



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

dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN
Zakład Mikrobiomiki Roślin
Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, dnia 19 marca 2023 roku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani **mgr Aleksandry Chojnackiej**
pt: "**Charakterystyka genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego**",
wykonanej pod kierunkiem Pani **Prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej – Kulińskiej**
w Zakładzie Ekspresji Genów, Wydziału Biologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Biologii, Pani prof. UAM dr hab. Beaty Messyasz z dnia 13 lutego 2023 roku, w którym to zostałam poproszona zgodnie z § 13 ust. 1 Uchwały nr 133/2020/2021 Senatu Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 28 czerwca 2021 r. dotyczącej określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz uchwałą rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza z dnia 26 listopada 2021 roku, o sporządzenie recenzji rozprawy doktorskiej pt: "**Charakterystyka genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego**", autorstwa Pani mgr Aleksandry Chojnackiej ubiegającej się o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

OCENA FORMALNA

Na przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Aleksandry Chojnackiej, zatytułowaną: „**Charakterystyka genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego**”, składa się 140-stronnicowa monografia o typowym dla prac doktorskich układzie. Praca obejmuje: jedną stronę tytułową; jedną stronę z podziękowaniami; 1 stronę z informacjami o źródłach finansowania badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej; 1 stronę przedstawiającą dorobek naukowy Doktorantki, na który składają się 3 publikacje w renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR (**1.** Grabowska A., Bhat S.S., Smoczyńska A., Bielewicz D., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2020. Regulation of Plant microRNA Biogenesis. Springer Nature Switzerland AG 2020 C. Miguel et al. (eds.), Plant microRNAs, Concepts and Strategies in Plant Sciences. **2.** Grabowska A., Smoczyńska A., Bielewicz D., Pacak A., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2020. Barley microRNAs as metabolic sensors for soil nitrogen availability. Plant Sci 299:110608.

doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110608. 3. Smoczyńska A, Pacak A, Grabowska A, Bielewicz D, Zadworny M, Singh K, Dolata J, Bajczyk M, Nuc P, Kęsy J, Woźniak M, Ratajczak I, Harwood W, Karłowski WM, Jarmołowski A, Szweykowska-Kulińska Z. Excess nitrogen responsive HvMADS27 transcription factor controls barley root architecture by regulating abscisic acid level. *Front Plant Sci.* 2022 Sep 12; 13:950796. doi: 10.3389/fpls.2022.950796.); 2-stronnicowy wykaz skrótów; 1-stronnicowe streszczenie w języku polskim i w języku angielskim; 14-stronnicowe wprowadzenie; 1-stronnicowy cel pracy; 22-stronnicowy opis materiałów użytych do wykonania doświadczeń; 13-stronnicowy opis metod; 40-stronnicowy opis wyników; 11-stronnicowa dyskusja; jedna strona wniosków; 8-stronnicowy aneks sekwencji nukleotydowych pri-miRNA444; 20-stronnicowy spis literatury obejmujący 180 pozycji. W treści pracy Pani Aleksandra Chojnacka zamieściła 43 ryciny i 7 tabel. Całość napisana jest poprawnym pod względem stylistycznym, leksykalnym i gramatycznym językiem. Praca ta stanowi uporządkowane, czytelne i zwarte, ale treściwe opracowanie, właściwe dziełom naukowym. Format jej jest spójny, a zamieszczone ilustracje klarowne, lapidarne i bardzo estetyczne.

Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.).

OCENA MERYTORYCZNA

Przekazana mi do recenzji praca doktorska ma charakter wyraźnie poznawczy. Dotyczy ona niezwykle aktualnej, ale też bardzo trudnej tematyki, jaką jest zrozumienie roli mikroRNA, tutaj mikroRNA444 z rodziny genów *MIR444*, w funkcjonowaniu genomu roślin jednoliściennych. Trudność pracy wynika zarówno ze złożoności samego mechanizmu, a przez to konieczności zastosowania zaawansowanego i nowoczesnego warsztatu metodycznego, ale też wybranego modelu badawczego jakim jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare*) – ważne gospodarczo zboże, o dużym genomie haploidalnym, wielkości ~ 5,3 Gb.

O istocie podjętej problematyki Pani mgr. Aleksandra Chojnacką pisze we Wstępie rozprawy, gdzie przedstawia biogenezę roślinnych mikroRNA, charakteryzuje rodzinę genów *MIR444* i peptydy miPEP kodowane przez geny *MIR*. Doktorantka pisze też o konieczności podjęcia badań zmierzających do poznania sposobu powstawania i funkcji peptydów kodowanych przez geny *MIR*, sposobu w jaki peptydy miPEP wpływają na biogenezę odpowiadających im mikroRNA, czy mechanizmu kierowania pri-miRNA na drogę translacji. Definiuje cel badań jakim jest scharakteryzowanie genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego oraz stawia hipotezę, zgodnie z którą zakłada, że pri-miRNA444 są eksportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie mogą ulegać translacji jak mRNA. Aby osiągnąć wyznaczony cel Doktorantka nakreśla siedem następujących zadań badawczych: charakterystyka struktury genów *MIR444* oraz analiza poziomu ekspresji pri-miRNA444; analiza elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444*; identyfikacja otwartych ramek odczytu (ORF) w pri-miRNA444; analiza zdolności translacyjnej sekwencji kodujących wybrane peptydy z wykorzystaniem techniki profilowania polisomów; nadekspresja PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w komórkach *Escherichia coli* i ich detekcja z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał; charakterystyka roślin transgenicznnych z mutacjami w sekwencjach kodujących peptydy kodowane przez geny *MIR444*; analiza wpływu wybranych PEP444 na akumulację odpowiednich mikroRNA444. W badaniach Pani mgr. Aleksandra Chojnacka wykorzystuje rośliny typu dzikiego oraz rośliny transgeniczne z mutacjami sekwencji kodującej miPEP444c jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) odmiany Golden Promise. **Proszę o bliższą charakterystykę tej odmiany jęczmienia w kontekście parametrów morfo-fizjologicznych, właściwości plonotwórczych i odporności na choroby.** Doktorantka szczegółowo opisuje i przedstawia graficznie wektory do nadekspresji sekwencji kodujących

PEP444a, miPEP444b i PEP444c w komórkach *Escherichia coli*, wektory pIK służące do przygotowania konstruktów umożliwiające edycję sekwencji kodujących analizowane peptydy z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas oraz przedstawia materiały i odczynniki wykorzystywane w prowadzonych analizach. **Pragnę zauważyć, iż skład niektórych wymienionych w pracy roztworów jest identyczny, różni się tylko stężeniem (np. obciążacz do białek SSB, bufor TBE). W takiej sytuacji proponowałaby uproszczenie/zredukowanie opisu.** Pani mgr. Aleksandra Chojnacka w rozdziale 4 szczegółowo opisuje stosowane przez nią metody. **Nie podaje niestety w podrozdziale 4.2 nazwy instrumentu użytego do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz genu referencyjnego, a także metody izolacji plazmidów pIK i ich sekwencjonowania.** W związku z tym, iż każdorazowo Doktorantka wprowadza w treść rozprawy pełną łacińską nazwę gatunkową stosowanych bakterii, **pragnę zwrócić uwagę, iż pełną nazwę łacińską gatunku każdego organizmu zwyczajowo podaje się tylko w momencie pierwszego jej cytowania.** W tej części pracy Pani mgr Aleksandra Chojnacka nie definiuje takich pojęć jak „wstawka o odpowiedniej długości”, „po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii bakterii”, „z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku”, „odpowiednich kolonii niosących pożądaną wstawkę”, „fragmenty żelu podzielono na mniejsze fragmenty”. Warto byłoby również uzupełnić nazwę producenta mleka zastosowanego w analizach Western blot do blokowania membrany. **Na szczególne podkreślenie zasługuje natomiast fakt wykorzystania przez Panią mgr Aleksandrę Chojnacką wielu, bardzo złożonych metodycznie i zaawansowanych technik/narzędzi biologii molekularnej, takich jak: edycja sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9; nadekspresja sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w bakteriiach *Escherichia coli*, przygotowanie bibliotek małych RNA do sekwencjonowania; izolacja i transformacja zarodków jęczmiennych z użyciem *Agrobacterium tumefaciens*.** Ponadto Doktorantka przeprowadziła szereg analiz bioinformatycznych z wykorzystaniem programów: Chromas (Technelysium DNA Sequencing Software), DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd), Fastqc, cutadapt, FASTX toolkit. **Zwracam natomiast uwagę, na brak wskazania w treści rozprawy wersji stosowanego oprogramowania. Proponuję uzupełnić te dane.**

W związku z przeprowadzonymi badaniami Pani mgr. Aleksandra Chojnacka uzyskała szereg bardzo interesujących i oryginalnych wyników, z których przytoczę najbardziej interesujące w mojej opinii. W ramach niniejszej pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandra Chojnacka scharakteryzowała trzy geny *MIR444* (*MIR444a*, *MIR444b*, *MIR444c*). Wykazała, że wszystkie trzy analizowane geny *MIR444* w jęczmieniu charakteryzują się złożoną budową egzonowo-intronową. Udokumentowała, że sekwencja mikroRNA* znajduje się w drugim egzonie, natomiast mikroRNA zlokalizowany jest w egzonie trzecim. Analiza poziomu ekspresji zbiorczej puli pri-miRNA444a/b/c wykazała niewielką (nieistotną statystycznie) akumulację pri-miRNA444a w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu, a także istotny statystycznie wzrost poziomu pri- miRNA444b w korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu. Nie zidentyfikowała natomiast pri-miRNA444c w pędach zarówno w warunkach kontrolnych jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Doktorantka odnotowała, że wynik ten nie odpowiada jednak wynikom analizy głębokiego sekwencjonowania małych RNA, zgodnie z którymi dojrzały mikroRNA444c występuje zarówno w pędach jak i korzeniach jęczmienia. **Proszę w tym miejscu o komentarz, czym mogą być uwarunkowane obserwowane rozbieżności?** W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandra Chojnacka wykazała, że transkrypty genów *MIR444* podlegają procesom alternatywnego splicingu, generując wiele izoform, które podzieliła na funkcjonalne (mikroRNA jest produkowany) i niefunkcjonalne (mikroRNA nie jest produkowany). Zidentyfikowała pięć izoform funkcjonalnych oraz trzy izoformy niefunkcjonalne pri-miRNA444a, cztery izoformy funkcjonalne i jedną niefunkcjonalną pri-miRNA444b oraz jedną funkcjonalną i cztery niefunkcjonalne pri-miRNA444c. Udokumentowała również akumulację niefunkcjonalnej izoformy pri-miRNA444a - izoformy

G w korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu i niefunkcjonalnej izoformy H w pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych. Przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty wykazały także obecność wielu alternatywnych miejsc poliadenylacji (pA). W przypadku pri-miRNA444a i pri-miRNA444b zidentyfikowała je jedynie w ostatnim egzonie, z kolei w pri-miRNA444c obecność alternatywnych pA odnotowała również w pierwszym, drugim i trzecim intronie. Na podstawie analizy elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym wykazała obecność licznych motywów związanych z odpowiedzią rośliny na azot, światło, stres wysokiej temperatury oraz miedź. Dodatkowo u roślin uprawianych w warunkach stresu nadmiaru azotu zaobserwowała skrócenie korzeni i odnotowała wzrost poziomu pri- miRNA444b, przy czym, co ciekawe, odnotowała, że poziom dojrzałego miR444b2 był bardzo niski w warunkach kontrolnych i nie zmienił się w sposób statystycznie istotny w warunkach badanego stresu. Interesującym wynikiem jest też brak detekcji pri-miRNA444c w pędach jęczmienia zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w warunkach stresu nadmiaru azotu, przy czym dane uzyskane z głębokiego sekwencjonowania małych RNA wykazały, że dojrzały mikroRNA444c występuje w korzeniach i pędach jęczmienia, a jego poziom nie zmienia się istotnie pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Zdaniem Doktorantki wynik ten może świadczyć o bardzo szybkim i wydajnym procesie dojrzewania pri-miRNA444c lub o eksporcie miR444c z korzeni do części nadziemnych.

Proszę o komentarz do tego wyniku i sformułowanych sugestii. Pani mgr. Aleksandra Chojnacka udowodniła również, że pri-miRNA444 posiadają w swojej sekwencji otwarte ramki odczytu (ORF). Zidentyfikowała łącznie 8 różnych ORF w rejonie pri-miRNA444a, 11 ORF w obrębie pri-miRNA444b oraz 6 ORF w rejonie pri-miRNA444c i wytypowała do dalszych badań trzy peptydy o długościach 119 (PEP444a), 51 (miPEP444b) oraz 168 (PEP444c) aminokwasów. **Bardzo interesującym w mojej opinii odkryciem było udokumentowanie po raz pierwszy u roślin jednoliściennych - jęczmienia zwyczajnego, że pri-miRNA444 wiąże się z rybosomami.** Zaobserwowała asocjację sekwencji kodujących wyżej wymienione peptydy w poszczególnych organach lub pod wpływem czynnika stresowego. Wykazała, że sekwencja kodująca PEP444a wiąże się w sposób specyficzny z rybosomami w pędach w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem stresu nadmiaru azotu. W przypadku sekwencji kodującej miPEP444b potwierdziła wiązanie głównie w korzeniach w warunkach kontrolnych, i w stresie nadmiaru azotu oraz w pędach w warunkach kontrolnych. Natomiast w przypadku sekwencji kodującej PEP444c udokumentowała wiązanie się z rybosomami głównie w pędach w obu badanych warunkach uprawy oraz w niewielkim stopniu w korzeniach, w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu azotowego. **Wśród wyników, które zasługują na szczególne podkreślenie jest otrzymanie przez Panią mgr Aleksandrę Chojnacką linii transgenicznych jęczmienia z mutacjami w obrębie sekwencji kodujących miPEP444b i/lub PEP444c.** W porównaniu z liniami typu dzikiego, rośliny linii transgenicznych pep444c-332.10, pep444c-336.4 i pep444c-336.6 wykazały zmniejszoną powierzchnię korzeni, a linie pep444c-332.10 oraz pep444c-336.4. zmniejszoną powierzchnię pędów. **Tutaj pojawia się pytanie w jaki sposób można by wyjaśnić wpływ wprowadzonych mutacji w rejonie sekwencji kodującej PEP444c na strukturę korzeni i pędów jęczmienia zwyczajnego.** W oparciu o dane z eksperymentu głębokiego sekwencjonowania małych RNA Doktorantka wykazała ponadto, że poziom mikroRNA444c jest 5-krotnie obniżony w korzeniach roślin transgenicznych linii pep444c-332.10, co sugeruje, że peptyd PEP444c ma istotny wpływ na akumulację mikroRNA444c. Poznanie mechanizmu kierowania pri-miRNA na drogę translacji oraz sposobu w jaki PEP444c wpływa na biogenezę mikroRNA444c stanowi dalsze wyzwanie naukowe. **Jakie należałoby zaplanować badania, by ten problem badawczy rozwiązać?**

Pani mgr. Aleksandra Chojnacka wyniki swojej pracy w sposób bardzo szczegółowy i dojrzały skonfrontowała z najnowszymi danymi literaturowymi w odpowiadającej tematyce. Doktorantka ostatecznie na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników sformułowała 8 następujących wniosków: 1. Geny *MIR444* w jęczmieniu charakteryzują się złożoną strukturą egzonowo- intronową; 2. Promotory genów *MIR444* zawierają liczne elementy regulatorowe związane z odpowiedzią na azot, światło, stres

wysokiej temperatury i na miedź; 3. Pierwotne transkrypty genów *MIR444* zawierają otwarte ramki odczytu (ORFs) i wiążą się z rybosomami; 4. Gen *MIR444a* koduje PEP444a, zlokalizowany w pędach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu; 5. Gen *MIR444c* koduje PEP444c, zidentyfikowany głównie w pędach i korzeniach jęczmienia zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu, ale głównie w pędach w warunkach kontrolnych; 6. Mutacje wprowadzone w rejonie sekwencji kodującej PEP444a mają efekt letalny; 7. Mutacje wprowadzone w obrębie sekwencji kodującej PEP444c wprowadzają przedwczesny kodon stop; 8. Linie transgeniczne pep444c-332.10 ze zmienioną sekwencją aminokwasową PEP444c wykazują obniżony poziom mikroRNA444c w korzeniach. **W ten sposób Pani mgr Aleksandra Chojnacka wykazała znaczący wkład uzyskanych przez nią wyników w rozwój wiedzy w zakresie genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego. Szkoda tylko, że Doktorantka nie naświetliła znaczenia uzyskanych wyników w kontekście jęczmienia zwyczajnego jako ważnego gospodarczo zboża.**

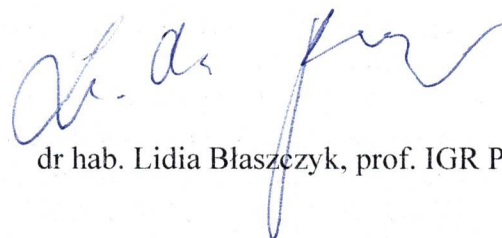
Pragnę natomiast zaznaczyć, że wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze do omawianej rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Chojnackiej wskazują wyłącznie na potrzebę dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, ale przede wszystkim rozwinięcia dyskusji nad niektórymi, bardzo interesującymi w moim odczuciu wątkami pracy. Nie umniejszają natomiast bardzo wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.

PODSUMOWANIE

Uważam, iż podjęta przez Panią mgr Aleksandrę Chojnacką tematyka badawcza jest niezwykle istotna, dotyka ona bowiem kluczowych zagadnień biologii molekularnej związanych z mechanizmami warunkującymi wzrost i rozwój roślin, w tym roślin jednoliściennych, u których podstawy wiedzy na temat genów z rodziny *MIR444* i ich potencjału kodującego są znikome. W związku z powyższym stwierdzam, że niniejsza rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a wymiar uzyskanych wyników jest o tyle znaczący, że dotyczy ważnej ekonomicznie rośliny uprawnej jaką jest jęczmień zwyczajny. Uważam, iż rozprawa doktorska prezentuje też doskonałą wiedzę teoretyczną Pani mgr Aleksandry Chojnackiej w dyscyplinie nauki biologicznej, znajomość najnowszych i wymagających precyzji narzędzi i metod biologii molekularnej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę pracy naukowej. **Stwierdzam zatem, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr. Aleksandry Chojnackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

W związku z tym, iż zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania i jej efekty są nowatorskie, praca prezentuje wyróżniający się poziom merytoryczny i posiada szczególne walory poznawcze, została przygotowana w sposób klarowny, zwięzły i poprawny pod względem językowym i gramatycznym, a wszystkie uzyskane wyniki szczegółowo udokumentowano i starannie opracowano, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Chojnackiej.

Poznań, dnia 19 lutego 2023 r.



dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN