Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOCHEMII GENETYCZNEJ
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 07

bioch.gen@uwr.edu.pl | www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-biochemii-genetycznej

Wrocław 3.09.21

Dr hab. Anna Kulma, prof. UWr.
e-mail: anna.kulma@uwr.edu.pl
tel. + 48 71 375 6326

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Pawła Czerniawskiego pt „Unikalne zmiany w biosyntezie glukozynolanów plemienia Camelineae rodziny Brasisicaeae"

Przestawiona do recenzji praca została wykonana w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Bednarka- promotora przedłożonej rozprawy i dr Anny Piaseckiej – promotora pomocniczego.

Przedmiotem badań jest zbadanie biosyntezy glukozynolanów w gatunkach należących do kladu II plemienia Camelinae, w których obserwowano wcześniej brak syntezy tych związków w celu ustalenia molekularnego podłoża tego defektu metabolicznego. Praca doskonale wpisuje się w tematykę badawczą zakładu. Badania dotyczące glukozynolanów prowadzone są w zespole prof. dr hab. Pawła Bednarka od wielu już lat, a o wysokim poziome badań świadczą liczne publikacje w temacie. Ze względu na duże znaczenie gospodarcze i żywieniowe glukozynolanów podjęcie tej tematyki jest niezwykle istotne. Badania uzyskane w tej pracy mają w tym względzie nie tylko duże znaczenie poznawcze, ale również potencjał aplikacyjny. Oceniana rozprawa została przygotowana na postawie wyników uzyskanych w ramach projektu badawczego OPUS NCN kierowanego przez prof. Bednarka.

Rozprawa doktorska ma formę monografii. Z punktu widzenia formalnego została przygotowana prawidłowo. Praca liczy 141 strony, plus materiały uzupełniające, w których zawarto szczegółowe

informacje na temat spektrometrii masowej identyfikowanych glukozynolanów. Układ pracy jest typowy dla tego typu prac. Rozprawa podzielona jest na cztery główne części- wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusja. Za plus uważam zamieszczenie na końcu pracy oprócz podsumowania również krótkiego rozdziału – wnioski. Dosyć nietypowo zarówno streszczenie jak i abstrakt pracy zamieszczono na końcu pracy, tuż przed bibliografią. Praca jest napisana poprawnym językiem, niekiedy autor nie ustrzegł się drobnych błędów redakcyjnych, nie chciałabym jednak tracić tu czasu i miejsca na ich wymienianie. Głównym problemem edytorskim, utrudniającym czytanie pracy jest to, że bardzo często podpisy pod rycinami znajdują się na następnej stronie. I o ile przy dużych figurach jest to nie do uniknięcia to jest wiele takich przykładów gdzie można by to zmienić. Szczególnie jest to widoczne na stronach 98-103. Trochę brakowało mi też tu spisu tabel i rycin, co zwłaszcza przy dużej ilości prezentowanych wyników ułatwia ponowne odszukanie istotnych informacji.

Wstęp pracy liczy 27 stron i stanowi dobre wprowadzenie do tematu pracy. W pierwszej części autor krótko charakteryzuje metabolity wtórne jak i rośliny z rodziny krzyżowych, szczególnie plemienia Camelineae. Duża część wstępu poświęcona jest charakterystyce glukozynolanów, ich drodze syntezy oraz metodach identyfikacji. Tę część pracy napisano na podstawie dobrze dobranych źródeł literaturowych i uzupełniono o 9 rycin i jedną tabelę.

Cel pracy jest klarownie sformułowany i jasno przedstawia ogólne założenia prowadzonych badań.

Sekcja Materiały metody jest dość starannie przygotowana ale w niektórych przypadkach warto by było rozwinąć opis stosowanych metod. Niezbyt jasny jest dla mnie opis real-time PCR wykorzystywanego do oceny ekspresji genów. Co to znaczy, że w niektórych przypadkach wartości względnej ekspresji były normalizowane „dzieląc każda z nich przez maksymalną wartość dla danego genu w wybranym gatunku". Prosiłabym o wyjaśnienie, co znaczą te „niektóre przypadki" i w jaki sposób były wybierane. W wynikach nie ma później rozróżnienia, co do sposobu przedstawiania danych. Ekspresja podawana jest jako względna do ekspresji aktyny w danej próbie. W jaki sposób próby były natomiast normalizowane? Jak rozumiem do reakcji wykorzystywano identyczną ilość RNA, czy natomiast zostało sprawdzone czy efektywność przepisywania na cDNA była taka sama we wszystkich badanych przypadkach? Jeśli ekspresja aktyny była na różnym poziome w porównywanych próbach ten sposób przeliczania może prowadzić do zaburzonych wyników. Wydajność PCR została przyjęta jako 2, co jest oczywiście

wartością idealną. Czy było sprawdzane czy stosowane startery dają podobną wydajność tak, aby można było porównywać wyniki uzyskane dla różnych genów? Różnice w ekspresji genów prezentowane w pracy są na tyle duże, że niewielkie różnice w efektywności premierów nie powinny zmienić głównych wniosków, prosiłabym jednak o komentarz.

Drugie pytanie dotyczy ekstrakcji i identyfikacji metabolitów metodą LC-MS. Nie jest dla mnie jasne, jakie kroki podjęto w celu oceny powtarzalności prowadzonych analiz. Ile ekstrakcji wykonano dla każdego z analizowanych preparatów? Przypuszczam, że wystarczającą, skoro wyniki opracowano statystycznie, ale taka informacja powinna znaleźć się w pracy. Czy stosowano standard wewnętrzny czy inną metodą umożliwiającą porównanie ze sobą analizowanych prób?

Ponieważ jednym z badanych części rośliny są łuszczynki prosiłabym również o zdefiniowanie, na jakim etapie dojrzałości nasion ten materiał był zbierany. Czy podjęto może próby analizy glukozynolanów oddzielnie w nasionach i okrywach nasiennych? Dane takie byłyby interesujące z praktycznego punktu widzenia, zwłaszcza w przypadku lnianki, która jest gatunkiem uprawnym.

Wyniki stanowią w recenzowanej pracy jej najobszerniejszą część (50 stron). Rezultaty przeprowadzonych analiz przedstawiono na 32 rycinach i w jednej tabeli ze stosownym komentarzem. Ilość wykonanych analiz jest tu imponująca. Duża część pracy opiera się na analizach bioinformatycznych. Zidentyfikowano m.in. ortologi genów związanych z biosyntezą glukozynolanów oraz wybranych czynników transkrypcyjnych z wykorzystaniem baz dostępnych danych oraz przeprowadzono analizy filogenetyczne. Dla kluczowych genów wykonano mapy genomowe, co pozwoliło wykazać zróżnicowanie międzygatunkowe pod względem obecności ortologów badanych genów jak i zróżnicowanie sekwencyjne. Porównawcze analizy genomów zostały przedstawione w odniesieniu do akumulacji glukozynolanów w badanych gatunkach oraz ekspresji genów kluczowych dla syntezy oraz genów regulatorowych.

Pierwsza część pracy dotyczy akumulacji glukozynolanów w analizowanych gatunkach roślin jako gatunek referencyjny stosując rzodkiewnik charakteryzujący się obecnością glukozynolanów we wszystkich organach. Szczególnie cenna jest tu analiza w dojrzałych roślinach w podziale na organy, co pozwoliło na zaobserwowanie organospecyficznej akumulacji tych związków jak również wykazanie wyraźnie zredukowanej różnorodności produkowanych związków w porównaniu do *A. thaliana*. Szczególnie interesująca wydaje się tu być akumulacja

długołańcuchowych glukozynolanów alkilowych w korzeniach badanych gatunków, nie obserwowanych zwykle u pozostałych Brassicaceae. Na uwagę zasługuje za każdym razem próba wyjaśnienia molekularnego uzyskanych wyników. Przykładowo w przypadku obserwacji preferencji do syntezy długołańcuchowych alkiloglukozynolanów porównano zakonserwowanie genów syntaz metyloalkilojabłczanowych (MAM) w badanych gatunkach. Analizy sekwencji genomowych wykazały m.in. obecność dodatkowych genów MAM u lnianki proponując jednocześnie inną klasyfikację genów niż poprzednio proponowana w literaturze.
Podobne analizy wykonano dla genów IGMT kluczowych dla akumulacji glukozynolandów indolowych oraz dla czynników transkrypcyjnych MYB, postulowanych jako kontrolujące syntezę tych metabolitów. Przeprowadzone analizy pozwoliły m.in. wykazać utratę genów MYB34 u *Camelina satica* i *Neslia paniculata* oraz liczne zmiany w sekwencji białkowej ortologów w rodzaju Capsella. Utratę funkcji zweryfikowano transformując mutanty *Arabidpsis* z defektem w badanym genie gdzie mimo obecności transkryptu nie uzyskano rewersji do typu dzikiego, potwierdzając że CrMYB 34 nie koduje białka zdolnego do regulacji syntezy glukozynolanów. Wprowadzenie natomiast funkcjonalnego białka z *A. thaliana* do *C.rubella* spowodowało wzrost produkcji glukozynolanów indolowych we wszystkich badanych organach z wyjątkiem liści, przy czym nie zmieniło to różnorodności produkowanych związków. Wymienione tu przeze mnie wybrane przykłady dobrze oddają systematyczne podejście do badań naukowych mające na celu wyjaśnienie problemu a nie jedynie uzyskanie mało istotnych wyników.

Licząca 14 stron dyskusja jest dobrze napisana i świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w świetle dostępnych danych literaturowych. Doktorant dyskutuje m.in. utratę syntezy glukozynolanów w liściach gatunków kladu II Camelineae w świetle hipotezy optymalnej obrony jak również dyskutuje możliwe przyczyny braku syntezy glukozynolanów w liściach. Doktorant wskazuje również możliwe dalsze kierunki badań mogących pomóc wyjaśnić uzyskane wyniki m.in. analizę funkcji-końcowego regionu białek MYB, badania ortologów MYC czy ustalenie wpływu długości łańcucha glukozynolanów alifatycznych na ich funkcje.

Wyniki przedstawione w doktoracie zostały częściowo opublikowane, praca ukazała się w Phytochemistry w 2021 roku. Szkoda, że taka informacja, jak również dane na temat pozostałej aktywności naukowej doktoranta nie znalazły się w postaci notatki w pracy doktorskiej.

Moje uwagi zawarte w tej recenzji nie umieszczają wysokiej rangi naukowej przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Uzyskane w pracy wyniki w znaczącym stopniu poszerzają wiedzę na temat biosyntezy glukozynolanów oraz ewolucji tego szlaku w gatunkach Brassicaceae w szczególności mechanizmów prowadzących do wstecznej ewolucji szlaków biosyntezy tych metabolitów.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Proszę Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Pawła Czerniawskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę niezwykle szeroki zakres badań przeprowadzonych z użyciem zaawansowanych metod badawczych zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Dr hab. Anna Kulma, prof. UWr.