

Warszawa, 10.09.2015.

Prof. dr hab. Monika Rakoczy-Trojanowska  
SGGW, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

**Recenzja pracy doktorskiej**  
**mgr Konrada Marcina Zielińskiego pt. "Podstawy metodyczne**  
**transformacji ogórka (*Cucumis sativus* L.) wysoko cząsteczkowym DNA"**  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Przybeckiego

Biotechnologia jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się technologii. Rozwój ten wynika nie tylko ze stale rosnących potrzeb w zakresie wytwarzania nowych bioproduktów, doskonalenia i hodowli nowych odmian roślin i ras zwierząt, ale również z możliwości, jakie stwarza współczesna nauka. W biotechnologii roślin bardzo obecnie potrzebnymi i rozwijanymi technikami są transformacja długimi fragmentami DNA, umożliwiająca wprowadzenie do genomu biorcy kilku genów jednocześnie lub całych obszarów regulatorowych oraz edycja genomów pozwalająca na precyzyjne dokonywanie zmian w genomie rośliny, która mimo takich zmian nie jest definiowana jako GMO. Z tych względów podjęcie badań z zakresu transformacji genetycznej i edycji genomu ogórka w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej mgr Konrada Zielińskiego było w pełni uzasadnione.

**Ocena formalna pracy**

Praca liczy 90 stron i składa się z 6 rozdziałów numerowanych: Przegląd literatury, Cel i zakres pracy, Materiały i metody badań, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz 5 rozdziałów nienumerowanych: Streszczenie, Objasnienia i skróty, Wstęp, Bibliografia i

Aneks. Układ pracy jest w zasadzie zgodny z zasadami przyjętymi dla rozpraw doktorskich, a proporcje między poszczególnymi częściami zostały zachowane właściwie. Doktorant postawił dwie hipotezy badawcze. Ich treść można uznać za opowiadającą zakresowi badań, jednak ich forma byłaby lepsza, gdyby zamiast sformułowań „*Jest możliwe skonstruowanie wydajnego i stabilnego systemu do transformacji komórek ogórka*” (w hipotezie 1) i „*Możliwe jest wykorzystanie narzędzi editingu genomowego w komórkach ogórka*” (w hipotezie 2) napisano, odpowiednio: „*Jest możliwe skonstruowanie wydajnego i stabilnego systemu do transformacji genomu ogórka*” i „*Możliwe jest wykorzystanie metody TALENs do editingu genomu ogórka*”. Obecna forma hipotez sugeruje, że obie techniki dotyczą jedynie komórek, a już nie dotyczą np. protoplastów czy mikrospor.

Tytuł pracy nie dokładnie odpowiada jej treści. Mogłoby z niego wynikać, że Doktorant zajmował się tylko transformacją ogórka wysoko cząsteczkowym DNA, a przecież dość istotna i wartościowa część rozprawy dotyczy innego narzędzia do modyfikacji genomu roślinnego o nazwie TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), o czym wspomniano w celu pracy. Tytuł lepiej oddający treści zawarte w pracy mógłby np. brzmieć: „*Podstawy metodyczne transformacji wysoko cząsteczkowym DNA oraz modyfikacji metodą TALENs genomu ogórka (Cucumis sativus L.)*”.

Większość rozdziałów podzielono na podrozdziały, co ułatwia ich lekturę. Struktura całej pracy jest konsekwentna i przejrzysta, a materiał ilustracyjny – na ogół dostatecznie dobrej jakości. Jednak język daleki jest od doskonałości. W pracy znalazłam błędy terminologiczne, które można potraktować jako „potknięcia” językowe ale również jako błędy merytoryczne (np. „*wprowadzanie ..... całych szlaków metabolicznych z dowolnego organizmu*” – str. 69; „*hodowla transformowanych komórek*” – str.23; „*...pobierano jedną kolonię z hodowli na pożywce stałej ... i przenoszono do 1ml hodowli w pożywce ...*” – str.46, użycie słowa ekspozycja zamiast inkubacja - str. 59), a także błędy gramatyczne, ortograficzne i interpunkcyjne. W streszczeniu angielskim też jest wiele błędów gramatycznych (np. „*...it was also used Nicotiana plants tobacum ...*”) oraz niewłaściwie użytych terminów (np. „*As a result of the experience we developed a one-step subcloning system*”, co prawdopodobnie miało oznaczać „*W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano jednoetapowy system subklonowania*”).

Duże fragmenty wyników to powtórzenie metodyki (np. „*Wektor BAC zawierający insert poddawano trawieniu restrykazażą NotI ...*”, „*Kolejnym etapem było strawienie enzymem NotI i zdefosforylowanie wektora BIBAC.*”, „*W celu zoptymalizowania warunków ligacji wykonano kilka reakcji z różnym stosunkiem ilościowym Bins : wektor BIBAC.*”, „*Mieszanie ligacyjną sporządzano przez mieszanie Bins DNA z wektorem i wodą, a następnie podgrzewanie do 55°C i powolne ochładzanie do temperatury pokojowej, po czym dodawano*

bufor i enzym. Reakcje prowadzono przez noc w temperaturze 16 °C. Po tym czasie przeprowadzono odsalanie części (10 µl) mieszaniny ligacyjnej w bloczkach agarowych przez 2,5 h na lodzie i używano do transfekcji dodając po 1 µl na 20 µl komórek bakteryjnych *E coli* DH10B. Wytrząsano przez 30 minut i wysiewano po 100 µl na płytkę z pożywką LB, zawierającą 50 mg/l kanamycyny i 10% sacharozy.” „Transformację prowadzono umieszczając 2 ml tkanki PVC w 50 ml pożywki do kokultury (V ½ MSL 0,15M lub VID1PL ), w której zawieszono bakterie, następnie dodano 200 µM acetosyringonu i utrzymywano w kokulturze przez 3 dni na wytrząsarce w ciemności. Po trzech dniach tkanki przemywano dwukrotnie świeżą pożywką i przenoszono na 2 tygodnie do świeżej pożywki z dodatkiem cefotaksymu 250 mg / l. Selekcję transgenicznej tkanki rozpoczęto po dwóch tygodniach przenosząc agregaty komórkowe do świeżej pożywki zawierającej higromycynę. Pasaż powtarzano, co 2 tygodnie.” – str. 50, 51,56 i wiele innych fragmentów). Podobnie w wielu miejscach Dyskusji zamieszczono tekst, który już znalazł się w poprzednich rozdziałach (np. „Sklonowane w wektorze BIBAC klony BAC (klony BAC-BIBAC) użyte zostały do transfekcji kilku rodzajów eksplantatów ogórka: komórek w kulturze zawieszinowej, 70 skrawków liściowych i liścieniowych żeńskiej linii 2gg i męskiej 859 w kulturze na podłożu stałym.” „Po ligacji całość mieszaniny poddawano odsoleniu i wykonywano transfekcję komórek kompetentnych *E. coli* przy pomocy elektroporacji.” „Po transfekcji wysiewano 100 µl na podłoże LBS zawierające kanamycynę. Inkubowano całą noc. Po inkubacji otrzymano 30 kolonii bakteryjnych. Wszystkie kolonie replikowano na podłoże LBS zawierające kanamycynę i chloramfenikol, w celu określenia które rekombinanty zawierają dwa zligowane ze sobą wektory (kontaminację). Kolonie które nie rosły na tym podłożu zawierały przeklonowany insert do wektora BIBAC. Uzyskane kolonie namnażano i sprawdzano przez izolację z nich DNA oraz trawienie *Not I*. Określano w ten sposób długość subklonowanego insertu. Wybrane kolonie po sprawdzeniu archiwizowano.” – str. 69, 72 i wiele innych fragmentów). Taki zabieg bardzo utrudnia „wyłowienie” informacji istotnych w danym rozdziale i, w szczególności, ocenę jakości dyskusji. Nie można oprzeć się wrażeniu, że poszczególne rozdziały zostały celowo rozbudowane w sztuczny sposób.

Inne, bardziej istotne niedociągnięcia formalne wymieniono poniżej:

1. Fotografie nazywane są rysunkami; poza tym Doktorant w niektórych przypadkach używa skrótu Rys., a w innych całego wyrazu „Rysunek”.
2. Niepotrzebnie pod ilustracjami i zdjęciami w Wynikach umieszczono komentarz, że są to wyniki własne (to jest przecież oczywiste).
3. Na str.74 Doktorant powołuje się na Fot.15, a takiej fotografii w pracy nie ma.
4. Objasnienia skrótów są niekompletne i nieprecyzyjne; np. nie objaśniono nazwy TALENs, która to metoda była przedmiotem badań; natomiast objaśniono skrót innych metod edycji genomu – CRISPR (powinno się podać pełną nazwę CRISPR/Cas9) i ZFN, którymi Doktorant w pracy się nie zajmował, a jedynie opisał je w „Przeglądzie literatury”; GUS jest nazwą zwyczajową, prawidłowa nazwa genu kodującego β-glukuronidazę to *uidA*.

5. Stosowanie skrótów myślowych prowadzących do pozbawionych sensu stwierdzeń, np. „*Infiltracja próżniowa jest łatwiejsza do zastosowania co, przyczynia się do powtarzalności metody*” - str. 74; „*Ukierunkowana mutageneza in vivo ... jest alternatywą dla klasycznej hodowli roślin ...*” – str. 75.

### **Ocena merytoryczna pracy**

Ogórek jest jednym z ważniejszych gatunków warzyw uprawianych na całym świecie. Dzięki wcześniejszym pracom prowadzonym w Katedrze pod kierunkiem profesorów: Bogusława Kubickiego, Katarzyny Niemirowicz-Szczytt, Stefana Malepszego oraz promotora niniejszej pracy – Zbigniewa Przybeckiego wiedza z zakresu genetyki klasycznej i molekularnej ogórka znacznie się poszerzyła, co stanowiło dobrą podstawę do rozpoczęcia badań przez mgr Zielińskiego. Ich pierwotnym celem było opracowanie efektywnej metody transformacji genomu ogórka przez wprowadzenie długich fragmentów DNA. Dodatkowo Doktorant podjął badania metodyczne nad editingiem genomowym TALENs.

W Przeglądzie literatury Doktorant omówił obecny stan wiedzy na temat wybranych metod biotechnologicznych stosowanych w pracy doktorskiej, w tym konstrukcji i eksploracji bibliotek genomowych DNA oraz analizy funkcjonalnej genów z uwzględnieniem ukierunkowanej mutagenezy, trafnie dobierając materiał źródłowy. Zupełnie jednak niepotrzebnie znalazł się tu rozdział „Wizualizacja genów reporterowych”, ponieważ zawarte w nim informacje są powszechnie znane i mają charakter podręcznikowy. Należało przynajmniej ograniczyć się do krótkiego opisu najnowszych metod detekcji ekspresji przejściowej transgenów. Niemniej, rozdział ten dostarcza sporej porcji wiedzy (przytoczono w nim ponad 90 pozycji literaturowych, w większości nowych), jest napisany w sposób dostatecznie wyczerpujący i klarowny.

Zastosowana w pracy metodyka jest adekwatna do specyfiki badań; została przedstawiona dostatecznie szczegółowo, ale tylko w odniesieniu do subklonowania BAC-BIBAC. Metodyka dotycząca TALENs, poza wymienieniem nazwy wektora i miejsca jego pochodzenia, w ogóle nie została opisana (!) W przypadku infiltracji i transformacji – nie wiadomo, ile roślin poddano infiltracji, z ilu nasion uzyskano rośliny do transformacji, ile liści/liścieni transfekowano, czy w ogóle używano eksplantaty liścieniowe, co było powtórzeniem, jaki był układ doświadczalny, co oznacza „liczba doświadczeń” (tab.6) – liczbę płytek, liści, eksplantatów??? Informacja na temat transformacji zawiesziny embriogenicznej pojawia się dopiero w Wynikach.

Większość badań pracy doktorskiej dotyczyła opracowania systemu subklonowania insertów z wektora BAC do wektora BIBAC. Prace te były o tyle uzasadnione, że wektory BIBAC są mało przydatne do utrzymywania bibliotek genomowych, natomiast wysoce przydatne do transformacji dużymi fragmentami DNA. Doktorant opracował wydajny i powtarzalny system subklonowania oraz zoptymalizował warunki transformacji ogórka wysokocząsteczkowym DNA. Muszę przyznać, że skala trudności, z jaką spotkał się Doktorant była duża. Szkoda, że nie udało się doprowadzić do uzyskania roślin transgenicznych. Efekt transformacji można ocenić dopiero na etapie rośliny, a stabilność genetyczną – dopiero w następnym pokoleniu. Analizy molekularne tkanki kalusowej mogą jedynie być pomocne i być traktowane jako pierwszy etap i wstęp do dalszych prac. Trzeba pamiętać o specyfice tkanki kalusowej, przede wszystkim o jej genetycznej niejednorodności. Zdaję sobie sprawę z tego, że czas przeznaczony na wykonanie eksperymentów i napisanie rozprawy doktorskiej jest ograniczony. Można jednak było poczekać jeszcze ok. 2 miesiące (co przy tak dużym przekroczeniu limitów czasowych nie miałoby już większego znaczenia) i przeprowadzić analizy molekularne roślin (mam nadzieję – transgenicznych), tym bardziej, że w przypadku infiltracji Doktorant zaobserwował „*przypadki początków regeneracji roślinek z kalusujących eksplantatów*”

Druga część pracy dotyczy optymalizacji metody edycji genomu z wykorzystaniem systemu TALENs. Można odnieść wrażenie, że ta część rozprawy „ma się nijak” do głównego problemu badawczego, że są to dwie niezależne historie. Nie neguję zasadności tych prac, jednak należało bardzo starannie uzasadnić rozszerzenie zakresu badań, zmienić tytuł rozprawy i w stosowny sposób przeprowadzić dyskusję. Powstaje też pytanie, czy Doktorant dokonał właściwego wyboru metody. TALENs to jedna z metod ukierunkowanej mutagenyzy i edycji genomu. Obecnie metoda ta nieco traci na znaczeniu i jest wypierana przez inną, znacznie bardziej efektywną metodę o nazwie CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 ze względu na jej wysoką wydajność, możliwość jednoczesnej edycji wielu miejsc w genomie i umiarkowaną pracochłonność. Jednak w czasie, kiedy rozpoczęto badania TALENs była jeszcze dominującą metodą edycji; ponadto jest nadal uważana za bardziej specyficzną i mniej obciążoną ryzykiem efektów ubocznych „*off-target*”.

Dość skromne wyniki uzyskane w trakcie realizacji doktoratu można było znacznie lepiej zaprezentować, czemu zwykle służy przeprowadzona w przemyślany sposób dyskusja. Jednak dyskusja w recenzowanej pracy doktorskiej jest pobieżna i dość lakoniczna. Pewnych istotnych problemów nie przedyskutowano w ogóle; np. nieskuteczności transformacji

zawiesiny komórkowej, przyczyn niestabilności insertów w wektorach BIBAC czy zasadności testowania transgeniczności tkanki kalusowej. Nie pokazano rzeczywistego potencjału opracowanych metod. Nie uzasadniono przekonująco, że połączenie w jednej pracy doktorskiej dwóch zupełnie innych technologii było zamierzone i celowe.

Z większością wniosków końcowych mogę się zgodzić. Wyjątek stanowią wniosek 4 oraz wniosek końcowy, które są nieuprawnione i przesadnie optymistyczne. Uzyskanie transgenicznej tkanki kalusowej to jeszcze nie skuteczna transformacja. W świetle uzyskanych wyników nie można też twierdzić, że „skonstruowano wysoko wydajne systemy analizy strukturalnej i funkcjonalnej oraz modyfikacji genomu ogórka ...”, ponieważ ani edytingu TALENs, ani transformacji długimi fragmentami DNA nie można ocenić jako wysoko wydajnych na obecnym etapie badań. Żaden z nich nie jest też przydatny w genomice strukturalnej.

#### Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma wiele mankamentów, w części o charakterze formalnym. Jednak biorąc pod uwagę:

- (1) spore znaczenie opracowanych i zoptymalizowanych metod: jednoetapowej transformacji ogórka długimi fragmentami DNA (z wykorzystaniem szybkiego subklonowania BAC- BIBAC) oraz edycji genomu (TALENs) w szeroko rozumianej biotechnologii ogórka;
- (2) dużą skalę trudności eksperymentów, szczególnie w odniesieniu do pierwszej metody

stwierdzam, że recenzowana praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu o dopuszczenie mgr Konrada Zielińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(prof. dr hab. Monika Rakoczy-Trojanowska)