

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ahmeda Zeitouna
wykonanej w Instytucie Genetyki Biochemicznej Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego**

Wprowadzenie

Len należy do grupy najwcześniej udomowionych gatunków. Pierwsze materialne ślady uprawy lnu pochodzą z regionu Żyznego Półksiężycza i są datowane na około 7000 lat p.n.e. Len był i jest bardzo ważną uprawą ze względu na włókna pozyskiwane z pędów oraz nasiona stanowiące źródło oleju i białka i dodatkowo wykorzystywane w medycynie naturalnej.

Mimo, iż głównym tematem dysertacji jest zaawansowana biotechnologia warto zatrzymać uwagę na kulturotwórczej roli lnu, który towarzyszy człowiekowi praktycznie od początków cywilizacji śródziemnomorskiej. Len do dzisiaj pozostaje ważnym gatunkiem uprawnym. Celami współczesnej hodowli lnu jest plon i jakość włókien oraz plon nasion a także, nie mniej ważne, odporności na choroby, głównie fuzariozę oraz rdzę lnu. Należy podkreślić, że wszystkie te aspekty są przedstawione przez Doktoranta w obszernym przeglądzie literatury.

Recenzowana dysertacja jest bardzo dobrym przykładem badań wykorzystujących zaawansowane metody biologii molekularnej i analizy biochemicznej w celu poznania procesów oraz doskonalenia cech użytkowych lnu.

Opis dysertacji

Tematem recenzowanej dysertacji jest charakterystyka molekularna, biochemiczna i fenotypowa dwóch transgenicznych linii lnu. W jednej z nich wyciszono ekspresję endogennego genu biosyntezy lignin w celu obniżenie zawartości tego biopolimeru. Linie drugą uzyskano w wyniku wprowadzeniu dwóch transgenów kodujących enzymy pektynolityczne w celu zredukowania we włóknach ilości pektyn.

Cała dysertacja jest napisana po angielsku oraz zawiera obszerne streszczenie w języku polskim. Struktura dysertacji, liczącej 159 stron, jest typowa dla tego rodzaju rozpraw. Składa się z siedmiu rozdziałów, listy wniosków, spisu literatury, aneksu, wykazu skrótów oraz dodatkowo zawiera życiorys doktoranta. W kolejnych podrozdziałach **wstępu** bardzo dobrze charakteryzowano obiekt badawczy tj. morfologię roślin nasion lnu, badane **biopolimery**: ligninę, pektynę, celulozę, hemicelulozę, szlaki **biosyntezy** oraz **geny** kodujące kluczowe enzymy tych szlaków. Opisane zostały najważniejsze **patogeny** lnu, wywołane przez nie choroby, potencjalny udział wymienionych wcześniej biopolimerów w odporności na patogeny, a także białka związane z patogenezą **PR** będące ważnymi indykatorami infekcji i interakcji rośliny z patogenem.

Doktorant przedstawił znane z literatury strategie **ulepszania cech** użytkowych lnu przy wykorzystaniu **metod biotechnologicznych** oraz szczegółowo opisał dwie transgeniczne linie lnu **CAD33** i **PG11**, które były materiałem badawczym w tej pracy. Linie **CAD33** uzyskano indukując wyciszenie ekspresji genu kodującego dehydrogenazę alkoholu cynamolowego **CAD**, enzym szlaku biosyntezy lignin. Konsekwencją było obniżenie aktywności wymienionego wcześniej enzymu i zmiany we frakcji lignin. Ze zmian fenotypowych obserwowano poprawienie strawialności oraz zmianę odporności roślin na *Fusarium*. Linie **PG11** uzyskano wprowadzając do roślin dwa geny pochodzące z *Aspergillus aculeatus*. Pierwszy kodujący białko o aktywności polygalakturonazy **PGI**, drugi rhamnogalakturonazy **RHA**. Ekspresja obydwu genów i sumaryczna aktywność hydrolityczna obydwu enzymów

powodowała znaczne obniżeniem ilości pektyn. Wcześniejsze obserwacje wykazały, że rośliny obydwu linii wykazały zmiany odporności na porażenie *Fusarium* w porównaniu do nietransgenicznych roślin kontrolnych.

Celem pracy była identyfikacja tych czynników, które charakteryzują obydwie linie transgeniczne i jednocześnie korelują ze zmianami ich odporności w odniesieniu do nietransgenicznej kontroli. Badania zaplanowano tak, aby odpowiedzieć na dwa pytania: Jakie biopolimery mogą być funkcjonalnym komponentem mechanizmów odporności? W jaki sposób zmiana składu włókien biopolimerów skutkowałą zmianami odporności?

W celu zebrania danych doktorant wykonał kompleksowe badania **składu biochemicznego** nasion oraz roślin 4- i 11-tygodniowych obydwu linii pokolenia T2. Zbadał zawartość kwasów **galakturonowych**, **lignin**, zawartość i strukturę **celulozy**, skład **monosacharydów**, wybrane składniki **substancji śluzowych**. Określił skład **kwasów tłuszczowych** i związków **fenolowych** oraz analizował aktywność **antyoksydacyjną**. Aktywność antyoksydacyjna jest parametrem, który może znacznie się zmieniać zależnie od organu i fazy rozwojowej.

W jakiej części rośliny analizowano aktywność antyoksydacyjną? Czy roślina ta było inokulowana przez *Fusarium*?

Ze względu na to, że zmiany w liniach CAD33 i PG11 dotyczyły metabolizmu dwóch biopolimerów (lignin i pektyn) doktorant analizował ekspresję 34 genów lnu kodujących kluczowe enzymy metabolizmu różnych biopolimerów. Były to: 11 genów metabolizmu lignin, 8 genów metabolizmu pektyn, 7 genów metabolizmu celulozy i 8 genów metabolizmu hemicelulozy. Tak zaplanowane badania pozwoliły na pełną informację o ewentualnym oddziaływaniu ekspresji transgenów na regulację endogennych genów lnu. Na wszystkich rysunkach (4.33 – 4.37) podano względną ekspresję w roślinach kontrolnych tylko w odniesieniu do pierwszego genu z badanej serii.

Proszę wyjaśnić, jakie były wartości względnej ekspresji *C4H* kontroli (rys. 4.33) i konsekwentnie dla pozostałych genów?

Proszę wyjaśnić, czy ekspresja genu *PG* (rys 4.34) to ekspresja genu lnu kodującego polygalakturonazę czy ekspresja wprowadzonego transgenu? Jeżeli jest to ekspresja genu lnu to, proszę o oszacowanie względnej ekspresji transgenów wprowadzonych do linii PG11?

Do puli badanych genów doktorant dodał jeszcze dwa geny kodujące białka typu PR oraz siedem genów kodujących białka typu WAK tj. kinazy związane ze ścianą komórkową. Zmiany ekspresji genów *PR* uważane są za indikator stresu biotycznego. W dysertacji przedstawiono względną ekspresję dwóch genów PR kodujących β -1,3-glukanazę i chitynazę.

W roślinach poznano względnie liczną grupę kinaz związanych ze ścianą komórkową typu WAK (*wall associated kinase*). Ich wspólną cechą jest powinowactwo do pektyn oraz funkcjonalny związek z procesami interakcji rośliny z patogenem. Ta charakterystyka w pełni uzasadnia dodanie ich do puli badanych genów. Białka WAK są receptorami pektyn, co dotyczy zarówno uwolnionych fragmentów kwasów oligogalakturonowych jak i pektyn obecnych w ścianie komórkowej. To powinowactwo warunkuje szereg biologicznych funkcji WAK, którymi są m.in. percepcja i transdukcja sygnałów infekcji, zranienia i/lub wzrostu objętościowego komórek (*cell wall expansion*) to jest tych procesów, kiedy uwalniane są oligosacharydy. Wyróżnikiem białek WAK są: domena kinazy ser/thr, domena

transmembranowa oraz EGF warunkująca wiązanie białka ze ścianą komórkową. Badano ekspresję siedmiu genów *WAK* lub podobnych do *WAK* (*WAK-like*).

W dysertacji nie umiałem odszukać rozwinięcia nazw dwóch z ww. genów: *COBRI/COBRA1* oraz *COBR2/COBRA2*. Czy znane są sekwencje nukleotydowe badanych przez doktoranta genów *WAK* u lnu?

Z tym pytaniem wiąże się jedna uwaga ogólna dotycząca wszystkich badanych genów. Startery do tych analiz zebrane są w tabelach A, B, C, D nie podano jednak numerów sekwencji źródłowych, które były użyte do projektowania starterów i następnie do analizy ekspresji.

Czy znane są sekwencje nukleotydowe wszystkich badanych genów u lnu czy raczej wykorzystano sekwencje ortologów tych genów z innych gatunków?

W jakiej relacji do tego pytania pozostają sekwencje cDNA zamieszczone w Aneksie? Jak zostały uzyskane i przypisane do określonych genów?

Odpowiadając na te pytania prosiłbym, aby Doktorant uwzględnił fakt, iż białka obecne w komórce mogą występować, jako izoformy i być kodowane przez wielogenowe rodziny genów.

W dyskusji doktorant interpretuje wyniki analiz odpowiadając na sformułowane na wstępie doktoratu pytania. Do grupy najbardziej interesujących wyników zaliczyłbym analizy zmian ekspresji genów metabolizmu biopolimerów oraz równoległe wykonane analizy komponentów tych biopolimerów. Doktorant omawia i interpretuje zmiany ekspresji kolejnych genów i odpowiadające im zmiany w profilu metabolitów. Myślę, że tą część dyskusji znacznie wzbogaciłoby dodanie jednego akapitu zawierającego syntetyczne podsumowanie.

Interpretacja metabolomicznej części dysertacji jest z obiektywnych powodów dużym wyzwaniem. W tak złożonej sieci, jaką tworzą szlaki syntezy biopolimerów liniowy związek ekspresji z ilością metabolitu może być bardzo rzadki. Wskazują na to zarówno wyniki i dyskusja zawarte w dysertacji oraz dane literaturowe. Przede wszystkim metaboliczny dystans od transkryptu (tj. zmiany ekspresji) do metabolitu jest duży a wiedza na temat wielu etapów pośrednich ciągle ograniczona. Oprócz poziomu ekspresji mają tu znaczenie m.in. czas półtrwania transkryptu i białka, tempo translacji, obecność kofaktorów niezbędnych do aktywności enzymatycznej. Ten obraz jest dalej komplikowany obecnością wielu izoform białek enzymatycznych często kodowanych przez wielogenowe rodziny genów. Ta złożoność jest niezbędna, aby komórka mogła skutecznie reagować na bodźce. Ten element jest dyskutowany przez Doktoranta w odniesieniu do genów syntazy celulozy.

Bardzo interesującą grupą wyników są profile ekspresji genów kinaz w tym szczególnie genu opisanego, jako *WAK*. Wynik ten jest szczegółowo omawiany przez doktoranta jednak, moim zdaniem, mógłby być uzupełniony o jeszcze jeden element. Badania zespołu Kohorna (jedna z nich jest cytowana) wykazały, że wyróżnikiem kinaz typu *WAK* jest ich powinowactwo do pektyn lub oligosacharydów. Ta cecha umożliwia białkom *WAK* percepcję a następnie transdukcję sygnału takich zdarzeń jak zranienia, uszkodzenia przez szkodnika, infekcje patogenów, czy wzrost objętościowy komórki. Linia PG11 charakteryzuje się aktywnością dwóch dodatkowych pektynaz, które przez cały czas generują produkty degradacji pektyn (oligosacharydy) podobne strukturalnie do elicytorów patogenezy i będące jednocześnie potencjalnymi induktorami białek *WAK*. Jak wykazano linia ta charakteryzuje się bardzo silną (konstytutywną) nadekspresją *WAK*, czego konsekwencją może być również aktywacja

mechanizmów obronnych. Potwierdzeniem tego ostatniego przypuszczenia jest obserwowana silna ekspresja chitynazy (PR4/PR8) wyłącznie w linii PG11 a nie w CAD33.

Zgadzam się z interpretacją przedstawioną w dysertacji, że bardzo silna ekspresja *WAK* jest istotnym a być może najważniejszym czynnikiem podniesionej odporności linii PG11 na *Fusarium* i prosiłbym doktoranta o opinię i ewentualne rozwinięcie tak zaproponowanej dodatkowej interpretacji uzyskanych wyników.

Do obowiązków recenzenta należy również zwrócenie uwagi na to, co powinno być napisane lub zredagowane lepiej. W przyszłej pracy Doktorant powinien wykazać większą staranność redakcyjną i zdecydowanie częściej korzystać z funkcji *spelling correction*. Błąd literowy w polskim tytule na stronie tytułowej nie jest dobrym otwarciem dysertacji. W opisie i wnioskowaniu należałoby wykazać większą precyzję i staranność terminologiczną. Są to m.in. poprawna pisownia oznaczeń genów (kursywą) i białek (czcionką prostą). Z samego zapisu można wnioskować czy mówimy o WAK białku czy *WAK* genie.

Ważne również, aby wnioskować wyłącznie na podstawie wyników a nie przypuszczeń (np. na str. 131, interpretacja roli pektyn, jako pożywki dla patogena i wnioskowanie na tej podstawie o odporności) a także, aby we wnioskowaniu lub interpretacji unikać bardzo odległych skojarzeń (np. kwasy wielonienasycone, jako elicytory w nasionach Inu i w ziemniaku, p.125).

Uwagi powyższe nie pomniejszają wartości recenzowanej dysertacji.

Podsumowanie

Wszystkie części dysertacji są poprawnie przygotowane i zredagowane. Część eksperymentalna została zaprojektowana tak, aby zebrane wyniki pozwoliły odpowiedzieć na postawione we wstępie pytania. Wyniki uzyskane przez doktoranta wzbogacają naszą wiedzę z biotechnologii roślin a część z nich już została opublikowana w roku 2014 w czasopiśmie *Biotechnology Progress*, vol. 50.

Uzyskane wyniki oraz przedstawiona dysertacja spełniają wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i uzasadniają nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dziedzinie biotechnologia.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Ahmeda Zeitoun do dalszych części przewodu doktorskiego.

Radzików 12.06.2015.


Prof. dr hab. Waclaw Orczyk