy korelacji nie wykonano w przypadku Aux/IAA, ze względu na brak śladów działania odpowiednich miRNA w bibliotekach degradomowych. Wśród receptorów negatywnej korelacji nie zaobserwowano, natomiast, w ponad połowie domniemanych par miRNA/mRNA z rodziny ARF taka korelacja występuje. Dane poziomu transkryptu w zależności od piętra i fazy rozwojowej kwiatu dla rodzin genowych wizualizowano w formie eleganckich heat-map – ciekaw jestem dlaczego zrezygnowano np. z analizy zróżnicowanej ekspresji D vs. G czy 1 vs. 2, 3 i 4?

Bardzo ciekawa część wyników to śledzenie zmian ekspresji w potencjalnych parach miRNA/mRNA w dolnym, górnym i górnym po usunięciu kwiatów dolnych okółku, które w analizie qPCR wykazało np. odwrotną korelację wskazując na możliwe zaangażowanie L1-miR281/miR167 w regulacji L1ARF8a w stadium 4 rozwoju kwiatu.

Analogiczną analizę ekspresji zidentyfikowanych par miRNA/mRNA wykonano w kontekście warunków niedoboru wody, przy czym do analiz wybrano zestresowane rośliny po weryfikacji kamerą termowizyjną i kontrolą ekspresji wybranych markerów suszy. Ewentualną negatywną korelację można dostrzec jedynie w dwóch przypadkach ograniczonych do jednego ze stadiów nie dając przesłanek do identyfikacji jakiegoś mocnego i zakonserwowanego układu regulacyjnego.

Dyskusja jest rzeczowa i dosyć szczegółowo i rzetelnie konfrontuje wyniki z danymi literaturowymi w zakresie lokalizacji IAA i aktywności genów. Zdaniem recenzenta dyskusja jest jednak trochę zbyt opisowa i przypomina czasem katalog streszczeń publikacji na określony temat. W dyskusji autorka dopuściła się kilku drobnych nieścisłości. Jedną z nich, to dyskusowanie nt. subkomórkowej lokalizacji IAA na podstawie zaprezentowanych wyników immunolokalizacji w skrawkach parafinowych. Pewnym potknięciem jest też pisanie o zidentyfikowaniu w pełni funkcjonalnych białek, podczas gdy analizy były transkryptomowe. Można tu jedynie pisać o kompletnych sekwencjach czy tp. Zbyt łatwe przechodzenie od analiz sekwencji do wniosków nt. funkcji w dyskusji pojawia się częściej, np. uzasadniając wykluczenie z analiz transkryptów brakiem rejonu kodującego C-terminalną domenę PB1, którą definiuje autorka jako prerekwizyt funkcjonalności białek Aux/IAA. Po pierwsze taki warunek zdefiniowano dla *A.thaliana* (i wcale nie tak kategorycznie), a po drugie białka pozbawione domen mogą wpływać na kinetykę oligomeryzacji innych, kompletnych białek. Parę akapitów dalej, przy omawianiu rodziny ARF, temat możliwej samodzielności domen wrócił – oczywiście jest trochę więcej przesłanek ku temu w literaturze, ale hipoteza taka przy omawianiu Aux/IAA byłaby całkiem ciekawa.

Dyskusja dot. dynamiki zmian IAA w kwiatach przeprowadzona jest poprawnie, łącznie z rozważaniami nt. możliwych mechanizmów adaptacyjnych związanych z zapyleniem poszczególnych pięt w kwiatostanie. Podobnie, dyskusję braku mocnych odwrotnych korelacji miRNA/mRNA u receptorów TAAR i czynników ARF autorka słusznie nakierowuje na możliwe bardziej lokalne cyzelowanie poziomu transkryptów docelowych. Słabsze, istotne statystycznie, korelacje autorka podsumowuje w postaci eleganckiego diagramu łączącego zaobserwowane różnice w miRNA, receptorach TAAR i ARFach w kwiatach górnych i dolnych w 4 stadiach rozwojowych. To bardzo dobra część dyskusji, podobnie jak część poświęcona analizie wykrytych potencjalnych modułów regulacyjnych po oberwaniu kwiatów dolnych. Na koniec autorka podjęła się dyskusji zachowania omawianych modułów regulatorowych w kwiatach, w stresie suszy, jednak i tu nie udało się wychwycić jakiejś klarownej reguły czy korelacji. Natomiast, swoją drogą ciekawe, omówienie genów markerowych służących do udowodnienia, że stres suszy oddziałuje na rozwijające się kwiaty łubinu żółtego, jest znacznie obszerniejsze niż dyskusowanie badanej regulacji elementów szlaku transdukcji sygnału auksynowego.

W dobrze napisanym w punktach podsumowaniu autorka podkreśla subtelną i zapewne bardzo lokalną naturę obserwowanej regulacji poprzez dynamicznie zachowujące się IAA z równie dynamiczną regulacją jego działania na poziomie molekularnym, włącznie z mechanizmami zależnymi od miRNA. Doktorantka podkreśla też transkrypcyjnie odmienny status górnych i dolnych kwiatów, oraz pokazuje że tenże status można modyfikować w kwiatach górnych poprzez usunięcie dolnych upodabniając nowe dolne do pierwotnego. Wskazane są tutaj również możliwe kierunki dalszych badań, z których zdaniem recenzenta, najciekawszy byłby ten z maskowaniem elementów AuxRE. Natomiast ostatni punkt

podsumowania (wyniki podstawą do stworzenia nowych linii łubinu) jest oczywiście pożądany i uzasadniający podjęcie tematu ale tak odległy, że aż niepotrzebny w podsumowaniu.

W całościowym ujęciu brakuje mi jedynie poszerzenia dyskusji o aspekty w sposób naturalny wiążące się z odcinaniem organów, czyli związane z rolą etylenu czy innych hormonów. Rozumiem, że praca była zogniskowana na auksynach, jednak unikanie w dyskusji kwestii etylenowych zubaża tę pracę, a jestem przekonany, że wychodząc z tej grupy badawczej świadomość współdziałania wielu hormonów w omawianym procesie jest oczywista i bez uszczerbku dla oryginalności innych prac zespołu można by dyskusję wzbogacić.

Podsumowanie

Podsumowując recenzję, praca Pani mgr Mileny Kulasek to kawał solidnej, żmudnej i stojącej na wysokim poziomie, pracy biologa, opisującej zależne od auksyn molekularne mechanizmy determinacji odcinania kwiatów łubinu żółtego. Dysertacja pokazuje zarówno umiejętność doktorantki w analizowaniu dużych zestawów danych genomowych, wyłuskiwania z nich istotnych procesów molekularnych, jak i budowania doświadczeń do szczegółowych analiz poszczególnych genów. Opracowanie odzwierciedla wysokie umiejętności techniczne i zawiera dobrej jakości wyniki z dobrym potencjałem publikacyjnym.

Wskazane w recenzji niedociągnięcia nie stanowią istotnych błędów rzeczowych i całą pracę oceniam bardzo dobrze. Analiza tekstu dowodzi, że autorka jest dojrzałym naukowcem godnym awansu naukowego.

Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Mileny Kulasek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marcin Filipecki
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
marcin_filipecki@sggw.edu.pl