

Dr hab. Adriana Szmidt-Jaworska prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
ul. Lwowska 1
87-100 Torun
Tel. (56) 61 14 456
e-mail: asjawors@umk.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Kostyna
pt. „Indukcja alternatywnej drogi metabolizmu tyrozyny w ziemniaku przez
wprowadzenie genu hydroksylazy tyrozyny ze szczura laboratoryjnego (*Rattus
norvegicus*)**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Kamila Kostyna została wykonana w Zakładzie Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego.

Rozprawa została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie i oprócz bardzo szczegółowego Spisu treści, Wykazu stosowanych skrótów, Spisu rycin oraz Tabel zawiera obszerny i bardzo interesujący Wstęp teoretyczny, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Literaturę oraz Materiały uzupełniające. Na początku pracy znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca liczy 145 stron, 64 ryciny, 4 tabele oraz 218 pozycji w spisie piśmiennictwa. Układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analizy wyników zostały zrealizowane przez doktoranta w sposób prawidłowy.

Katecholaminy to biogenne monoaminy aromatyczne, zidentyfikowane i dokładnie opisane w komórkach zwierzęcych, w których pełnią funkcję neuroprzekaźników w układzie nerwowym i hormonów regulujących wiele procesów fizjologicznych, w tym gospodarkę cukrową. W ubiegłych latach opisano także występowanie katecholamin w komórkach roślinnych, lecz ich funkcja nie została wyjaśniona. Na chwilę obecną wiadomo, że są prekursorami do syntezy alkaloidów i betalain. Ponieważ katecholaminy charakteryzują się dużym potencjałem antyoksydacyjnym postuluje się ich zaangażowanie w odpowiedź roślin na czynniki stresowe.

Powszechność występowania katecholamin i potencjalne znaczenie tej grupy związków dla metabolizmu roślinnego i reakcji stresowych przemawiają za prowadzeniem badań w tej tematyce.

Nadrzędny cel badań niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczył zbadania alternatywnego szlaku syntezy katecholamin w ziemniakach. Doktorant do realizacji założonego celu wykorzystał metody inżynierii genetycznej, wprowadzając szczurzy gen hydroksylazy tyrozyny do komórek ziemniaka i przeanalizował efekty przeprowadzonej modyfikacji.

Liczący 26 stron Wstęp jest interesującym przeglądem wiedzy na temat katecholamin i roślinnych związków fenolowych. Ponadto Autor scharakteryzował w nim ziemniaka, jako przedmiot swoich badań i główne choroby tej rośliny. Całość została opracowana z uwzględnieniem prac opublikowanych kilka lub kilkanaście lat temu, jak i piśmiennictwa najnowszego, włączając prace opublikowane w 2015 roku.

Cel pracy został wyodrębniony w postaci jednostronicowego rozdziału. Sam cel przeprowadzonych badań został w pierwszej kolejności sformułowany w sposób bardzo ogólny i dotyczył on zbadania szlaku biosyntezy katecholamin w ziemniakach. Następnie został on uszczegółowiony w postaci powiązanych w spójną całość celów cząstkowych: (1) wytworzenie rośliny transgenicznej z wprowadzonym genem szczurzej hydroksylazy tyrozyny i analiza alternatywnej drogi biosyntezy katecholamin z tyrozyny, (2) analizy wpływu zmiany w biosyntezie katecholamin na syntezę i metabolizm związków fenolowych oraz (3) analizy wpływu wprowadzonej zmiany na odporność ziemniaków na wybrane patogeny.

Rozdział Materiały i metody dostarcza informacji o przebiegu eksperymentów. Oddzielnie i szczegółowo omówiono materiały użyte w doświadczeniach oraz opisano wykorzystane techniki badawcze. Po analizie tego rozdziału nasuwa się stwierdzenie, że Doktorant operuje szerokim warształem metodycznym, zarówno w dziedzinie biologii molekularnej, biotechnologii, inżynierii genetycznej, jak i biochemii. Najważniejszą i pracochłonną częścią rozprawy doktorskiej było uzyskanie roślin transgenicznych. To od powodzenia tego etapu zależne były kolejne analizy.

Najwięcej miejsca zajmuje opis i analiza uzyskanych wyników, które zostały udokumentowane w sposób precyzyjny. Na uznanie zasługuje fakt, że większość podrozdziałów zaczyna się od hipotezy, po której następuje analiza uzyskanych wyników. Analizowane dane układają się w logiczną całość.

Interesującą częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział Dyskusja. Jest ona zwięzła i dojrzała, chociaż liczy tylko 10 stron. Napisana jest w sposób jasny i logiczny, a uzyskane wyniki doktorant skonfrontował z danymi uzyskanymi przez innych badaczy.

Po tym dziale następuje podsumowanie głównych osiągnięć pracy, które jest wypunktowaniem poczynionych obserwacji.

W pracy brakuje rozdziału wnioski. Mogłam się ich doszukać w streszczeniu, dyskusji oraz punkcie 7 podsumowania. Jednakże, to wyciągnięcie wniosków jest ukoronowaniem dzieła, a w tej pracy tego zabrakło.

Na początku dysertacji doktorant umieścił streszczenie pracy. Zazwyczaj pisanie krótkich podsumowań jest niezwykle trudne, gdyż wiąże się z koniecznością wyboru najważniejszych informacji. Z tym punktem mgr Kostyn poradził sobie znakomicie. Co jest warte podkreślenia, w końcowych zdaniach pojawiły się nowe pytania i sugestie o możliwych kierunkach dalszych badań.

Podsumowując należy stwierdzić, że wykonane badania oraz uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę o roślinnym szlaku syntezy katecholamin. Do najważniejszych osiągnięć naukowych doktoranta można zaliczyć: (1) uwieńczone powodzeniem otrzymanie transgenicznego ziemniaka z wprowadzonym genem szczurzej hydroksylazy tyrozyny, (2) analizę wpływu infekcji na uruchomienie mechanizmu obronnego w liniach transgenicznych ziemniaka, które wykazywały zwiększoną odporność na infekcję *Phytophthora infestans* i *Dickeya sp.*, (3) analizę poziomu katecholamin w otrzymanych liniach transgenicznych i stwierdzenie, że w roślinach tych dochodzi co prawda do wzrostu zawartości L-DOPY, lecz jednocześnie spada poziom wolnych katecholamin, co prowadzi do stresu oksydacyjnego, a także wzrostu poziomu związków fenolowych, oraz stwierdzenie, że (4) główną drogą biosyntezy katecholamin jest ta przeprowadzana przez dekarboksylazę tyrozyny.

Uwagi krytyczne

1. Analiza doświadczenia nad wpływem egzogennie podanej L-DOPY na poziom nadtlenku wodoru nasunęła mi kilka uwag i pytań: (1) brak opisu tego eksperymentu w materiałach i metodach, (2) w jaki sposób doktorant wyselekcjonował stężenie 0,1 mg/ml stosowane w doświadczeniu, (3) moje wątpliwości budzi także sposób aplikacji, metoda spryskiwania całych roślin nie jest poprawna, gdyż poszczególne organy mogą charakteryzować się różną czułością, a uzyskane uśrednione wyniki ciężko zinterpretować.

2. Podczas wykonywania testu odporności bulw ziemniaka na infekcję mierzono, cytując „masę zgniłej tkanki” (3.2.37.1), brakuje mi informacji jak wykonywano te analizy.
3. Ryciny:
 - należałoby zwrócić większą uwagę na czytelność rycin, część z nich wykonana jest w niskiej rozdzielczości, co przy stosunkowo małych literach utrudnia analizę danych;
 - ponadto pojawiają się niedociągnięcia w przygotowaniu rycin np. brak jednostek na osi Y np. Ryc. 30, 31;
 - podpis pod ryciną 47 i opis w tekście wskazują na wyrażenie potencjału antyoksydacyjnego jako % związanego DPPH, natomiast wartości na osi Y są od 0 do 7.
 - na Ryc. 20 A, wartości rozpoczynają się od 0,8 i brak informacji co oznaczają podane cyfry.
4. W pracy zapis skrótów genów, mutantów, roślin transgenicznych oraz białek w dosyć licznych przypadkach jest błędny, gdyż geny zapisujemy dużymi literami kursywą, mutanty małymi literami i kursywą, a białka dużymi literami bez kursywy.
5. Używanie w całej pracy nazwy potocznej „skórka” w odniesieniu do perydermy będącej tkanką okrywającą bulw ziemniaka i części miękiszu kory budzi moje zastrzeżenia.
6. Również szereg terminów użytych w pracy budzi moją dezaprobatę np. konserwatywne białka (konserwowalne, zachowane w toku ewolucji), pędy nadziemne tworzą krzak (pęd nadziemny), pigment w odniesieniu do barwników roślinnych, oznaczanie stężenia białek z wykorzystaniem odczynnika Bradforda (Bradford, gdyż metodę opracowała kobieta).
7. Podawanie trzech różnych jednostek (bezwzględne, procentowe i krotność) w jednym zdaniu utrudnia interpretację, przykładowo str. 122 „Średni poziom tego związku był wyższy względem kontroli (w której jego wartość wynosiła 664,1 µg/g DW), w linii HTZ8 i HTZ12 – odpowiednio o 46,5% i 157,3%, oraz w linii TD 33 – średni wzrost aż 37,5 krotny względem poziomu zmierzonego w ziemniakach transgenicznych”. Sądzę, że poprawniej byłoby podać wartości dla kontroli, a potem konsekwentnie trzymać się jednostki %.
8. W podrozdział 4.6.2. oraz 4.6.4 nagłówek „Analiza ekspresji wybranych genów związanych z produkcją wolnych rodników...” jest niepoprawny gdyż analizowano poziom transkryptu genów kodujących enzymy odpowiedzialne za proces neutralizacji

RFT. Ponadto w materiałach i metodach, pkt 3.2.16 oznaczanie poziomu transkryptów brak jest informacji kiedy zbierany był materiał, w wynikach na Ryc. 63 jest podana jednostka czasu (h), brakuje tego na Ryc 61.

9. Inne zauważone błędy literowe, gramatyczne i stylistyczne zaznaczyłam w maszynopisie i są one do wglądu.

Ostatnia grupa uwag, a raczej problemów do dyskusji dotyczy kwestii, w których recenzent odczuł pewien niedosyt, a właściwie niezaspokojoną ciekawość:

1. Omawiając rośliny transgeniczne ze zmienionym poziomem katecholamin doktorant wspominał cytując "Aktywność enzymów związanych z przemianami cukrów była zmieniona, co wskazywało na udział katecholamin w aktywacji ścieżki sygnałnej angażującej cAMP". Wzmianka ta warta jest rozwinięcia, zwłaszcza w kontekście istniejących danych wskazujących na udział cyklicznych nukleotydów w aktywacji syntazy chalkonowej.
2. Z czego zdaniem doktoranta mogą wynikać zmiany w fenotypie (większa ilość mniejszych bulw pędowych) i szybsze wejście roślin transgenicznych w fazę wzrostu generatywnego (tworzenie kwiatów)? Jednocześnie szkoda, że doktorant nie pokusił się o zamieszczenie zdjęć obrazujących obserwowane zmiany fenotypowe.
3. Doktorant wykrył zmiany w składzie cukrów w bulwach zmienianka u roślin transgenicznych. Jak można interpretować ten fakt, co wiadomo, lub co można przypuszczać o mechanizmach będących podstawą tych zmian?

Podsumowanie

Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury oraz bogatym i nowoczesnym warsztatem badawczym. Sposób zaplanowania doświadczeń i wykonania świadczy o tym, że autor potrafi rozwiązywać skomplikowane problemy badawcze. Przedstawiona do oceny praca ma nowatorski charakter i stanowi uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy o katecholaminach roślinnych. Wspomniane przeze mnie powyżej krytyczne uwagi nie obniżają oceny całości rozprawy.

W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Kamila Kostyna spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wg Ustawy z dnia 14.03.2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w artykule

13 Ustawy (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późn. zm., nowelizacja Dz. U. 2011 nr 84 poz. 455, Dz. U. 2014, poz. 1198). Ponadto dorobek naukowy Doktoranta uzasadnia Jego starania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Wniosuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie dysertacji i dopuszczenie Pana mgr Kamila Kostyna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Szmidt-Jaworska
dr hab. Adriana Szmidt-Jaworska prof. UMK

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 44 56 (40, 46, 61,76), 56 611 45 90
(1642)