



UNIwersytet GDAŃSKI



80-807 Gdańsk, ul. Abrahama 58; tel.: +48 58 5236320; faks: +48 58 5236430  
www.biotech.ug.edu.pl



**Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii UG i GUMed**

Gdańsk, 18.12.2018

dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Katedra Biotechnologii  
Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych  
ul. Abrahama 58  
80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Mierziak-Dereckiej,  
pt.: „Znaczenie genu kodującego beta-ketotiolazę dla metabolizmu lnu”**

Pani mgr Justyna Mierziak-Derecka realizowała swoją pracę doktorską w Zakładzie Biochemii Genetycznej, na Wydziale Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką prof. dr hab. Jana Szopa-Skórkowskiego i dr hab. Anny Kulmy. W Zakładzie Biochemii Genetycznej od lat prowadzone są badania dotyczące ulepszania roślin użytkowych (w tym lnu) z zastosowaniem transgenezy. Praca doktorska mgr Justyny Mierziak-Dereckiej dotycząca transgenicznego lnu z nadekspresją beta-ketotiolazy również wpisuje się w powyższy nurt badawczy.

Przedmiotem pracy doktorskiej była analiza aktywności enzymu beta-ketotiolazy na pierwszorzędowy i drugorzędowy metabolizm w lnie transgenicznym uzyskanym dzięki wprowadzeniu bakteryjnej beta-ketotiolazy i w roślinach kontrolnych. Przedstawiona do recenzji praca jest wieloaspekowa, bo porusza tematy związane z genomem roślinnym, transkryptomem i metabolomem. Szczególną uwagę w pracy poświęcono beta-hydromaślanowi, który powstaje w roślinach w reakcji katalizowanej przez beta-ketotiolazę. Temat pracy doktorskiej uważam za bardzo ważny i uzasadniony. Wcześniejsze badania prowadzone z Zakładzie Biochemii Genetycznej dotyczące nadprodukcji polihydromaślanu w lnie wykazały zmiany w metabolizmie lipidów, cukrów i fenylopropanoidów i powiązano te zmiany z beta-hydromaślanem. Celem pracy doktorskiej pani mgr Justyny Mierziak-Dereckiej było wykazanie, że związek ten, który wchodzi w skład ciał ketonowych w komórkach zwierzęcych jest obecny w lnie i działa plejotropowo na poziomie komórkowym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Justyny Mierziak-Dereckiej jest oryginalnym opracowaniem liczącym 171 stron maszynopisu (wraz z załącznikami) i ma układ przyjęty dla tego typu opracowań.

**Streszczenie** – w języku polskim i angielskim zawiera zwięzłe podsumowanie pracy.

**Wstęp – przegląd literatury** – rozdział ten stanowi zwięzłe 24-o stronicowe wprowadzenie do problematyki pracy i składa się z siedmiu podrozdziałów. Autorka przedstawiła charakterystykę *Linum usitatissimum* i wykazała, jaki ogromny potencjał kryje się za tą jedną z najpowszechniej uprawianych roślin użytkowych. W tym miejscu chciałabym zadać pytanie doktorantce *co miała na myśli pisząc, że włókno lniane może być dobrym surowcem do wytworzenia alternatywnego antybiotyku?*

Kolejne podrozdziały wstępu omawiają tiolazy i ich rolę w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Ta część jest bardzo dobrze zilustrowana za pomocą schematów i rysunków co pozwala na zrozumienie trudnych i skomplikowanych szlaków syntezy i działania tiolaz. Na pochwałę zasługuje opisanie przez Doktorantkę w rozdziale wstęp modyfikacji epigenetycznych związanych ze zmianami w poziomie metylacji DNA i zmianami w potranslacyjnej modyfikacji histonów. Ogrom literatury zacytowanej w tej części pracy świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu. We wstępie nie zabrakło również informacji dotyczącej szlaku fenylopropanoidowego ze względu na fakt, że pani mgr Justyna Mierziak-Derecka w swojej pracy badała również wpływ beta-hydromaślanu na wyżej wymieniony szlak związany z metabolizmem wtórnym roślin. Do tej części pracy doktorskiej mam pytanie – co Doktorantka miała na myśli pisząc w rozdziale dotyczącym techniki OLIGO, że technika ta *opiera się na epigenetycznej modyfikacji polegającej na wprowadzeniu do ROŚLIN HOMOLOGICZNYCH do badanego genu krótkich sekwencji oligonukleotydowych? Co to są rośliny homologiczne?*

**Cel pracy** – w tym rozdziale pracy mgr Justyna Mierziak-Derecka jasno sformułowała pięć głównych zagadnień, które badała w ramach realizacji rozprawy doktorskiej. Główny cel i problem badawczy dotyczył określenia zawartości beta-hydromaślanu w tkankach lnu transgenicznego i niemodyfikowanego oraz określenie jego potencjalnego zaangażowania w funkcjonalność komórek roślinnych. Kolejny cel to zbadanie jaki wpływ ma ekspresja beta-ketotiolazy oraz nadprodukcji beta-hydromaślanu na funkcjonowanie roślin (wzrost i metabolizm), jak również ocena surowca pozyskanego z modyfikowanych roślin lnu w porównaniu do kontroli. Ze względu na fakt, że Doktorantka badała beta-hydromaślan – jednym z celów jej pracy była analiza zmian w ekspresji genów zaangażowanych w modyfikację chromatyny ze szczególnym uwzględnieniem deacetylaz histonowych.

**Materiały i Metody.** Rozdział ten obejmujący spis odczynników chemicznych wykorzystanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz użytej aparatury budzi moje największe zastrzeżenia w całej pracy. Wypunktowanie wszystkich odczynników w kolejności alfabetycznej i brak numeracji powoduje, że nie ma odnośników do tych odczynników w metodach, co będzie w przyszłości problemem dla kogoś, kto będzie chciał powtórzyć eksperymenty opisane przez Doktorantkę. Ponadto niektóre z odczynników zostały opisane skrótem i brak jest jego wyjaśnienia (przykład CDTA). Skoro Doktorantka napisała, że wykorzystywała standardy związków fenylopropanoidowych, monocukry, czy też standardy do wykreślenia krzywych do oznaczeń metodą spektrofotometryczną firmy Sigma-Aldrich, to powinny być one wymienione w tym rozdziale. Opisanie warunków hodowli *in vitro* lnu również pozostawiają wiele do życzenia. Nie ma na przykład podanego pH pożywki MS (do wzrostu kalusa i powstawania pędów). Napisanie, że do pożywki dodawano 350 µl PPM po autoklawowaniu, ale nie podając objętości pożywki czytelnik dalej nie ma pojęcia jakie jest stężenie tego związku w medium. Warto również wspomnieć na jakim podłożu hodowano patogeny ludzkie (np.: *Staphylococcus aureus*), a na jakim *Agrobacterium tumefaciens*. *Jaki antybiotyk selekcyjny stosowała Doktorantka w przypadku transformacji komórek bakteryjnych i ile dodawała go do pożywki selekcyjnej (str. 54)?* W podrozdziale 3.5.15. powinna być zacytowana Tabela 2, a nie Tabela 1. *Czy podczas oznaczenia zawartości związków fenylopropanoidowych metodą UPLC Doktorantka wykorzystywała mokrą masę roślin czy suchą? Bardzo bym prosiła, by podczas obrony pracy pani mgr Justyna Mierziak-Derecka szczegółowo opisała jak oceniała wpływ ekstraktu ze słomy lnianej na wzrost wybranych szczepów bakteryjnych i proliferację komórek skórnych.* Z opisu w pracy wynika bowiem, że w przypadku bakterii traktowała je ona ekstraktem metanolem, a alkohol ten sam w sobie ma właściwości bakteriobójcze. Moim zdaniem w przypadku badania wpływu ekstraktu na proliferację komórek skórnych Doktorantka powinna po wysuszenia ekstraktów metanolem rozpuścić je w DMSO, a nie w wodzie, bo nie wszystkie metabolity wtórne rozpuszczają się w wodzie (glikozydy flawonoidowe dobrze rozpuszczają się w H<sub>2</sub>O, ale aglikony już nie).

W rozdziale **Wyniki** na 72 stronach maszynopisu Doktorantka szczegółowo opisała wyniki swoich badań w czterech głównych podrozdziałach. Pokazała, że zidentyfikowała sekwencje kodujące beta-ketotiolazy w lnie wykorzystując narzędzia biologii molekularnej. Kolejno przeanalizowała ona wpływ egzogenego beta-hydromaślanu na len. W tym wypadku poddała analizie poziom ekspresji genu kodującego lnianą beta-ketotiolazę (Lu\_bKAT) i poziom ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w modyfikacje epigenetyczne (deacetylazy klasy RPD3-HDAC6, HDAC19, klasy Sir2-SRT1 i SRT2 oraz klasy HD2-HD2). W tej części wyników

Doktorantka przeanalizowała również ekspresję genów metabolizmu związków fenylopropanoidowych pod wpływem działania beta-hydromaślanu i stwierdziła, że większość z badanych genów uległa nadekspresji. Aby dopełnić analizę pani mgr Justyna Mierziak-Derecka określiła profil zawartości związków fenylopropanoidowych w lnie, gdzie wykazała spadek zawartości flawonoidów i wzrost kwasów fenolowych.

W celu poznania funkcji genu odpowiedzialnego za beta-ketotiolazy Doktorantka uzyskała lin transgeniczny z nadekspresją beta-ketotiolazy. W tym miejscu mam pytanie do Doktorantki – *jaki i ile użyto w tym wypadku antybiotyku w podłożu selekcyjnym do weryfikacji roślin C (uzyskanych przez dr Magdalenę Wróbel-Kwiatkowską) i roślin H uzyskanych w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej?* Po wykonaniu analizy z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej określającej poziom ekspresji transgenu w roślinach zmodyfikowanych genetycznie, Doktorantka określiła poziom ekspresji genu kodującego lnianą beta-ketotiolazę i reduktazę acetoacetylo-CoA w tych roślinach. Istotną częścią pracy doktorskiej była ocena zawartości beta-hydromaślanu w lnie z nadekspresją beta-ketotiolazy. Zaadoptowana i zmieniona metoda oznaczania beta-hydromaślanu z krwi ludzkiej z wykorzystaniem chromatografii gazowej i spektrometrii mas pozwoliła Doktorantce na pełną analizę roślin C i H i wykazanie obecności wolnego beta-hydromaślanu w lnie. Z kolei ocena poziomu ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w modyfikacje epigenetyczne pozwoliła na stwierdzenie, że modyfikacje genetyczna na transgenicznym lnie nie miała wpływu na ogólny poziom metylacji genomu roślinnego. Istotnym aspektem pracy doktorskiej była analiza szlaku fenylopropanoidowego w transgenicznych roślinach C oraz H biorąc pod uwagę jak ogromną rolę odgrywają te związki w roślinach. Pani mgr Justyna Mierziak-Derecka zbadała zmianę ekspresji poziomu 21 genów związanych z metabolizmem związków fenylopropanoidowych (geny syntezy flawonoidów, kwasów fenolowych, różnych grup fenylopropanoidów i benzenoidów) i wykazała nadekspresję większości z badanych genów w roślinach C i H. Analiza chromatograficzna UPLC zawartości wtórnych metabolitów z grupy fenylopropanoidów pozwoliła na porównanie roślin C i H w kulturach *in vitro*. Analizę taką wykonano również dla roślin C w warunkach polowych. *I tu mam pytanie – dlaczego takiego eksperymentu nie wykonano dla roślin H?* Z kolei wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężoną ze spektrometrią mas pozwoliło na analizę wybranych metabolitów pierwszorzędowych (aminokwasów i kwasów karboksylowych) zawartych w tkankach roślin transgenicznych. Ilość i jakość tych metabolitów ma wpływ na poziom metabolitów wtórnych, dlatego też taka analiza była bardzo wskazana.

W pracy doktorskiej pani mgr Justyna Mierziak-Derecka korzystała nie tylko z roślin transgenicznych uzyskanych przy wykorzystaniu wektora – *A. tumefaciens*, ale również

nowoczesnej metody OLIGO, która pozwala na epigenetyczne modyfikacje genomu roślinnego w celu wywołania nadekspresji bądź represji interesujących nas genów. Doktorantka przebadła w ramach realizacji pracy doktorskiej wpływ czterech różnych sekwencji oligonukleotydów, które miały za zadanie zmianę w ekspresji lnianej beta-ketotiolazy. Wyniki badań wykazały, że sekwencja OLIGO 2 spowodowała najwyższy wzrost nadekspresji genu kodującego beta-ketotiolazę (o 68% w porównaniu do kontroli). W związku z tą częścią wyników mam do pani mgr Justyny Mierziak-Dereckiej kilka pytań. *Co było kontrolą w wypadku analizy ekspresji genów opisanych na wykresie 21 – czy kontrolę stanowiły rośliny, które również były poddane infiltracji przez 15 minut, ale bez dodatku OLIGO? Czy doświadczenie było powtarzane w kilku niezależnych eksperymentach biologicznych? Czy technika OLIGO odnosząca się do komórek roślinnych była wcześniej opisana w literaturze? Czy 24 i 48 godzin jest to czas wystarczający by zaobserwować zmiany w ekspresji genów – czy Doktorantka sprawdzała ekspresję po dłuższym czasie? Czy uzyskiwanie roślin metodą OLIGO jest ekonomicznie uzasadnione?*

Biorąc pod uwagę fakt, że len, który był obiektem badań Doktorantki może być w przyszłości wykorzystany w wielu gałęziach przemysłu, analiza surowców uzyskanych z transgenicznych roślin była ważną częścią pracy doktorskiej. Istotne jest, że Doktorantka nie stwierdziła wyraźnych różnic fenotypowych pomiędzy roślinami transgenicznymi C i kontrolą. W roślinach C hodowanych w warunkach polowych pani mgr Justyna Mierziak-Derecka określiła szereg ważnych parametrów jak: zawartość związków fenylopropanoidowych, terpenoidów oraz kwasów tłuszczowych w słomie, w nasionach w we włóknie lnu. Szczegółowo została opisana analiza biochemiczna głównych składników ściany komórkowej słomy z transgenicznego lnu C (celuloza, ligniny, hemicelulozy, pektyny). Analizę składu i struktury włókna zamykają badania wykonane przy pomocy spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) i rentgenografii strukturalnej. W tym miejscu mam pytanie do Doktorantki: *czy ona sama wykonywała te badania czy analizy te zostały zlecone? Dlaczego nie analizowano surowców uzyskanych z transgenicznych roślin H?*

Biorąc pod uwagę fakt, iż słoma lniana i uzyskiwane z niej włókno zawierają związki wykazujące aktywność przeciwutleniającą oraz przeciwdrobnoustrojową uzupełnieniem pracy doktorskiej były właśnie te badania. Doktorantka napisała, że ekstrakty ze słomy niezmodyfikowanej i zmodyfikowanej wykazywały dobre właściwości antyoksydacyjne i moje pytanie brzmi – *na podstawie jakiego wzorca/odniesienia została tak oceniona ta aktywność? W przypadku oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów ze słomy lnianej mam dużo wątpliwości ze względu na niejasny opis eksperymentów, które doprowadziły do uzyskanych przez Doktorantkę wyników. W związku z powyższym prosiłabym podczas obrony pracy doktorskiej o dokładniejszy ich opis. Co umieszczono na osi Y na Rysunku 11 w Panelu A i B i*

co było kontrolą? Biorąc pod uwagę CFU po 24 godzinach działania ekstraktów ze słomy Inianej spadek o 1 logarytm w stosunku do kontroli nie pozwala na wysunięcie wniosku, że ekstrakty te mają dobre właściwości przeciwbakteryjne (szczególnie w stosunku do *S. aureus*). Moja uwaga - nie ma „związków o właściwościach biomedycznych i związków antymikrobiologicznych” - str. 132.

**Dyskusja.** W ostatnim rozdziale pracy „Dyskusja” na 9 stronach tekstu Doktorantka przedyskutowała wyniki swojej pracy z dostępną literaturą światową. Pani mgr Justyna Mierziak-Derecka w dyskusji napisała, że beta-hydromaślan jest naturalnie syntetyzowany w roślinach, by w drugim zdaniu napisać, że nie ma doniesień o jego obecności w roślinach, co nie jest prawdą (str. 140). *Czy pisząc, że w pracy doktorskiej po raz pierwszy wykazano obecność beta-hydromaślanu w roślinach Doktorantka miała na myśli rośliny lnu, czy wszystkie rośliny C3 i C4?*

Pani mgr Justyna Mierziak-Derecka w swojej pracy doktorskiej umieściła 5 tabel, 12 rysunków i 48 wykresów, co świadczy o ogromnej pracy włożonej przez Doktorantkę w trakcie wykonywania doświadczeń. Prezentowana do recenzji praca doktorska napisana jest poprawnym językiem. W sekcji materiały i metody wkradł się błąd dotyczący numeracji rozdziałów, ponieważ po rozdziale 3.5.30 pojawiły się numery 3.5.3 do 3.5.7 co wprowadza w błąd przy czytaniu rozdziału wyniki. Podobnie w sekcji Wyniki dwa razy występuje numeracja rozdziałów 4.2. i dotyczy zupełnie innych zagadnień. W tym samym rozdziale pod podrozdziałem 4.2.7. pojawiają się podrozdziały 4.2.5 i 4.2.6. Doktorantka nie ustrzegła się również przed używaniem żargonu laboratoryjnego - namnażanie genów (str. 51), wytwarzanie roślin (str. 53). W rozdziale literatura autorzy, którzy mają 2, 3 prace w jednym roku powinni być oznaczeni jako a, b i c, bo później w cytowaniu nie bardzo wiadomo o którą pozycję literaturową chodzi (np.: Chen i Wu 2005; Zhao i in. 2014; Luo i in. 2012). W kilku miejscach tytuły artykułów zostały zniekształcone przez program edycji (np.: Kim i in. 2008; Tian i Chen 2001; Bond i in. 2009). Również w kilku miejscach zacytowana została literatura, która niekoniecznie wniosła informacje dotyczące danego zagadnienia - np.: Gebarowski i in. 2017, czy Amat i in. 2009 (str. 146). Wydaje mi się, że Doktorantka mogłaby z powodzeniem zacytować mniej literatury, niż w pracy (doliczyłam się 343 pozycji). Niestety w pracy bardzo często występował błąd literowy - słowo luteolina zostało poprawione najprawdopodobniej przez autokorektę word na luteina. Nie pisze się białka Argonauta, a Argonaute. Jednakże powyższe niedociągnięcia redakcyjne nie umniejszają oceny rozprawy doktorskiej.

**Podsumowując,** przedstawione przez panią mgr Justynę Mierziak-Derecką wyniki badań stanowią ważny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej genu kodującego beta-ketotiolazę w roślinach lnu. Po zapoznaniu się z pracą doktorską stwierdzam, że Pani mgr Justyna Mierziak-

Derecka wykazała się umiejętnym planowaniem eksperymentów i zdolnością wykorzystania technik biologii molekularnej i biotechnologii roślin. Za osiągnięcie jej pracy uważam wykazanie, że zmiana ekspresji genu kodującego beta-ketotiolazę wywiera wpływ na metabolizm podstawowy i wtórny w roślinach lnu, a beta-hydromaślan wpływa na ekspresje genów związanych z modyfikacją chromatyny. Badania pokazały, że beta-hydromaślan który jest dominującym związkiem wchodzącym w skład ciał ketonowych w komórkach zwierzęcych, jako cząsteczka regulatorowa może mieć znaczenie na przebieg szlaków metabolicznych w roślinach lnu.

**Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim (określone w Art. 13 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311), stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktorantki w dyscyplinie naukowej, w związku z powyższym, zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani magister Justyny Mierziak-Dereckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.**

KIEROWNIK  
Pracowni Badania Związków  
Biologicznie Czynnych  
  
prof. UG, dr hab. inż. Aleksandra Królicka