



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.
Zakład Ekspresji Genów
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 26.05.2015

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Siwińskiej zatytułowanej „Zmienność naturalna *Arabidopsis thaliana* jako narzędzie w badaniach molekularnych podstaw biosyntezy kumaryn”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Joanny Siwińskiej została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Ewa Łojkowska, a promotorem pomocniczym dr Anna Ihnatowicz. W Zakładzie prowadzi się między innymi badania nad związkami chemicznymi produkowanymi przez rośliny w odpowiedzi na atak patogenów (grzyby, bakterie, wirusy) i wykorzystaniem tego rodzaju związków w ochronie roślin. Oceniana praca doktorska zawiera wyniki badań molekularnych nad podstawami biosyntezy kumaryn, a także nad naturalną zmiennością w obrębie gatunku *Arabidopsis thaliana* pod kątem zawartości kumaryn i identyfikacji istotnych elementów genetycznych związanych z wydajną syntezą tych związków. Praca mgr Joanny Siwińskiej znakomicie wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin.

Kumaryny są dwupierścieniowymi pochodnymi benzo- α -pironu i są syntetyzowane głównie w korzeniach roślin. Mają znaczenie farmakologiczne (antykoagualcyjne, uspakajające i przeciwnowotworowe), kosmetyczne (wartości zapachowe, wzmacniania naczynek limfatycznych i pobudzania przepływu krwi). Należy jednak pamiętać, że niepodstawiona kumaryna jest związkiem toksycznym, który podany doustnie w znaczącej ilości może wywołać marskość wątroby.

Z uwagi na cenne właściwości i zastosowania w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, a także na potencjał aplikacyjny jako środek ochrony roślin uważam, że



badania nad biosyntezą kumaryny i jej podstawami genetycznymi są ze wszech miar zasadne i pożądane.

W pracy doktorskiej zajęto się przede wszystkim kumaryną prostą - skopoletyną i jej pochodną glikozydową – skopoliną (β -D-glukozyd skopoletyny). Punktem wyjścia pracy doktorskiej (częściowo wykonanym już w trakcie realizacji pracy magisterskiej) było przetestowanie 28 ekotypów *A.thaliana* pod kątem zawartości skopoletyny w korzeniach. Okazało się, że istnieje zmienność naturalna w gromadzeniu skopoletyny przez rośliny różnych ekotypów. W wyniku przeprowadzonych badań podzielono ekotypy na te z dużą, średnią i małą zawartością tej kumaryny. Podstawowy, najlepiej poznany od strony genetycznej ekotyp – Columbia 0 (Col-0) charakteryzował się średnim poziomem badanej kumaryny, a ekotyp Estland (Est-1) – najwyższym. Piękną stroną badań prowadzonych na rzodkiewniku jest to, że można było zamówić i sprowadzić populację mapującą interesującej krzyżówki Col-0 x Est-1 w celu identyfikacji genów warunkujących biosyntezę enzymów i czynników odpowiedzialnych za regulację ekspresji tych enzymów. Analizę wykonano na około 150 osobnikach stosując dwa różne podejścia metodyczne w oznaczaniu skopoletyny/skopolicy: tradycyjną, półilościową techniką TLC i czułą i ilościową HPLC, w ramach której w wybranych frakcjach zawierających badane kumaryny potwierdzono obecność skopoletyny za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS).

Ilość zidentyfikowanej skopoletyny przyporządkowano danym genotypowym i markerom mapy genetycznej dla badanej populacji mapującej. W przypadku analiz zawartości skopoletyny metodą TLC zidentyfikowano dwa rejony QTL – jeden na chromosomie 1, a drugi na chromosomie 3. Przy tej okazji chciałabym zapytać dlaczego Autorka analizowała w tym wypadku tylko dane fenotypowe wyników zawartości skopoletyny względem pierwszego powtórzenia populacji mapującej, dysponując przecież jeszcze dwoma powtórzeniami biologicznymi. Dlaczego uznała właśnie to powtórzenie za najbardziej reprezentatywne dla zawartości skopoletyny? W drugim podejściu przeprowadzono analizę danych fenotypowych (zawartości skopoletyny i skopoliny) określonych metodą HPLC. W tym przypadku chciałabym zapytać o figurę



16: Na jakiej podstawie pogrupowano linie pod kątem poziomu akumulacji skopoletyny? Czy rzeczywiście Autorka znalazła (przykładowo) ponad 20 linii, w których uśredniona ilość skopoletyny wynosiła 28,6? A gdzie odchylenia standardowe? Mapowanie wykonano różnymi metodami: jedna z nich (CIM) pozwoliła zidentyfikować pięć regionów QTL na pięciu chromosomach odpowiedzialnych za akumulację skopoletyny i dwóch regionów – za akumulację skopoliny (chromosomy 1 i 5). Ciekawi mnie jaka jest relacja QTL-i z analiz danych TLC do analiz HPLC w przypadku chromosomu pierwszego? Czy może być to ten sam QTL? Drugą metodą (MQM) zidentyfikowano również pięć loci QTL ale na trzech chromosomach (chromosomy 1, 3 i 5) (skopoletyna) i jeden locus QTL dla skopoliny (chromosom 5). W przypadku zastosowania tych samych danych z trzech powtórzeń biologicznych lecz różnych podejść obliczeniowych uzyskano zbliżone dane na temat lokalizacji loci QTL, co uwiarygodnia uzyskane wyniki.

W dalszym etapie pracy wytypowano geny potencjalnie związane z akumulacją skopoletyny i skopoliny. Dla pierwszego podejścia (analiza fenotypowa przy pomocy TLC) wyselekcjonowano 11 genów, a dla drugiego (analiza przy pomocy HPLC) 38 genów. Dla każdego z nich zamówiono mutanty insercyjne T-DNA (w sumie testowano 57 mutantów insercyjnych T-DNA). To ogromna praca, zwłaszcza, że bardzo często prowadzone mutanty albo tymi mutantami nie są, albo są w formie heterozygotycznej, i wreszcie nie tak często jak by się chciało, są i nasiona – mutanty w formie homozygotycznej. Najpierw przeanalizowano mutanty insercyjne genów wytypowanych na podstawie mapowania przy pomocy danych z techniki ilościowej TLC. W zidentyfikowanych mutantach homozygotycznych przeanalizowano zawartość skopoletyny (brak mianowania osi OY na rysunku 27). Niestety, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w akumulacji tego związku. Tutaj mam kolejne pytanie do Doktorantki: mianowicie nie dopatryłam się czy przeprowadziła Pani analizę ekspresji genów – kandydatów z linii insercyjnych T-DNA. Homozygotyczność linii insercyjnych nie mówi nam jeszcze nic na temat ekspresji w teorii uszkodzonego genu. Tak naprawdę jeśli wstawka T-DNA jest w promotorze, 5', 3'UTR-ach lub w intronie – nie jesteśmy w



stanie przewidzieć wpływu insercji na poziom transkrypcji/białka. Może się okazać, że gen ulega nadekspresji, ulega zmniejszonej ekspresji lub nie ulega ekspresji wcale. Bez tych informacji trudno odnieść się do uzyskanych wyników i tych ważnych informacji w pracy zabrakło. Nie wykluczam, że skoro nasiona nie były wprost pozyskane z bazy Nottingham Arabidopsis Stock Centre NASC tylko od prof. Maartena Koorneef'a z Instytutu Maxa Plancka w Kilonii, to że ekspresja badanych genów ze wstawką T-DNA została przebadana – ale tego nie wiadomo po przeczytaniu pracy, a przynajmniej ja się tego nie dopatrzyłam.

Następnie przeanalizowane zostały geny ze wstawką T-DNA wyselekcjonowane po mapowaniu loci QTL przy pomocy zawartości badanych kumarzyn metodą HPLC. Tym razem wyselekcjonowano mutanty z obniżoną zawartością skopoletyny (insert w genie kodującym dioksygenazę zależną od Fe^{+2} i 2OG (*F6'H3*) oraz w genie czynnika transkrypcyjnego z rodziny BHLH). Zidentyfikowano również mutanty zawierające podniesiony poziom skopoletyny w stosunku do dzikiego typu ekotypu Col-O. Niestety brak informacji, czy dane te są statystycznie znaczące.

Przeanalizowano budowę i ekspresję genu *F6'H3* w ekotypach rodzicielskich i stwierdzono, że różni je budowa promotorów mogąca wpłynąć na ekspresję genu. Niestety, różnice ekspresji w badanych ekotypach były nieistotne statystycznie. Przy tej okazji jednak zauważono ciekawy fenomen, mianowicie, że ekspresja genu w obu ekotypach była znacznie niższa gdy hodowano rośliny w glebie w porównaniu gdy hodowano je *in vitro*. Bardzo przekonujące wydaje się być wytłumaczenie tego zjawiska. Otóż korzenie roślin hodowanych *in vitro* są narażone na światło co jest dla nich stresem środowiskowym i mogą produkować kumaryny pochłaniające światło UV w celach ochrony komórek korzenia przed naświetleniem

Ten sam rodzaj doświadczeń wykonano dla genów kandydatów mutantów wyselekcjonowanych w rejonach QTL zidentyfikowanych w trakcie mapowania wyników fenotypowych poprzez HPLC. I znowu wyselekcjonowano szereg mutantów różnych interesujących genów, w których poziom zawartości skopoletyny był obniżony w stosunku do Col-0 lub podwyższony. Niestety znowu brak informacji czy zauważone



różnice są istotne statystycznie. Dalsze analizy badanych genów są w pracy dopiero zapowiedziane. Ciekawi mnie, czy Doktorantka posunęła badania od momentu pisania pracy do momentu obrony pracy?

Abstrahując od uzyskanych już wyników Autorka postanowiła się przyjrzeć ekspresji genów kandydatów w liniach rodzicielskich, które wydają się być zaangażowane w indukcję ekspresji kumaryn w warunkach stresu środowiskowego. Szczególnie zainteresowały ją dwa geny, znane z danych literaturowych, że są związane z syntezą kumaryn: *CYP81D11* kodujący białko należące do rodziny cytochromów 450 i gen kodujący UDP-glukozylotransferazę. Porównując sekwencje kodujące genu *CYP81D11* i genu kodującego UDP-glukozylotransferazę, zidentyfikowano w ekotypach rodzicielskich szereg SNP wywołujących niesynonimiczne podstawienia aminokwasów w kodowanych białkach.

Dla genu kodującego UDP-glukozylotransferazę wykonano przejściową transfekcję do liści tytoniu i stwierdzono istotny statystycznie przyrost ilościowy skopoliny w stosunku do roślin transfekowanych przejściowo pustym wektorem. Świadczy to o zidentyfikowaniu genu rzeczywiście przekształcającego skopoletynę w skopolinę. Czy wykonano podobne doświadczenia dla genu *CYP81D11*? A jeśli nie, to dlaczego zdecydowano się na analizy genu kodującego UDP-transferazę, a nie *CYP81D11*? Istotnym osiągnięciem tej pracy doktorskiej jest identyfikacja genu *At5g53990* kodującego badaną UDP-glukozylotransferazę, gdyż jest to pierwsze doniesienie opisujące funkcję tego genu, a co za tym idzie, nowego członka rodziny UDP-glukozylotransferaz w Arabidopsis. Bardziej szczegółowe badania nad tym białkiem przełożono na przyszłość. Natomiast bardziej skupiono się na analizie funkcjonalnej genu *F6'H3* (dioksygenazie zależnej od Fe^{+2} i 2OG) gdyż zidentyfikowane dotychczas geny dioksygenaz *F6'H1* i *F6'H2* z tej samej rodziny co *F6'H3* są odpowiedzialne za ostatni etap syntezy skopoletyny. Badania filogenetyczne nad różnymi dioksygenazami (48) z Arabidopsis wykazały zachowawczość reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie Fe^{+2} i 2OG natomiast zauważono szereg podstawień niesynonimicznych w centrum wiązania substratu co może świadczyć o innym powinowactwie różnych



enzymów do różnych substratów. Postanowiono określić specyficzność substratową *in vitro* dioksygenazy F6'H3 i parametry reakcji katalizowanej przez ten enzym i najbardziej do niego podobny enzym F6'H4.

Niestety nie udało się zidentyfikować substratów dla F6'H3 natomiast udało się to w przypadku F6'H4, który specyficznie wiązał się do skopoletyny, którą hydroksylował w pozycji C8 dając w efekcie inną kumarynę – fraksetynę. Dlatego enzym ten Autorka postanowiła nazwać hydroksylazą 8-skopoletyny (S8H). Pomimo, że jak rozumiem, gen *S8H* nie został wyselekcjonowany w trakcie badań nad identyfikacją genów kandydatów z wyznaczonych loci QTL, to droga ta pośrednio doprowadziła do odkrycia ważnego dla produkcji kumaryn genu odpowiedzialnego za produkcję fraksetyny. Fraksetyna chelatuje żelazo i badania Autorki wykazały, że aktywność enzymu zależy od stężenia żelaza – przy dużych stężeniach żelazo hamuje aktywność enzymu, a tym samym produkcję chelatującej żelazo fraksetyny. W ładnym doświadczeniu *in vivo* przeprowadzonym w liściach tytoniu transfekowanych plazmidem niosącym enzym produkujący skopoletynę i drugim niosącym gen *SH8* wykazała znaczący przyrost fraksetyny. Wytlumaczenie Autorki dlaczego należy podać równocześnie plazmid niosący gen odpowiedzialny za produkcję skopoletyny jest dla mnie częściowo przekonujące: mianowicie czy Doktorantka nie uważa, że sama transfekcja powinna być wystarczającym stresem, który powinien indukować w roślinach tytoniu syntezę skopoletyny? Bardzo chętnie usłyszę komentarz w tej sprawie w trakcie obrony pracy doktorskiej.

Ostatnia część pracy doktorskiej, moim zdaniem bardzo ciekawa, jest poświęcona badaniom zidentyfikowanych dioksygenaz w procesie kontroli homeostazy jonów żelaza w roślinie. W tym celu przebadano mutanty genów *F6'H1*, *F6'H2*, *F6'H3* i *SH8* pod kątem reagowania na niedobór żelaza zarówno w warunkach gleby zasadowej jak i kwaśnej, różniące się stosunkiem ilościowym jonów żelaza i manganu, a także w warunkach niskiej i kontrolnej temperatury otoczenia. Wykazano różną odpowiedź mutantów zarówno na stężenie żelaza i manganu w glebie, jak i na warunki temperaturowe hodowli. Wykazano, że ekspresja genu *SH8* ulega represji w warunkach



niedoboru manganu, natomiast jest silnie indukowana w pożywce o pH5,9. Podobnie zachowuje się, aczkolwiek ulega ekspresji na niższym poziomie, gen *F6'H1*. Autorka wyciąga na podstawie dokonanych analiz bardzo ciekawy i ważny wniosek, że *F6'H1* jest potencjalnym sensorem niedoboru jonów żelaza, a *SH8* pełni ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy jonów żelaza i manganu u roślin. Bardzo ciekawa jest dyskusja uzyskanych wyników na tle literatury przedmiotu, związana z rolą *SH8* w odpowiedzi na zmieniające się warunki glebowe pod kątem pH i zawartości jonów żelaza i manganu. Jak już podkreśliłam, tę część pracy uważam z poznawczego punktu widzenia za bardzo wartościową i ciekawą.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska nie ma klasycznej struktury tego typu prac – mianowicie wyniki połączone z dyskusją, nie wyodrębniając tych części co ma miejsce zazwyczaj. Jednak ten zabieg jedynie pomógł pracy, a nie zaszkodził, gdyż pozwolił na zredukowanie dyskusji do niezbędnego minimum w częściach wynikowych dotyczących identyfikacji loci QTL związanych z syntezą kumaryn, a pozwolił na rozszerzenie części dyskusji związanej z analizą roli badanych dioksygenaz. Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w obszar badań prowadzonych przez Doktorantkę. Praca jest napisana ładnym językiem, a co najważniejsze, zrozumiale.

Co do meritum dysertacji to moje komentarze umieściłam przy omawianiu poszczególnych wyników pracy i jedynie proszę by Autorka odniosła się do nich w trakcie obrony pracy doktorskiej. Chciałabym jednak podkreślić, że Autorka zastosowała bardzo duży wachlarz technik, począwszy od technik analiz chromatograficznych kumaryn, przez klasyczną genetykę, mapowanie loci QTL, analizy mutantów *Arabidopsis* i tytoniu (w tym wypadku ekspresja przejściowa w liściach) pod kątem syntezy kumaryn do charakterystyki zidentyfikowanych enzymów odpowiedzialnych za syntezę kumaryn i regulacji ich ekspresji w odpowiedzi na zmieniające się warunki glebowe (zawartość jonów żelaza, manganu, różne pH gleby). Takie globalne podejście wymagało współpracy naukowej z innymi ośrodkami, co Autorka wykorzystała w bardzo dobry sposób.



Uważam ponadto, że praca zawiera dużo elementów nowości naukowych, które zresztą jak sprawdziłam w bazie NCBI PubMed, zostały już przynajmniej częściowo opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie BMC Plant Biology.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska całkowicie spełnia warunki stawiane tego typu dysertacjom i zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o nadanie mgr Joannie Siwińskiej stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.


Zofia Szweykowska-Kulińska