

Gdańsk, dnia 29 marca 2023 r.

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin  
Katedra Biotechnologii  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
ul. Abrahama 8  
80-307 Gdańsk

**Sz. Pani**  
**Prof. UAM dr hab. Beata Messyasz**  
**Dziekan Wydziału Biologii**  
**Uniwersytetu Adama Mickiewicza**  
**ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6**  
**Collegium Biologicum**  
**61-614 Poznań**

Szanowna Pani Profesor,

w załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Chojnackiej zatytułowanej „Charakterystyka genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego”.

Recenzowana przeze mnie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim a zatem wnoszę o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łączę wyrazy szacunku,



Ewa Łojkowska

Gdańsk, dnia 29 marca 2023 r.

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin  
Katedra Biotechnologii  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Chojnackiej  
zatytułowanej „Charakterystyka genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym  
(*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Chojnackiej, została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tekst recenzowanej pracy doktorskiej obejmuje istotne i wymagane części składowe tj. streszczenie w języku polskim i angielskim, spis zastosowanych skrótów, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz spis literatury. Rozprawa zawiera także dobrze sprecyzowany cel pracy, oraz syntetycznie sformułowane wnioski.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi ustawowe, jest dobrym, naukowym językiem, wyniki badań są znakomicie udokumentowane, a całość reprezentuje bardzo nowoczesny kierunek badań polegający na wykorzystaniu najnowszych metod stosowanych w badaniach molekularnych oraz analizach bioinformatycznych do poznania i scharakteryzowania struktury i funkcji fizjologicznej genów z rodziny *MIR444*.

Przedmiotem badań było scharakteryzowanie genów z rodziny *MIR444* obecnych w genomie jęczmienia zwyczajnego oraz określenie ich potencjału jako cząsteczek kodujących peptydy mogące wpływać na regulację biogenezy dojrzałych mikroRNA. Opisywany wcześniej udział mikroRNA444 w regulacji czynników transkrypcyjnych MADS-box, pełniących kluczowe funkcje w wielu procesach biochemicznych, wskazuje na istotną rolę tej rodziny genów we

wzroście i rozwoju roślin jednoliściennych. Wykazany wcześniej udział mikroRNA444 w regulacji szlaków sygnałowych NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Pi i NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oraz w odpowiedzi na infekcje wywołaną przez wirusa pasiastości ryżu sugeruje możliwość wykorzystania tych genów do uzyskania roślin o nowych, ważnych z agronomicznego punktu widzenia cechach; np. uzyskanie roślin odpornych na infekcje wirusowe czy też wykazujących podwyższoną zdolność do pobierania jonów amonowych, azotanowych lub fosforanowych a w efekcie dobrze się rozwijających warunkach niedoboru tych jonów.

W recenzowanej rozprawie doktorantka skupiła się nie tylko scharakteryzowaniu genów z rodziny *MIR444* obecnych w genomie roślin jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) ale także zbadła ich potencjał kodujący oraz zdolność do ulegania translacji. W ostatnim etapie zbadła także wpływ kodowanych przez geny *MIR444* peptydów PEP4444 na wydajność biogenezy i akumulacje dojrzałych mikroRNA444.

Tematyka recenzowanej rozprawy jest konsekwencją zainteresowań zespołu prof. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej dotyczących roli niskocząsteczkowych RNA we wzroście i rozwoju roślin. Wcześniejsze prace tego zespołu dotyczyły między innymi roli mikroRNA w indukowaniu/regulowaniu odporności roślin na stres abiotyczny spowodowany niedoborem wody, i uzyskiwania roślin z podwyższoną odpornością na suszę. Cechą badań prowadzonych w zespole prof. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej jest ich wielokierunkowość i co niezwykle ważne prowadzenie eksperymentów nie tylko na roślinach modelowych ale także na ważnych gospodarczo roślinach uprawnych.

Zamieszczony w rozdziale Wstęp przegląd literatury przedmiotu jest napisany zwięzłym i jasnym językiem i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Omówiono w nim literaturę odnoszącą się do wszystkich aspektów badań podejmowanych w ramach realizowanej rozprawy. W rozdziałach Materiały i Metody w sposób dokładny opisano wszystkie wykorzystywane w badaniach metody i techniki molekularne a także analizy bioinformatyczne. Rozdział Wyniki nie budzi moich zastrzeżeń. Jest starannie przygotowany i zaopatrzonej w dobrą dokumentację graficzną.

Pierwszym etapem pracy była identyfikacja elementów regulatorowych w promotorach genów z rodziny *MIR444*. Doktorantka zidentyfikowała w promotorach genów *MIR444* elementy regulatorowe biorące udział w odpowiedzi na niedobór/nadmiar azotu, stres wysokiej temperatury, światło czy obecność w podłożu miedzi. Ze względu na identyfikację licznych elementów regulatorowych związanych z regulacją metabolizmu azotowego doktorantka

przeanalizowała wpływ stresu nadmiaru azotu na rozwój roślin oraz poziom pri-miRNAa, pri-mRNAb pri-miRNAc oraz odpowiednich mikroRNA 444. Ciekawą obserwacją było stwierdzenie, iż w warunkach stresu nadmiaru azotu pula pri-miRNA istotnie wzrasta w korzeniach a nie ulega zmianie w tkankach pędów.

Analiza struktury 3 genów *MIR444* pozwoliła na stwierdzenie, iż w przypadku wszystkich genów *MIR444*, mikroRNA\* jest zlokalizowany w drugim a mikroRNA w trzecim egzonie a dla utworzenia prawidłowej struktury pri-miRNA spinki do włosów zawierającej mikroRNA/mikroRNA\* i powstania miRNA niezbędne jest wycięcie intronu. Analiza transkryptów genów *MIR444a/b/c* wykazała, iż mogą one podlegać alternatywnemu splicingowi a generowane izoformy mogą być funkcjonalne lub niefunkcjonalne. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w ekspresji badanych transkryptów w warunkach stresu nadmiaru azotu ani w korzeniach ani w pędach. W kolejnym etapie badań doktorantka zidentyfikowała otwarte ramki odczytu (ORF) w pri-miRNA444a/b/c a następnie wybrała peptydy PEP444 do dalszych eksperymentów. Najbardziej interesującym okazał się peptyd PEP444c, którego obecność wykryto w pędach i korzeniach jęczmienia tak w warunkach kontrolnych jak i warunkach stresu nadmiaru azotu.

Doktorantka poza opisanymi powyżej badaniami genów *MIR444*, ich funkcjonalnych i niefunkcjonalnych transkryptów oraz uzyskanych peptydów uzyskała metodą edycji genomu CRISPR/Cas9 rośliny transgeniczne z mutacjami w sekwencjach genów *MIR444* kodujących peptyd PEP444c. Uzyskanie roślin z mutacjami w poszczególnych genach *MIR444* miało pozwolić na poznanie funkcji pełnionych przez kodowane przez geny *MIR444* peptydy. Analizę fenotypową przeprowadzono dla roślin posiadających mutacje w genie *MIR444c*. Rośliny transgeniczne wykazywały zmniejszoną powierzchnię korzeni i pędów, nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w procesie fotosyntezy co zdaniem doktorantki może wskazywać na brak udziału peptydu kodowanego przez *MIR444c* w przemianach energii świetlnej.

Chciałabym zapytać doktorantkę jaka jest jej opinia na temat przydatności metody edycji genomu CRISPR/Cas9 do uzyskania roślin transgenicznych z mutacjami w genach z rodziny *MIR444*. Czy i jaka jest przewaga tej metody nad stosowaną tradycyjnie metodą uzyskiwania roślin transgenicznych z wykorzystaniem transformacji *Agrobacterium tumefaciens* i wprowadzaniem do genomu roślin fragmentu plazmidu Ti?

Doktorantka podjęła także próbę oceny ilości peptydu PEP444c akumulowanego w liniach WT i transgenicznych; odpowiednio PEP444 pełnej i skróconej długości. Niestety zastosowanie

metody Western blot nie pozwoliło na wykrycie różnic w akumulacji peptydów w liniach dzikich i transgenicznym. Jak słusznie zauważyła doktorantka, brak możliwości do zaobserwowania różnic, mógł wynikać z zastosowania przeciwciała, do produkcji którego wykorzystano jedynie 13-aminokwasowy region znajdujący się na karboksylowym końcu peptydu PEP444c. Region ten był bardzo podobny w wyprowadzonych liniach, w efekcie porównanie ilości utworzonego peptydu PEP444c w roślinach transgenicznym było niemożliwe. Mimo, iż określenie poziomu wytwarzanego w roślinach typu dzikiego i liniach transgenicznym peptydu PEP444c nie powiodło się w kolejnym eksperymencie sprawdzono wpływ pełnej i skróconej formy peptydu PEP444 na akumulację mikroRNA444c w korzeniach i pędach jęczmienia. Wykazano statystycznie istotne obniżenie poziomu mikroRNA444c w korzeniach roślin transgenicznym, natomiast w przypadku pędów nie zaobserwowano istotnych różnic.

Dyskusja uzyskanych wyników jest ciekawa i zawiera omówienie uzyskanych wyników w świetle dostępnej literatury. Podkreślono w niej także znaczenie uzyskanych wyników wskazujących na nową rolę pri-miRNA444 w jęczmieniu zwyczajnym. Wykazano bowiem, iż zidentyfikowany przez doktorantkę peptyd PEP444c kodowany przez gen *MIR444c* w sposób istotny wpływa na akumulację mikroRNA444c w korzeniach jęczmienia. Do zbadania pozostaje jednak mechanizm warunkujący translację mikroRNA444c oraz sposób w jaki PEP444c wpływa na biogenezę mikroRNA444c.

Praca jest napisana jasnym i precyzyjnym językiem. Zauważyłam tylko bardzo nieliczne „literówki i nie ściśle sformułowania. W tytule rozprawy powinna być umieszczona pełna nazwa jęczmienia zwyczajnego *Hordeum vulgare* L. (jest *Hordeum vulgare*). W tytule Rys. 40 na str. 97, brzmi ono „Analiza poziomu ekspresji PEP444c” a powinno być „Analiza poziomu (lub ilości) peptydu PEP444 „

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa zawiera cenne wyniki, a ich analiza pozwala na stwierdzenie, że doktorantka osiągnęła założone cele badawcze. Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest dobrym językiem, wyniki badań są dobrze udokumentowane, a całość reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy ukierunkowany na wykorzystanie wiedzy na temat molekularnych czynników warunkujących procesy życiowe roślin do uzyskiwania roślin uprawnych o nowych, korzystnych z punktu widzenia hodowli cechach. Uzyskane wyniki zostaną zapewne opublikowane w postaci artykułu w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Recenzowana rozprawa dobrze dokumentuje opanowany przez Panią magister warsztat naukowy, który umożliwia jej prowadzenie także w przyszłości ważnych badań związanych z

szerokim zastosowaniem metod biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, mikrobiologii fizjologii roślin a także bioinformatyki. Poznane techniki badawcze powinny jej pozwolić na kontynuację pracy zawodowej w szerokim zakresie specjalności.

### Wnioski końcowe

*W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej magister Aleksandry Chojnackiej wnoszę do Rady Wydziału Biologii UAM w Poznaniu o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

W podsumowaniu mojej opinii stwierdzam, iż przedstawione w rozprawie doktorskiej badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą istotne treści do wiedzy na temat roli genów z rodziny MIR444 we wzroście i rozwoju roślin jednoliściennych z gatunku *Hordeum vulgare* L.

Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 poz. 1789), zgodnie z art.179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1669) z późn.zm. i rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych (Dz. U. z 2018 poz. 1818).

