

Radzików, 16. 09. 2015

Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk
Zakład Genomiki Funkcjonalnej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB
Radzików, 05-870 Błonie

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

Ogórek (*Cucumis sativus* L.) jest w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW od wielu lat jednym z najważniejszych obiektów badawczych. W oparciu o kolekcję bardzo dobrych materiałów hodowlanych i odmian, rozwinięto dla tego gatunku szereg metod biotechnologicznych, włączając w to skonstruowanie biblioteki BAC i sekwencjonowanie genomu. Dzięki temu uzyskano wiele cennych informacji o liczbie i strukturze genów tego gatunku oraz ich przypuszczalnej funkcji. Jednak szczegółową rolę wybranych genów można dopiero zbadać mając do dyspozycji mutanty lub wywołując ukierunkowaną modyfikację genetyczną. Uzyskanie mutacji indukowanej mutagenem jest niespecyficzne, bardzo czasochłonne, czasem niemożliwe i powoduje w genomie wiele innych, niekorzystnych zmian. Rozwój nowoczesnych metod z zakresu biotechnologii umożliwia uzyskanie ukierunkowanych modyfikacji poprzez wprowadzenie określonych sekwencji/regionów do genomu i analizę fenotypu lub wywołanie ukierunkowanej mutacji w określonym miejscu. Jeżeli będą to duże fragmenty DNA to, jak opisuje Doktorant cytując autorów innych prac, istnieje możliwość przeniesienia genów wraz z rejonami regulatorowymi lub kilku naraz związanych z określonym szlakiem metabolicznym i ich analizy.

Celem pracy było „zbudowanie podstaw” do systemu analizy wysokocząsteczkowych fragmentów DNA ogórka poprzez transformację genetyczną oraz przy użyciu innej, nowoczesnej metod analizy funkcjonalnej genów, tak zwanego edytowania genomu. Zakres pracy objął 3 etapy zmierzające do osiągnięcia celu, to jest: subklonowanie wysokocząsteczkowych fragmentów DNA z biblioteki BAC do wektorów BIBAC, wprowadzenie (transformacja genetyczna) tych fragmentów do genomu ogórka, oraz opracowanie podstaw edytowania genomu ogórka z wykorzystaniem technologii TALEN. Warto w tym miejscu jeszcze raz podkreślić, że

zarówno opracowana biblioteka BAC ogórka oraz sekwencjonowanie genomu wykonano w zespole promotora pracy, prof. dr hab. Z. Przybeckiego i naturalną konsekwencją tych badań było wytyczenie dalszego kierunku prezentowanego w niniejszej pracy. W literaturze nie opisano dotąd tego typu badań wykonanych dla ogórka. Są to badania nowatorskie dla badanego gatunku.

Praca doktorska mgr Konrada, Marcina Zielińskiego zachowuje typowy układ: streszczenie po polsku i angielsku, spis treści, objaśnienia i skróty, wstęp, przegląd literatury, cel i zakres, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia i aneks. Całość obejmuje zaledwie 89 stron, w tym 11 stron z 95 pozycjami literatury oraz sekwencjami.

We wstępie Doktorant wprowadza czytelnika do badań realizowanych w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW oraz wskazuje na zalety wprowadzania długich fragmentów DNA do genomu ogórka. Trudno się zgodzić ze stwierdzeniem, że „transformacja roślin długimi fragmentami DNA...pozwoli na analizę funkcji genów poprzez przywracanie ich funkcji”. Czy autor mógłby mi wytłumaczyć, co miał na myśli mówiąc o przywracaniu funkcji?

Przegląd literatury

Przegląd literatury jest podzielony na trzy części nawiązujące do stosowanych materiałów i metod oraz wykonywanej pracy badawczej. W pierwszej części omawiającej biblioteki genomowe Doktorant zwraca uwagę na zalety użycia sztucznego chromosomu bakteryjnego BAC do konstruowania bibliotek długich fragmentów (optymalnie 80 – 180 kbp) genomów roślinnych i zwierzęcych. Następna część jest omówieniem możliwości analizy funkcjonalnej genów z wykorzystaniem transformacji genetycznej ogórka i ukierunkowanej mutagenezy. W trzeciej części Doktorant omawia mechanizmy działania genów reporterowych użytych w pracy. Czy Doktorant mógłby w sposób bardziej czytelny, niż jak to opisał wyjaśnić zdanie: „Analiza funkcjonalna ogórka może być ostatnim lub pierwszym ogniwem procesu izolowania genów w oparciu o mapy” oraz kiedy możemy mówić o przywracaniu funkcji genów lub „usuwaniu funkcji”. Termin „usuwanie funkcji” jest niepoprawny; proszę zaproponować właściwy.(s.13) Wartościowym elementem w przeglądzie literatury jest tabela z zebranymi pracami opisującymi, jak to nazwał Doktorant „udane” transformacje ogórka. Wiadomości w niej zebrane były przydatne w wyborze szczepu i rodzaju eksplantatu do transformacji genetycznej w niniejszej pracy.

Omówienie części dotyczącej plazmidu Ti nie jest zbyt precyzyjne. Gdyby Doktorant zaczął od omówienia szczepów a później plazmidów z nimi związanych, to prawdopodobnie uniknął by nieścisłości. Prosiłabym o dodatkowe informacje jakich szczepów Doktorant używał w pracy i dlaczego napisał, że „W obszarze pTi region T-DNA jest zbudowany z dwuniciowego DNA”? Czy to oznacza, że pozostały obszar pTi jest np. jednociowy?

Omówienie systemów transformacji długimi DNA, zwłaszcza użytego w pracy BIBAC jest dosyć wyczerpujące. Doktorant cytuje również prace, w których dokonano transformacji różnych gatunków długimi fragmentami DNA. Zalety tego rodzaju transformacji są podkreślane w pracy wielokrotnie. Interesujące by było podanie wyników tych prac. Cytowana literatura na ten temat nie należy do najnowszej, więc Doktorant ma możliwość w czasie obrony do uzupełnienia

informacji w oparciu o nowsze pozycje. Omawiając systemy transformacji długim DNA Doktorant wspominał o genie markerowym odporności na kanamycynę. Proszę omówić czy jest to jeden rodzaj genu, czy jest ich więcej i w jakim celu jest/są używane.

W Rozdziale dotyczącym ukierunkowanej mutagenezy omówiono pokrótce możliwości użycia trzech rodzajów nukleaz miejscowo-specyficznych. Jedna z tych technologii została użyta przez Doktoranta. Proszę uzasadnić, dlaczego właśnie ta została wybrana.

Ostatni rozdział przeglądu literatury zawiera informacje na temat dwóch genów reporterowych: *uidA* i *LUC*, których produkt może być łatwo obserwowany w tkankach roślinnych. Doktorant przedstawił mechanizmy prowadzące do wizualizacji produktów tych genów oraz zalety poszczególnych testów.

Materiały i metody badań

Materiały i metody badań opisano na 15 stronach. Doktorant użył w swoich badaniach bardzo zróżnicowane materiały (plazmidy, bakterie, kultury roślinne) oraz metod badań (klonowanie, kultury *in vitro*, transformacja genetyczna w tym metoda infiltracji, wizualizacja genów reporterowych, technika PCR). Szeroki zakres użytych i nie należących do łatwych technik należy uznać za zaletę.

Do drobnych niedociągnięć w tym rozdziale należy: brak wymienienia szczepu LBA 4404 w punkcie „Materiał mikrobiologiczny”. W punkcie „Wektory” nie podano ich źródła poza „pCAMBIA 1300/TALENS”. Na stronach 40/41 niepotrzebnie zamieszczono opis wyników badań. Co dla Doktoranta oznacza kultura muzealna?

Co to jest „zmodyfikowany protokół Maniatis i wsp. (1989)” (str. 44)?

Wyniki

Wyniki opisano w czterech punktach dotyczących: subklonowania insertów z wektora BAC do wektora BIBAC (1), optymalizacji warunków transformacji i transformacji ogórka wysokocząsteczkowym DNA (2, 3), oraz wstępnych wyników na temat edytowania genomowego (4). Punkt 2 i 3 dotyczą odpowiednio optymalizacji warunków transformacji i transformacji jest niepotrzebnie rozbity, ponieważ dotyczy doświadczeń rozwiązujących ten sam problem. W doświadczeniach subklonowania wykorzystano uzyskaną w zespole prof. Z. Przybeckiego bibliotekę wysokocząsteczkowych BAC. Niewątpliwą zaletą tej biblioteki była jej bardzo dobra charakterystyka oparta również o informacje z sekwencjonowania. Subklonowanie jej do wektora BIBAC miało na celu umożliwienie wprowadzania/transformacji tych klonów do genomu ogórka. Napotkane na początku trudności z przeniesieniem wysokocząsteczkowych klonów (subklonowaniem) z wektora BAC do BIBAC ominięto poprzez „opracowanie” jednoetapowej metody szybkiego i precyzyjnego klonowania. Mam wątpliwości co do słowa „opracowanie” tej metody. W literaturze można łatwo znaleźć opis tego typu metod, np. w Engler i in. 2008 (Plos ONE). Proszę odpowiedzieć na ile użyta w doktoracie metoda „one pot, one step” była nowatorska a na ile była adaptacją metody opisanej przez innych? Ani cytowana przez mnie praca ani inne pozycje literatury na ten temat nie były w pracy cytowane i dyskutowane.

Układ doświadczalny w tej części, jak i pozostałych jest bardzo prosty i skromny. W pierwszej części przedstawiono jedynie wyniki optymalizacji warunków ligacji (różny stosunek ilościowy wektorów). Czy opracowanie metody subklonowania polegało tylko na optymalizacji stosunku ilościowego obydwu wektorów (tab.4)? W tej części jest również wiele opisów należących do materiałów i metod. Opisane na str. 49 objętości nic nie mówią o stężeniach; powinno się operować jednostkami.

Wyniki dotyczące optymalizacja warunków transformacji ogórka wysokocząsteczkowym DNA są również opisane zbyt lapidarnie. Doktorant w tabeli 6 zamieszcza 3 wektory, opisując tylko BIBAC2. Skoro tych wyników nie jest za wiele, warto by je było dokładniej opisać. Czego dotyczy liczba doświadczeń w tej tabeli? Czy przeprowadzono np. 20 lub 30 transfekcji ilu liści w ilu roślinach? Pozytywnym wynikiem jest zaobserwowana ekspresja przejściowa genów reporterowych *uidA* i *LUC*. Choć i tu jest wiele niejasności. W opisie Rys. 6B Doktorant mówi o „niebieskich komórkach”. Czy to naprawdę są komórki?; jakie jest powiększenie tego zdjęcia? A jakie były wyniki doświadczeń z tytoniem, który był również użyty w badaniach?

Następnym krokiem było opracowanie systemu transformacji ogórka długimi fragmentami DNA. W zasadzie Doktorant przedstawił tylko jedną procedurę, choć można by było zrobić choćby proste porównanie użycia lub braku acetosyringonu do transformacji, który nie zawsze wpływa pozytywnie na ten proces. Przedstawiono pozytywne wyniki barwienia *uidA* w kulturze zawieszinowej na pożywce selekcyjnej, z której nie udało się zregenerować roślin. Czy Doktorant do tego doświadczenia sam wyprowadzał zawiesinę?

Do transformacji eksplantatów liściowych użyto trzech szczepów *Agrobacterium*: AGL1, LBA 4404, C58, choć tylko dla ostatniego zróżnicowano „czas ekspozycji” na 5, 10 i 15 minut. „Czas ekspozycji” nie jest jednoznacznym określeniem. Czy oznacza ono czas kokultury eksplantatów z bakteriami? W doświadczeniu tym (tabela 7) użyto jedynie po 13 – 23 eksplantaty liści bez żadnych powtórzeń biologicznych. Wynik takiego doświadczenia może być przypadkowy i nie powinno się z niego wyciągać wniosków. Należy jednak przyznać, że liczba regenerujących na pożywce selekcyjnej kalusów jest wysoka i wynik jest obiecujący.

W dalszych eksperymentach ze szczepem C58 testowano transformację eksplantatów liściowych dwóch linii insertami o różnej długości. W tym doświadczeniu jest również wiele niejasności. Nie napisano ile eksplantatów użyto do transformacji, ile powtórzeń, jaki wynik uzyskano, to jest jaki był udział procentowy regenerujących kalusów? Pierwszym pozytywnym wynikiem tego doświadczenia są zdjęcia rosnących na pożywce selekcyjnej kalusów transformowanych fragmentami 40, 80, 110 kbp po 3 miesiącach kultury. Następnym jest pozytywny wynik PCR dla genów selekcyjnych *Hyg* i *NptII*. Niestety tu ponownie muszę wytknąć duży błąd jakim jest brak kontroli negatywnej z DNA kalusa nie poddanego transformacji oraz z próbki H₂O zamiast DNA. Są to bardzo ważne kontrole pokazujące czystość składników oraz przeprowadzonej reakcji PCR. W pracy doświadczalnej kontrole są bardzo istotne a im trudniejszy eksperyment tym ważniejsze kontrole, zarówno pozytywne jak i negatywne. Podobnie nie stosowano kontroli pozytywnej dla kultury *in vitro* z różnych eksplantatów. Czy wiadomo jaka była zdolność regeneracji bez transformacji i selekcji? Najbardziej obiecujące wyniki, to jest regenerujące struktury uzyskano dla infiltracji próżniowej liścieni.

Sprawdzenie możliwości dokonywania modyfikacji z użyciem tzw. edytowania genomu wykonano poprzez kotransformację liści ogórka wektorem BIBAC2 z niefunkcyjnym genem *LUC* i wektorem pCAMBIA z systemem TALENS. Wynik pozytywnej wizualizacji tego genu przedstawiono dwukrotnie, na rys. 18A i na rys. 19. Niepotrzebnie, bo jest to to prawdopodobnie to samo zdarzenie.

Zaletami części eksperymentalnej było użycie genów reporterowych, dzięki którym można było śledzić powstanie produktu wprowadzanego genu, co jest wynikiem przekonującym. Opisane w wynikach eksperymenty nie są liczne, aczkolwiek prawie wszystkie dokumentują pozytywny etap wymagany do osiągnięcia wyniku końcowego. Często podawany skład mieszanin reakcyjnych lub tego typu informacje powinny być zawarte w materiałach i metodach.

Dyskusja

Autor przekonuje, z czym trudno się nie zgodzić, że subklonowanie z BAC do BIBAC było właściwym wyborem, nie tylko z uwagi na konstrukcję biblioteki BAC ale również jej opracowanie i kolinearne ułożenie z sekwencją genomu. W tym wypadku zaadaptowana metoda szybkiego, jednoetapowego klonowania okazała się bardzo przydatna. W tej części brakuje dyskusji z pracami innych autorów na temat.

Analiza trzech różnych szczepów *Agrobacterium* zawierających wektory BIBAC z trzema rodzajami najbardziej przydatnych do transformacji eksplantatów: kultury zwiesinowej, eksplantatów liści i liścieni doprowadziła do uzyskania obiecujących wyników. Doktorant dyskutuje efektywność użytych szczepów do wprowadzania długich fragmentów DNA z dostępną na ten temat literaturą, dotyczącą innych gatunków.

W części dotyczącej edytowania genomowego Doktorant wymienił ponownie trzy używane technologie: palców cynkowych ZNF, TALEN i CRISP/Cas, choć dyskusja na temat użytego systemu jest niewystarczająca. Proszę odpowiedzieć czy te technologie są jednakowo efektywne i dlaczego w niniejszej pracy zastosowano TALEN? Jak następnie udokumentowano, wybór okazał się trafny.

Liczba błędów literowych, interpunkcyjnych, gramatycznych, stylistycznych, frazeologicznych (bulionu LB zamiast pożywki LB, edytngu zamiast edytowania, duża zamiast wysoka, galusowata narośl zamiast ... itp.) jest na tyle duża, że nie sposób o tym nie wspomnieć. Rzutują one bardzo negatywnie na całość pracy. Niedopatrzaniem są również fragmenty wyników w dyskusji, czy też metod w wynikach.

Podsumowując, badania przedstawione w pracy doktorskiej mgr Konrada Marcina Zielińskiego stanowią następny, ważny etap badań zmierzający do szczegółowej analizy funkcji genów ogórka. Całość jest przedstawiona w bardzo zwięzły sposób i odnosi się lub przedstawia najważniejsze etapy związane z badaniami. Zaletami pracy jest umiejętność wykorzystania i dalszego rozwoju przygotowanego w zespole bogatego warsztatu badawczego. Elementami negatywnymi jest bardzo mała liczba doświadczeń zbyt lapidarnie opisanych oraz duża liczba różnego rodzaju błędów. Stąd duża liczba pytań w recenzji, które na etapie obrony powinny

zostać szczegółowo wyjaśnione. Niemniej Doktorant uzyskał obiecujące wyniki, które mogą być wykorzystane do kontynuacji niniejszych badań. Dlatego proponuję pracę przyjąć ze względu na duże znaczenie badań, które choćby w niewielkim stopniu mogą przyczynić się do dalszego rozwoju technik analizy funkcjonalnej genomu ogórka.

Stwierdzam, że praca spełnia minimalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie mgr Konrada Marcina Zielińskiego do dalszych części przewodu doktorskiego.

Anna Nade-Orayfi