



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

26 listopada, 2024 r.

Prof. dr hab. Tomasz Pniewski
Zakład Biotechnologii Roślin

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra inż. Przemysława Olejnika pt.
„Poznanie funkcji wybranych białek z rodziny cyklofilin *Lotus japonicus*
z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy”.**

Rozprawa doktorska Pana magistra inż. Przemysława Olejnika została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyny Nuc, prof. UPP, jako promotora i Pani dr inż. Karoliny Jarzyniak jako promotora pomocniczego.

Przedmiotem badań Pana Przemysława Olejnika były cyklofiliny, białka o aktywności izomerazy peptydylo-prolilowej, katalizujące zmianę konfiguracji *trans* w *cis* wiązania peptydowego pomiędzy proliną i poprzedzającym aminokwasem. Cyklofiliny są zatem jednymi z głównych białek uczestniczących w ustalaniu natywnej struktury białek, a tym samym ich aktywności biologicznej, co ma istotne znaczenie dla niemal wszystkich procesów życiowych. Jakkolwiek szczegółowa funkcja cyklofilin pozostaje często nieznaną, dotychczasowy stan wiedzy wskazuje, że u roślin cyklofiliny uczestniczą m. in. w takich procesach jak: organo- i morfogeneza, funkcjonowanie organelli, reakcja na stres oksydacyjny, reakcja na abiotyczne czynniki stresowe jak susza, zasolenie i temperatura, czy oddziaływania z mikroorganizmami, zarówno antagonistycznymi, jak i symbiotycznymi. Przedmiotem zainteresowania Pana Przemysława Olejnika była rola wybranych cyklofilin we wzroście i rozwoju roślin oraz brodawek korzeniowych u gatunku *Lotus japonicus*. Jest to bardzo ważny aspekt pracy, gdyż gatunek ten jest modelem w badaniach nad asymilacją azotu przez bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* w symbiozie z rośliny bobowatymi, procesem o fundamentalnym znaczeniu w przyrodzie i rolnictwie. Należy jednocześnie podkreślić, że głównym podejściem badawczym było zastosowanie edycji genomu przy użyciu metody CRISPR/Cas9, wiodącej obecnie metody ukierunkowanej mutagenyzy i jednej z najważniejszych metod inżynierii genetycznej, chociaż ciągle jeszcze stosunkowo nowej w odniesieniu do biotechnologii roślin.

Rozprawa ma formę monografii w układzie tradycyjnym, obejmującym rozdziały: Streszczenie w jęz. polskim i angielskim, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis literatury zawierający aż prawie 400 pozycji i Załączniki, uzupełnione o spisy tabel i rycin oraz najważniejszych skrótów. Brakuje Hipotezy, jednak w

ocenie recenzenta nie jest ona potrzebna ze względu na „rozpoznawczy” typ pracy, odzwierciedlony w tytule oraz Celu pracy. Stąd także uzyskane wyniki w opinii recenzenta mają charakter wstępny, chociaż nie pozbawiony kompleksowości, jak też przynoszą nowe dane nt. roli cyklofilin u roślin bobowatych i stanowią dobrą podstawę do kontynuacji badań. Sama rozprawa jest napisana w sposób przejrzysty, jakkolwiek pewne aspekty mogą być przedmiotem uwag, co zostanie przedstawione poniżej w odniesieniu do kolejnych części rozprawy.

W początkowych podrozdziałach Wprowadzenia Doktorant przedstawił zwięźle, a jednocześnie szeroko i ciekawie kontekst podjętych badań czyli znaczenie diazotrofii i rolę w niej roślin bobowatych, w tym rodzaju komonica (*Lotus*) i modelowego gatunku *L. japonicus*. W porównaniu do charakterystyki cyklofilin w roślinach, opis nodulacji i funkcjonowania brodawek korzeniowych, jakkolwiek napisany z dużą znajomością tematyki i dający dobry wgląd mniej zorientowanemu czytelnikowi, wydaje się jednak nieco zbyt rozbudowany, gdyż procesy te, aczkolwiek związane z tematyką pracy, nie były głównym przedmiotem badań. Natomiast rola cyklofilin w procesie brodawkowania i asymilacji azotu potraktowana została dość skrótowo, co może jednak wynikać z ograniczonego jeszcze stanu wiedzy w tym zakresie. Oprócz tych ogólnych uwag, należy też wskazać drobniejsze nieścisłości w tej części rozprawy. Między innymi, błędne jest utożsamianie związków azotu ze zredukowanymi formami tego pierwiastka, gdyż w połączeniach z tlenem, w tym w jonach azotanowych, azot jest utleniony (str. 16). Porównując z kolei wydajność wiązania azotu przez mikroorganizmy wolnożyjące i symbiotyczne *Rhizobiaceae*, można było też porównać inne układy symbiotyczne, które w określonych środowiskach grają pierwszoplanową rolę, jak np. paproć wodna azolla z różnymi gatunkami sinic na polach ryżowych czy gatunki olszy z promieniowcami na glebach ubogich, w tym rekultywowanych (str. 17). Dyskusyjne jest też używanie terminu „częstotliwość”, adekwatnego dla faz procesów cyklicznych, zamiast „częstości”, która bardziej obrazuje występowanie jakiegoś zjawiska (w rozprawie dotyczy ono konfiguracji *cis* wiązania peptydowego, str. 49). Podobnie niewłaściwe w odniesieniu do kultur *in vitro* są terminy „hodowla” (str. 22) lub „uprawa” (w rozdziale „Materiał i metody”). Należy jednak dodać, że ww. nieścisłości terminologiczne są powszechnie spotykane. Natomiast trudno zaakceptować termin „korzenie włosowate” (str. 24) w odniesieniu do włosników, podobnie jak pisać o transporcie pęcherzykowym tak, jakby odgrywał rolę we wzroście całych korzeni, podczas gdy dotyczy on wzrostu wierzchołkowego włosników (str. 28).

Odmiernym charakterem cechuje się część Wprowadzenia poświęcona metodom mutagenyzy stosowanym do badania funkcji genów i kodowanych białek. Zarys rozwoju metod mutagenyzy, od indukowanej czynnikami chemicznymi i fizycznymi poprzez mutagenezę insercyjną do kolejno rozwijanych metod ukierunkowanej mutagenyzy, szczególnie CRISPR/Cas9 użytej w pracy, jest jedną z bardziej wartościowych części rozprawy. Świadczy o dużej znajomości tematyki, a można nawet odnieść wrażenie pewnej fascynacji Doktoranta możliwościami edycji genomu. Pomimo zawarcia wielu szczegółów, podrozdział ten jest bardzo przystępnie napisany i wraz z obrazowymi rycinami przygotowanymi przez Doktoranta,

daje dobry wgląd w problematykę. Jediną niejasnością jest stwierdzenie ze str. 44: „Kolejne nukleotydy w pozycjach 21-50 korespondują z sekwencjami crRNA i tracrRNA (...). Nukleotydy te tworzą trzy struktury typu spinki do włosów, formowane przez nukleotydy w pozycjach 52-62 68-81 i 82-96”. Stwierdzenie to jest prawdopodobnie przeoczeniem, gdyż Ryc. 7 prawidłowo przedstawia i wyjaśnia strukturę sgRNA. Poboczną kwestią jest umiejscowienie podrozdziału. Zdaniem recenzenta w kontekście Wprowadzenia jak i całej rozprawy bardziej adekwatne byłoby umieszczenie podrozdziału poświęconego mutagenzie jako ostatniej części Wprowadzenia, gdyż dotyczy głównie metodologii użytej do badań, a w mniejszym stopniu postawionego problemu naukowego.

Cel pracy, ogólny i szczegółowe, są klarownie przedstawione, jakkolwiek również mogą budzić pewne, chociaż nie zasadnicze, wątpliwości. Trudno bowiem oprzeć się wrażeniu, że cel szczegółowy nr 3 odnoszący się do przygotowania konstrukcji genetycznych do wyciszenia wybranych genów cyklofilin z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 został postawiony bądź arbitralnie, bądź raczej *a posteriori* – gdyż z części wynikowej wiadomo, że zaprojektowanie sgRNA okazało się niemożliwe w stosunku do większości zidentyfikowanych genów, w tym *LjCYP71*. Zdaniem recenzenta można było zatem nieco uściślić brzmienie celu ogólnego wskazując na poznanie funkcji wybranych cyklofilin z użyciem metod mutagenazy insercyjnej i CRISPR/Cas9, natomiast cel szczegółowy sformułować np. jako „Zaprojektowanie i przygotowanie konstrukcji genetycznych mających na celu wyciszenie ekspresji za pomocą systemu CRISPR/Cas9 wybranych genów cyklofilin *L. japonicus* zidentyfikowanych metodami analizy bioinformatycznej.”

Metodologia pracy, pomimo że koncentrowała się na zastosowaniu metody CRISPR/Cas9, jest stosunkowo wszechstronna, obejmując analizy bioinformatyczne, w tym projektowanie sgRNA, konstrukcję wektorów, transformację roślin za pomocą *Agrobacterium rhizogenes*, molekularną identyfikację mutantów „edycyjnych”, genotypowanie i fenotypowanie mutantów insercyjnych wraz z analizami mikroskopowymi oraz analizy ekspresji genów na poziomie transkrypcji u obu grup mutantów i analizy statystyczne. Podobnie jak w przypadku poprzednio omawianych części pracy, rozdział „Materiał i metody” jest stosunkowo przejrzyste napisany, dając zarówno wgląd w zastosowane procedury, jak i możliwość ich powtórzenia. Jednocześnie ta część rozprawy nie jest niestety wolna od szeregu niejasności i braków. Pierwsze pytania dotyczą materiałów roślinnych:

- 1) W jakim celu użyta była linia typu WT Miyakojima MG-20? Dla mutantów insercyjnych linią referencyjną WT była linia Gifu. Natomiast jeśli Miyakojima MG-20 była użyta do transformacji za pomocą *A. rhizogenes* i potem jako referencyjna – w żadnym miejscu nie jest to wskazane.
- 2) Jakie jest pochodzenie mutantów insercyjnych *LORE1*? W jaki sposób były otrzymane, czy też na drodze ukierunkowanej mutagenazy? Brakuje też charakterystyki tej mutacji, m.in. wielkości i *loci* insertu w genach poszczególnych cyklofilin – czy w obrębie promotorów, innych sekw. regulatorowych czy sekw. kodujących (w tym przypadku optymalnie byłoby, gdyby *loci* były zaznaczone na zidentyfikowanych genach (Ryc. 11, 12, 15-17), ewentualnie

czy insert był zgodny z ramką odczytu, ale powodował powstawanie wadliwego białka, czy też powodował przedwczesną terminację translacji.

Inne niejasności lub nieprawidłowości nie mają istotnego znaczenia, ale utrudniają orientację w pracy, m. in.

- 3) Opis stosowania oligonukleotydów (str. 57) oraz później przygotowania stocków glicerolowych bakterii (str. 75). Jakkolwiek powinny być stosowane polskie odpowiedniki lub spolszczone nazwy, wydaje się, że z braku dobrego odpowiednika i dla uniknięcia niejednoznaczności lepiej stosować anglojęzyczną nazwę „stock”.
- 4) Tab. 3 – w przypadku oligonukleotydów zastosowanych w celu wykluczenia zanieczyszczenia gDNA przez DNA plazmidu, można uściślić że chodzi o wektor użyty do transformacji za pomocą *A. rhizogenes*;
- 5) Tab. 4 – dopisanie do nazw linii mutantów właściwych nazw genów z insercjami *LORE1*, jak też w podobnie w części wynikowej – Tab. 56 i Ryc. 20-26, znacznie ułatwiłoby odbiór treści pracy;
- 6) Tab. 5 – brakuje oligonukleotydów do analizy transkrypcji genu *LjCYP71*, która była analizowana (por. Wyniki), jak też nie ma dokładnej nazwy lub identyfikatora z GenBank dla genu ubikwityny;
- 7) Tab. 12 i 13 – brakuje referencji dla pożywek, nawet jeśli użyte pożywki są powszechnie znane, to referencje powinny być podane. W przypadku MS×0,5 nazwa może być myląca, gdyż tzw. ½MS jest często stosowana, a w pracy była stosowana pożywka o obniżonej zawartości azotu;
- 8) Podrozdział 3.7.4 – brakuje stężenia X-Gal;
- 9) Podrozdział 3.9.11 Przygotowanie konstrukcji genetycznych:
 - a) referencja dotycząca wyjściowego plazmidu pGEM-T Easy U6sgRNA (Pietrzak 2018) nie jest ujęta w spisie;
 - b) Tab. 34 – skład reakcji OE-PCR jest niezbyt dokładny. Nie można zaprzeczyć, że ostateczny konstrukt z użyciem OE-PCR udało się otrzymać, ale podawanie wyłącznie objętości preparatów składanych fragmentów DNA jest nadmiernym uproszczeniem. Powinny być podane stężenia składanych fragmentów DNA i przeliczone tak, aby ich stosunek molowy (odpowiadający różniące się długości) w reakcji OE-PCR wynosił ≈ 1 ;
 - c) Tab. 37 i 42 – podobnie, powinny być podane stężenia poddawanych ligacji produktu PCR jako insertu i wektora pGEM®-T Easy lub prod. PCR odpowiadającego modyfikowanemu plazmidowi;
 - d) Tab. 40 – brakuje stężenia DNA plazmidu konstrukcji pierwotnej.

Wyniki, obejmujące też Załączniki, są główną częścią pracy. Można w nich wyróżnić trzy zagadnienia, tj. analizę filogenetyczną i bioinformatyczną genów cyklofilin *L. japonicus* wraz z analizą ekspresji na poziomie transkrypcji wybranych natywnych genów, następnie genotypowanie i analizę efektów fenotypowych mutacji insercyjnych w genach *LjCYP18*, *LjCYP56* i *LjCYP71*, a finalnie przygotowanie konstrukcji do edycji genów wybranych

cyklofilin w systemie CRISPR/Cas9, uzyskanie roślin kompozytowych z korzeniami transgenicznymi i identyfikację mutacji indel oraz analizę ekspresji niewyciszonych genów z tej samej podrodziny cyklofilin jedno- lub wielodomenowych i prawdopodobnie tej samej lokalizacji subkomórkowej kodowanych białek. Stąd też, ze względu na zgodność z przebiegiem badań, podrozdział „Projektowanie sekwencji sgRNA” powinien raczej być umiejscowiony po analizie genów cyklofilin i bezpośrednio przed opisem przygotowania konstrukcji do wyciszenia genów na drodze edycji. Recenzent również pozwoli sobie odnieść się do Wyników w tej kolejności.

W pierwszym etapie pracy Doktorant zidentyfikował 14 genów cyklofilin *L. japonicus* korzystając z baz danych NCBI i Kazusa DNA Research Institute. Na podstawie bioinformatycznej analizy sekwencji aminokwasowej skonstruował drzewa filogenetyczne dla cyklofilin jedno- i wielodomenowych, a następnie wyłonił ortologi dla białek *L. japonicus* w innych modelowych gatunkach roślin. Następnie, również na podstawie analizy sekwencji określił prawdopodobną lokalizację subkomórkową cyklofilin *L. japonicus*. Ta część pracy jest przedstawiona jasno, niemniej można postawić następujące kwestie.

- 1) W dalszych etapach badań skoncentrowano się na wybranych cyklofilinach *L. japonicus*, prawdopodobnie na podstawie możliwości zaprojektowania sgRNA i/lub dostępności mutantów insercyjnych *LOREI*. Stąd przedstawione schematy „domenowej” budowy tylko tych i homologicznych cyklofilin. Jednak w dalszych badaniach analizowano również ekspresję cyklofiliny LjCYP68, dla której takiego schematu brakuje.
- 2) Jak można wytłumaczyć pewną niezgodność pomiędzy wynikami analizy filogenetycznej i budowy cyklofilin? Wydaje się, że filogenetycznie bliżej spokrewnione białka (także ze względu na pokrewieństwo gatunków) powinny mieć podobną strukturę domen. Wyniki obu analiz są zbieżne dla cyklofilin jednodomenowych (LjCYP18 i LjCYP25-2) oraz wielodomenowej LjCYP71, ale nie pokrywają się całkowicie dla LjCYP56 i LjCYP92.
- 3) Wyniki analizy narzędziami bioinformatycznymi lokalizacji subkomórkowej cyklofilin jednodomenowych, LjCYP18 i LjCYP25-2, nie wydają się Recenzentowi tak jednoznaczne jak interpretacja przedstawiona w pracy, tj. lokalizacja w cytoplazmie. Tylko w przypadku LjCYP25-2 algorytm TargetP wskazał bezpośrednio lokalizację CT, ale z umiarkowanym prawdopodobieństwem = 0,204. Zarówno dla LjCYP18 i LjCYP25-2 lokalizacja IN (czyli inna niż chloroplasty, mitochondria i ER) wg TargetP i Predotar była stosunkowo wysoka. Jakkolwiek w obu przypadkach prawdopodobieństwo obecności peptydu sygnałowego nie było wysokie, czy nie jest jednak możliwe, że cyklofiliny te są zlokalizowane np. w diktiosomach lub ścianie komórkowej? Tym bardziej, że jako cyklofiliny jednodomenowe o aktywności izomerazy peptydylo-prolilowej mogą mieć charakter bardziej „roboczy”, a obiektem ich działania białka bogate w prolinę i hydroksyprolinę, charakterystyczne dla ściany komórkowej? Ponadto pozostałe, nie badane dalej cyklofiliny jedno- i wielodomenowe były lokalizowane raczej w strukturach błonowych lub chloroplastach/mitochondriach.

4) Być może powyższe pytanie jest nieuprawnione, jednak wynika ono też z tego, że wyniki przedstawione w Tab. 54 wydają się niekompletne. Pomijając jednoznaczne wyniki dla narzędzia NucPred, dla większości białek wyniki wg TargetP i Predotar przedstawione są dla różnych kompartmentów, ale ani razu dla wszystkich. Czy należy rozumieć, że niewskazanie danego kompartmentu oznacza zerowe prawdopodobieństwo wg danego algorytmu? Ponadto, mimo domyślności nazw i oznaczeń, w legendzie tabeli brakuje objaśnienia oznaczenia CH i jednoznacznego określenia lokalizacji subkomórkowej za pomocą narzędzia NucPred. Dla łatwiejszej orientacji, można było też zaznaczyć cyklofiliny wybrane do dalszych badań – analogicznie do Ryc.11-17.

Następnie Doktorant oznaczył poziom ekspresji cyklofilin w poszczególnych organach niemodyfikowanych roślin, wykorzystując różne próby referencyjne. Wg wyników przedstawionych na Ryc. 18, każdą z cyklofilin analizowano oddzielnie, jakkolwiek może to być wrażenie błędne, gdyż w legendzie nie podano rodzaju analizy/testu statystycznego, jak też nie wskazano grup jednorodnych, wyznaczanych przez test post-hoc. Powstaje pytanie czy wyniki nie byłyby bardziej całościowe po przyjęciu jednego organu, np. pędu, jako próby odniesienia dla pozostałych, tym bardziej, że 10-tygodniowe rośliny w momencie analizy miały jednocześnie brodawki i kwiaty. Wraz z wykorzystaniem analizy wieloczynnikowej, pozwoliłoby to jednocześnie porównać względny poziom ekspresji badanych cyklofilin w wielu organach. Mimo tych zastrzeżeń, jak też braku danych nt. wydajności amplifikacji w RT-qPCR dla transkryptu *LjCYP71* (Tab. 55), należy zgodzić się z interpretacją nt. względnego poziomu ekspresji cyklofilin i wskazaniem, że *LjCYP56* jest wysoce specyficzna dla liści, *LjCYP71* w mniejszym stopniu, ale wyraźnie dla korzeni i brodawek, a *LjCYP25-2* ulega wyższej ekspresji w pędach.

W dalszym etapie pracy Doktorant wykonał genotypowanie i fenotypowanie mutantów z insercjami *LORE1* w genach *LjCYP18* i *LjCYP56* (po jednej mutacji) oraz *LjCYP71* (2 różne mutacje). W każdym przypadku wpływ mutacji na wzrost i rozwój roślin, w tym brodawkowanie, był negatywny i najczęściej istotny statystycznie. Jedynie w przypadku grubości kory brodawki obserwowano bądź zwiększenie, bądź zmniejszenie jej grubości w zależności od danej mutacji. Zdaniem recenzenta, nie zmienia to faktu, że obydwa efekty mogły być niekorzystne ze względu na zaburzenie warunków tlenowych w brodawkach, jakkolwiek wpływ ich na wiązanie azotu pozostaje na razie niewyjaśniony i wymagałby dalszych badań. Niemniej, wyniki tej części pracy jednoznacznie potwierdzają kluczowe znaczenie cyklofilin w rozwoju roślin i prawdopodobnie asymilacji azotu. Niezależnie od tego stwierdzenia, lektura tej części rozprawy rodzi kilka uwag i pytań.

1) Stosowanie terminu „heterozygota” w odniesieniu do mutantów insercyjnych, zdaniem recenzenta jest dyskusyjne, gdyż w tym przypadku doszło do włączenia do genomu nowej sekwencji, nie mającej kopii (allelu) w chromosomie homologicznym. Być może właściwsze byłoby użycie zatem terminu „hemizygota”. Sytuacja jest w pewnym stopniu analogiczna jak w przypadku transformantów przed homozygotyzacją, tj. duplikacją kopii transgeny (*de facto* insercji) w tym samym *locus* w obu chromosomach homologicznych.

Uwaga ta jest zasadna, o ile insercje *LORE1* są rozległe – czego bezpośrednio z rozprawy nie wiadomo.

- 2) Niezależnie czy mamy do czynienia z hetero- czy hemizygotami, czy udało się zaobserwować różnice fenotypowe pomiędzy nimi, a mutantami homozygotycznymi?
- 3) Czy poza grubością kory brodawki efekty fenotypowe poszczególnych mutacji insercyjnych były identyczne, tj. nie wykazywały różnic statystycznie istotnych? Nie tak wyraźne jak w odniesieniu do roślin WT, ale widoczne różnice pomiędzy poszczególnymi mutantami (także dla tej samej cyklofiliny) są widoczne, np. w średniej dł. korzeni lub liczby brodawek/cm korzenia. Ponadto w legendzie i na wykresach Ryc. 24-26 brakuje wskazania zastosowanego testu statystycznego i grup jednorodnych.
- 4) Nawiązując do wcześniejszej uwagi dot. pochodzenia mutantów i charakterystyki insercji *LORE1* - jeśli ta mutacja hamowała kwitnienie niezależnie od uszkodzonego genu cyklofiliny, jak otrzymano nasiona mutantów, z których uprawiano rośliny do badań?
- 5) W pracy nie przedstawiono analizy ekspresji zmutowanych i pokrewnych genów *LjCYP* na poziomie transkrypcji (co byłoby wskazane do ewentualnej publikacji), ale czy na podstawie cech mutacji (np. miejsca insercji) można określić, czy mutacja *LORE1* całkowicie hamowała transkrypcję danego genu *LjCYP* czy też nie, ale zamiast powstawał niekodujący RNA lub kodujący wadliwe białko?
- 6) Czy mutacja insercyjna w genie danej cyklofiliny wpływała na ekspresję innych cyklofilin aktywnych w danym kompartmentcie, tak jak obserwowano w przypadku mutantów indel?
- 7) Na obu wykresach Ryc.24 oraz Ryc. 25B, C dotyczących efektów fenotypowych mutacji *LORE1*, brakuje jednostek dla osi y (cm, n). Natomiast w przypadku Ryc.26 prawdopodobnie jest pomyłona skala – z mikrografii wynika, że grubość kory brodawki wynosiła kilkanaście do kilkudziesięciu μm . Ponadto bardziej właściwy i informatywny byłby opis brodawek jako „aktywnych” lub „asymilujących” i „starzejących się”. Użyte określenia „brunatne” i „różowe” są żargonowe. Jak już wskazano powyżej, użycie w legendzie wykresów nazw genów z mutacjami insercyjnymi, wraz z nazwą linii, ułatwiłoby percepcję wyników.

W trzeciej części Wyników Doktorant opisał zastosowanie systemu CRISPR/Cas9 do ukierunkowanego zmutowania i tym samym wyciszenia ekspresji wcześniej zidentyfikowanych genów cyklofilin. Zwraca uwagę wieloetapowy i uważny proces projektowania sgRNA do metody CRISPR/Cas9 z zastosowaniem odpowiednich narzędzi bioinformatycznych, tak aby zmaksymalizować specyficzność edycji i uniknąć niepożądanych mutacji indel. Stąd, ostatecznie udało się zaprojektować sgRNA dla 4 z 14 genów *LjCYP*, co przedstawiono w Tab. 52 i 53. Wyniki te można by uzupełnić, np. do przyszłej publikacji, o zaznaczenie na schemacie lub sekwencji danego genu lokalizacji przyłączania odcinka crRNA, regionów PAM i „seed”. Również Tab. 52 dla lepszej percepcji można by uzupełnić o bardziej informatywne określenie poszczególnych etapów selekcji sgRNA jak on-score, off-score itp. Sekwencje kodujące sgRNA swoiste dla poszczególnych genów *LjCYP* wklonowano następnie do wektora dedykowanego do edycji genów pFGC-pcoCas9. Opis tego etapu pracy jest

przejrzysty, ale wydaje się, że „wkradła” się jedna niewielka nieścisłość – tzw. podwojony promotor 35SRNA CaMV jest w rzeczywistości „pojedynczym” promotorem, ale ze zduplikowanym enhancerem.

W wyniku transformacji wektorami zawierającymi sekwencje kodujące poszczególne sgRNA i białko Cas9 przenoszonymi przez *A. rhizogenes* otrzymano rośliny kompozytowe, tj. z transgenicznymi korzeniami. W przypadku genu *LjCYP92* nie stwierdzono zajścia edycji sekwencji, dla pozostałych genów zidentyfikowano za pomocą metody HRM-PCR i sekwencjonowania od 2 do 7 mutacji typu indel, co odpowiada wydajności od 5 do 25%. Zwraca przy tym uwagę staranny dobór kontroli w celu wykluczenia fałszywie pozytywnych wyników. Następnie stwierdzono, że pod wpływem mutacji w danym genie następowało zwiększenie – z wyjątkiem *LjCYP68*, poziomu ekspresji cyklofilin o podobnej prawdopodobnej lokalizacji subkomórkowej, co Doktorant tłumaczy wystąpieniem mechanizmu kompensacyjnego. Jest to prawdopodobna, jakkolwiek wstępna interpretacja. Potwierdzenie ww. mechanizmu, a przede wszystkim pełniejsza charakterystyka funkcji wybranych cyklofilin, w tym efekt mutacji na asymilację azotu, wymagałyby dalszych badań, w opinii recenzenta najlepiej z wykorzystaniem roślin „edytowanych” w całości transgenicznych, ewentualnie roślin kompozytowych uprawianych do czasu zakończenia cyklu życiowego. Niezależnie od ewentualnych dalszych badań, otrzymane w tej części pracy wyniki na obecnym etapie implikują uwagi i pytania:

- 1) Jak interpretować mutacje 6a i 6b w sekwencji kodującej *LjCYP25-2*? Czy w korzeniach danej linii były jednocześnie obecne obie mutacje w różnych *loci* genu?
- 2) Czy jest możliwe, w przypadku edycji genu *LjCYP18*, że pomimo przedwczesnej terminacji w liniach mutantów 2-5, mogło powstawać przynajmniej częściowo funkcjonalne białko, gdyż mutacje STOP były indukowane pod koniec sekwencji kodującej, a ponadto w obszarze, gdzie wg Ryc. 35, ewentualne zmiany aminokwasów miały mniejszy wpływ na strukturę białka?
- 3) Czy poprawne jest podawanie sekwencji aminokwasowej po kodonie STOP – dot. Ryc. 34.
- 4) Czy poziom ekspresji zmutowanych genów w korzeniach transgenicznych był różny od tego w roślinach WT, niezależnie od funkcjonalności powstających transkryptów jako matrycy w translacji?
- 5) Czy zmiany ekspresji genów, zobrazowane na Ryc. 36, były istotne statystycznie? Wydaje się, że mogło tak być przynajmniej w przypadku genów *LjCYP71* i *LjCYP92* w wyniku mutacji w genie *LjCYP56*. Linii mutantów powstało wprawdzie niewiele, ale liczebność prób można by zwiększyć poprzez powtórzenia techniczne.
- 6) Czy mutacje w genach cyklofilin otrzymane dzięki zastosowaniu metody CRISPR/Cas9 miały wpływ na brodawkowanie? – wg podrozdziału 3.8.3 rośliny kompozytowe inolukowano *M. loti*.

W Dyskusji w zasadzie powtórzone są interpretacje zarysowane w części wynikowej, stąd pytania i uwagi podniesione wcześniej, odnoszą się jednocześnie do Dyskusji. Jednakże w

oparciu o dostępną literaturę Pan Przemysław Olejnik rozwinął szereg wątków, przede wszystkim przedyskutował potencjalne uczestnictwo w różnorodnych procesach rozwojowych badanych cyklofilin, szczególnie wielodomenowych, które mogą oddziaływać z innymi białkami, w tym pełnić funkcje regulacyjne. Nieco brakuje wskazania bardziej skonkretyzowanej funkcji, ale może to wynikać z nieuporządkowanego stanu wiedzy, gdzie z jednej strony wykazywana jest bardzo ogólnie rozumiana rola cyklofilin w rozwoju roślin, a z drugiej funkcje związane np. ze składaniem spliceosomów itp. Niemniej zasadnicze twierdzenia Dyskusji (poza pewnymi uwagami podniesionymi wyżej), ujęte też skrótowo we Wnioskach są uzasadnione. Najbardziej wartościowe zdaniem recenzenta jest wykazanie, że: 1) badane cyklofiliny są niezbędne do prawidłowego rozwoju roślin *L. japonicus*; 2) cyklofilina LjCYP71 jest, spośród badanych, najbardziej istotna dla rozwoju brodawek, zatem pośrednio wiązania azotu oraz 3) supresja ekspresji danej cyklofiliny może być kompensowana przez inne cyklofiliny prawdopodobnie obecne w tym samym przedziale komórkowym. Generalnie jednak wielość funkcji znanych cyklofilin w porównaniu do wymagającego jeszcze potwierdzenia eksperymentalnego lokalizacji subkomórkowej badanych cyklofilin oraz wstępnie określonych efektów supresji ich ekspresji wskazuje, że tematyka poruszona w pracy jest daleka od wyczerpania. Podsumowujący charakter Dyskusji i następnie Wniosków także należy tłumaczyć rozpoznawczym czy bazowym rodzajem pracy, co wskazano już wcześniej. Natomiast wyraźnie zabrakło w Dyskusji zarysowania dalszych kierunków badawczych. Warto byłoby poznać zdanie Doktoranta w tej kwestii, podobnie jak odniesienie się do pozostałych, wskazanych powyżej.

Warto również po raz kolejny podkreślić efektywne wykorzystanie systemu CRISPR/Cas9 do edycji genów roślinnych i adaptacji lub opracowania powiązanych narzędzi badawczych przydatnych w kolejnych projektach. Recenzent pozwoli sobie jednak zauważyć, w opozycji do niektórych twierdzeń w Dyskusji, że system CRISPR/Cas9, nie jest pozbawiony ograniczeń. Jest efektywny w odniesieniu do organizmów diploidalnych, ale jego efekty są często niezauważalne w przypadku roślin poliploidalnych, do których należy wiele gatunków i odmian uprawnych. Z kolei specyficzność RNAi może również zależeć od długości antysensowej sekwencji – najczęściej im dłuższa tym bardziej specyficzna. Do szybkiego badania funkcji genów CRISPR/Cas9 wydaje się dedykowana, ale do celów stabilnej i kilkupokoleniowej supresji genów technologia RNAi może być równie albo nawet bardziej przydatna. Przy czym niecałkowita supresja z praktycznego punktu widzenia może być korzystniejsza.

Obowiązkiem recenzenta jest również ocena stylu rozprawy. Należy podkreślić, że pomijając wyżej wskazane przeoczenia lub nieścisłości merytoryczne, praca jest napisana dobrym, komunikatywnym językiem. Należy też podkreślić niemal całkowity brak żargonu laboratoryjnego. Ten pozytywny obraz dopełniają staranne i informatywne (pomimo paru uwag wskazanych powyżej) ryciny, zarówno obrazujące wyniki jak i ilustrujące stan wiedzy, np. we Wprowadzeniu. Jednakże są też pewne niedociągnięcia. W pewnych miejscach rozprawy

zdarzają się niepotrzebne powtórzenia, np. opis uprawy mutantów insercyjnych czy transformacji za pomocą *A. rhizogenes* jest powtórzony w części wynikowej, a powinien być tylko w metodologicznej. Wydaje się też, że opis metod powinien być w całości napisany w jednym trybie czasu przeszłego – bardziej adekwatny byłby czas niedokonany. Wydaje się, że niekiedy można by też zrezygnować z cytowania wielu referencji, ograniczając się do najnowszych lub najistotniejszych. Największym jednak mankamentem dotyczącym strony edytorskiej rozprawy jest znaczna liczba (ok. 150 – zatem na szczegółowe wyliczanie nie ma miejsca) błędów literowych i interpunkcyjnych, niekiedy też gramatycznych oraz nieuważnego stosowania kursywy, rozwinięć skrótów itp. Niekiedy błędy literowe powodują małe zamieszanie – np. na str. 17 jest „1 Tg = 109 kg zamiast 10⁹ kg”, na str. 31 – jest „mikrosymbiont” zamiast „makrosymbiont”, „5 ml Rnazy A” - zamiast µl na str. 81 itp. Oczywiście te pomniejsze błędy mogą być wyłapano przez czytelnika i nie mają większego znaczenia dla merytorycznej treści, ale obniżają odbiór rozprawy.

Podsumowując, Pan Przemysław Olejnik przeprowadził wszechstronne badania, poczynając od analizy bioinformatycznej, poprzez projektowanie i konstrukcję wektorów, a następnie transformację za pomocą *A. rhizogenes* i otrzymanie roślin kompozytowych, identyfikację mutacji i analizy ekspresji wybranych genów cyklofilin w korzeniach tych roślin oraz analizy molekularne, fenotypowe i mikroskopowe wcześniej otrzymanych mutantów insercyjnych, po wstępną interpretację roli i funkcji wyselekcjonowanych genów cyklofilin. W ocenie recenzenta zwraca uwagę opanowanie szerokiego zestawu narzędzi bioinformatycznych przez Doktoranta, a także opracowanie narzędzi badawczych opartych o nowoczesną metodologię CRISPR/Cas9, które mogą być zastosowane w kolejnych projektach. Wyniki otrzymane przez Pana Przemysława Olejnika dotyczą dotychczas słabo poznanego obszaru i niewątpliwie poszerzają wiedzę nt. roli cyklofilin w rozwoju roślin bobowatych, szczególnie w procesie brodawkowania i symbiotycznego wiązania azotu. Ponadto po pewnym uzupełnieniu mogą być opublikowane, jak też stanowią solidną podstawę dalszych badań.

Wniosek końcowy

W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny, rozprawa doktorska Pana magistra inż. Przemysława Olejnika spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Zatem wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dalsze procedowanie przewodu doktorskiego.



Tomasz Pniewski