



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255
NIP: 7811621455

E-mail: office@igr.poznan.pl
REGON: 000326204

www.igr.poznan.pl

Poznań, 27 sierpnia 2020

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Anety Więsyk

Tytuł rozprawy: „Analiza porównawcza transkryptomu *Solanum lycopersicum* w przebiegu łagodnej i ostrej infekcji wiroidem wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVs)”.

Praca dotyczy obserwacji zmian w profilach transkrypcyjnych wywołanych przez infekcję roślin pomidora przez wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTV). Choć bardzo często w tematyce oddziaływań pomiędzy rośliną a patogenem badania transkryptomowe stanowią jedynie tło do dalszych, bardziej szczegółowych eksperymentów, to w przypadku prac z wiroidami wybrane podejście eksperymentalne wydaje się być bardzo trafne. Wynika to z faktu, że ten typ patogenu nie posiada własnej „maszyny transkrypcyjnej” i w tym względzie korzysta z zainfekowanego gospodarza. Można więc założyć, że nawet wczesne etapy oddziaływania pomiędzy rośliną a patogenem będą tu w znacznym stopniu odzwierciedlone na poziomie transkrypcyjnym. Obok kanonicznych szlaków, których modyfikacja ma bezpośredni związek z możliwością dalszego postępu choroby bądź reakcją odporności dalszy rozwój infekcji prowadzi do bardzo szerokiego spektrum zmian ekspresji genów gospodarza. Zmiany te są zależne od genotypu wiroida ale także od genotypu zainfekowanej rośliny (Owens et al., 2012). Konsekwencją tego jest to, że pomimo już istniejących prac dotyczących wpływu PSTV na zmiany transkrypcyjne u zainfekowanej rośliny nadal warto jest to zagadnienie badać.

W przedstawionej pracy przeprowadzono analizę zmian ekspresji genów rośliny-gospodarza w następstwie infekcji wiroidem PSTVd-M lub PSTVd-S23, wywołującymi odpowiednio łagodny lub ostry przebieg choroby.

Autorka pracy potwierdziła akumulację wiroidowego RNA w zainfekowanych roślinach a następnie przeprowadziła profilowanie transkryptów z wykorzystaniem metod hybrydacyjnych (mikromacierze) oraz sekwencjonowania. Dla wybranych genów przeprowadzono dodatkową weryfikację metodą nano string. Praca stanowi obszerny opis zmian i niewątpliwie dostarcza informacji, które mogą zostać wykorzystane dla dalszych działań nakierowanych na selekcję roślin o zwiększonym stopniu tolerancji na PSTVd lub dla badań podstawowych dotyczących molekularnych, komórkowych oraz fizjologicznych aspektów oddziaływania między patogenem a rośliną żywicielską.

Ocena rozprawy

Pierwszą część pracy stanowi streszczenie, w którym w sposób zwięzły opisano najważniejsze aspekty zawarte w rozprawie. Niestety rozdział ten kończy się dość niefortunnym sformułowaniem: str. 10 „Potwierdzają hipotezę, że stres wywołany wiroidem prowadzi do przejścia od normalnych procesów wzrostu i rozwoju gospodarza-rośliny do zmienionych ścieżek metabolicznych w reakcjach obronnych”.

Bardzo proszę o rozwinięcie tej myśli, ponieważ w obecnej formie jest ona dla mnie niezrozumiała a być może jest nieuprawniona.

Co ciekawe, wyżej wymienione stwierdzenie nie znalazło się w wersji anglojęzycznej streszczenia.

W kolejnym rozdziale (wstęp, 23 strony) czytelnik zostaje wprowadzony w podstawowe zagadnienia dotyczące klasyfikacji wiroidów oraz ich biologii. Następnie zawarto bardziej szczegółowy opis dotyczący przebiegu infekcji przez PSTVd (sposób namnażania się wiroida, jego transportu oraz zmian wywołanych w roślinie). Rozdział jest stosunkowo dobrze zobrazowany ilustracjami, które dodatkowo zwiększają przystępność przedstawianych zagadnień. Niestety we wstępie nie przedstawiono aktualnego stanu wiedzy odnośnie prac traskryptomicznych na tym samym modelu eksperymentalnym (zmiany transkryptomiczne obserwowane u pomidora w następstwie infekcji PSTVd). W moim mniemaniu przez to praca traci na przystępności i trudno jest uchwycić istotę podjętych badań oraz to na ile są one nowatorskie w stosunku do istniejących prac.

Z ciekawości zapytam również jak wygląda stan badań dotyczący długodystansowego transportu cząstek wiroida przez floem. Wiadomo, że RNA musi być transportowane w kompleksach białkowych, ponieważ w innym wypadku nastąpi degradacja. To pytanie wykracza nieco poza ramy niniejszej pracy ale zastanawiam się, czy w soku floemowym zidentyfikowano białka roślinne wchodzące w kompleksy z RNA wiroidów?

Rozdział - „Cel pracy” ma pewien mankament, ponieważ pomimo jasnego nakreślenia celów poszczególnych badań brak jest założeń pracy. **Proszę o przedstawienie jakie były założenia dla prowadzonych eksperymentów i z czego one wynikały.**

W kolejnym rozdziale opisano materiał biologiczny oraz metody wykorzystane w prowadzonej pracy. Metody opisano szczegółowo, może nawet zbyt wnikliwie (jest to sprawa subiektywna ale wydaje mi się, że nie ma potrzeby opisywania metodyki przygotowania kompetentnych bakterii). Metodą, którą można by opisać nieco dokładniej lub nawet działanie przedstawić w postaci schematu jest Nano String nCounter. Wziąwszy pod uwagę to, że zamieszczono odnośniki do literatury opisującej metodę nie stanowi to większego problem. Dziwnym jest jednak fakt, że dokładnie opisano techniki znajdujące się w podstawowych zbiorach procedur wykorzystywanych w laboratoriach biologii molekularnej, podczas gdy rzadziej spotykana metoda jest opisana bardzo ogólnikowo.

W opisie metodyki analiz transkryptomicznych podano liczbę powtórzeń biologicznych, brak jednak jasnego opisu co stanowiło jedno powtórzenie biologiczne (ile roślin, które liście). Proszę o wyjaśnienie tej kwestii, gdyż rzutuje to na interpretację danych.

Proszę również wyjaśnić czym podyktowany jest dobór czasu pobieranych prób oraz dlaczego do sekwencjonowania wybrano RNA z roślin 17 dni po infekcji oraz odpowiadającej im kontroli?

W kolejnym rozdziale przedstawiono wyniki pracy. Pierwsza część wyników dotycząca charakterystyki zainfekowanych roślin jest zbyt lakoniczna. Dokumentacja fotograficzna objawów pozostawia wiele do życzenia, nekroz nie widać. To być może nie utrudnia bardzo obserwacji różnic dynamiki rozwoju choroby dla infekcji poszczególnymi szczepami wiroida, jednakże lepszy opis zmian morfologicznych w obrębie poszczególnych organów roślin i być może nawet anatomii poszczególnych tkanek mógłby poprawić jakość dyskusji (np. kwestie zmian ekspresji genów zaangażowanych w regulację hormonalną).

W dalszej części pracy przedstawiono analizy dotyczące badań transkryptomycznych. Na początku wytypowano geny ulegające zróżnicowanej ekspresji, po czym rozpoczęto bioinformatyczne analizy funkcjonalne dla wytypowanych transkryptów. Przedstawiony tok analizy funkcjonalnej mikromacierzy jest prawidłowy i typowy dla tego typu badań; przede wszystkim w analizie oparto się o kategorie GO (Stosowanie określenia „termin GO” jest dość karkołomne. Dotychczas w literaturze polskojęzycznej dotyczącej t.zw. Gene Ontology terms spotkałem się jedynie z określeniem „kategorie GO” i jest to chyba bardziej odpowiednie). Kategorie GO pozwalają na klasyfikację według funkcji produktu genu (MF – Molecular Function), procesu biologicznego w jakim może on brać udział (BP – Biological Process), czy też lokalizacji komórkowej produktu genu (CC – Cellular Component). Pokazuje to rycina nr 10. Następnie dokonano analizy funkcjonalnej w oparciu o bazę danych Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). W ten sposób wskazano ścieżki nadreprezentowane. Przeprowadzone analizy wskazują na wyraźną różnicę przebiegu choroby i reakcji rośliny w zależności od zastosowanego genotypu wiroida.

W rozdziale nr 4.2.2.5 podjęto się podziału genów ulegających zróżnicowanej ekspresji na kategorie funkcjonalne. Jest to podejście prawidłowe aczkolwiek nieco sztuczne ponieważ w moim mniemaniu te informacje stanowią jedynie punkt wyjścia do dalszych analiz bioinformatycznych nakierowanych na przedstawienie sieci czynników należących do powiązanych ze sobą szlaków regulatorowych. Do tego celu dobrze nadaje się program CytoScape i to mocno poprawiłoby zrozumienie uzyskanych wyników. Grupowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji bez próby tworzenia sieci wzajemnych oddziaływań obarczone jest możliwością utraty realnego, funkcjonalnego kontekstu. Na przykład; pojęcie czynnik transkrypcyjny jest bardzo szerokie a przecież są bazy danych w których zobrazowano/opisano przynależność konkretnych czynników do partykularnych szlaków regulatorowych. Wykazanie zależności czynnik transkrypcyjny – dynamika zmian ekspresji genów kodujących kinazy – zmiany ekspresji konkretnych genów kodujących receptory mogłoby pozwolić na budowanie interesujących hipotez. Również szkoda, że w przypadku niektórych grup nie pokazano graficznie jakie miejsce geny o zróżnicowanej ekspresji zajmują w konkretnych ścieżkach. Szkoda zwłaszcza, że tego nie ma dla genów, których produkty zaangażowane są w molekularne mechanizmy wyciszania i przemian RNA na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym. W świetle danych literaturowych wydaje się, że jest to poziom, na którym decyduje się w dużym stopniu zdolność wiroida do porażenia rośliny

oraz dynamika przebiegu choroby. W tym świetle również należałoby się zastanowić nad biologicznym sensem przypisania zmian ekspresji genów zaangażowanych we wczesne etapy detekcji patogenów i uruchamiania kaskad sygnałowych prowadzących do odpowiedzi obronnej (rycina 19). **Jakie znaczenie może mieć wzrost ekspresji genów kodujących receptor FLS2 czy CERK1 jeśli patogen, z którym pracujemy nie wytwarza peptydów, które mogą być rozpoznane i jako taki nie zawiera chityny?**

Kolejna sprawa to geny regulujące cykl komórkowy. Z przedstawionych badań wynika, że w następstwie infekcji genotypem S23 dochodzi do obniżenia ekspresji genów, których produkty są negatywnymi regulatorami proliferacji komórek (RBR1, KRP2, KRP7), jednocześnie spada ekspresja Cyklin typu D i cyklin typu B. To sugeruje scenariusz, w którym w jakiś nadrzędny sposób zmniejszone jest wchodzenie komórek w fazę proliferacji, zarówno na etapie G1-S jak i G2-M. To powoduje brak potrzeby silnej regulacji negatywnej, stąd być może niska ekspresja RBR1 itp. Wszystko to należałoby pokazać na schemacie (Cytoscape, MapMan bądź podejście indywidualne oparte na istniejących pracach). Powiązanie tego z ekspresją czynników transkrypcyjnych jest wręcz bezcenne bo przecież podziały w liściach są regulowane przez czynniki transkrypcyjne, np. te, które regulują losy merystemoidów a jest jeszcze aspekt regulacji losów komórek na poziomie endoreduplikacji. Każda, nawet najlepsza analiza transkryptyczna musi być wsparta obserwacjami biologicznymi lub chociażby próbą stworzenia sieci regulatorowych. Podsumowując przedstawiona analiza jest poprawna ale nie wyczerpująca i brak w niej głębi, dzięki której można mówiąc kolokwialnie „wycisnąć” więcej istotnych informacji wynikających z szerokiego kontekstu zmian obserwowanych przez autorkę niniejszej dysertacji.

Odnosnie rozdziału 4.3, w którym weryfikowano uzyskane wyniki i porównywano zmiany obserwowane w mikromacierzach czy sekwencjonowaniu mam przede wszystkim pytanie co oznacza skrót FC? Drugie pytanie to czym kierowano się wybierając poszczególne geny do analiz? Trzecie pytanie to czy wartości istotności statystycznej dotyczą statystycznych różnic pomiędzy metodami czy też istotności statystycznej zmian w stosunku do odpowiedniej kontroli? Czy prezentowane wartości to wartości średnie a jeśli tak to dlaczego brak wskazania rozrzutu wartości w powtórzeniach (słupki błędu etc.)?

Proszę również wytłumaczyć czym mogą być spowodowane duże różnice pomiędzy danymi z sekwencjonowania i mikromacierzy (rozdział 4.4)?

Rozdział dyskusja jest napisany poprawnie, jednak również w podobnym duchu co cała praca, ponieważ nie podjęto próby integracji danych w oparciu o kontekst obserwowanych zmian oraz istniejące dane dotyczące wzajemnych sieci powiązań poszczególnych genów. Podobnie jak w części wynikowej brak jest schematów, dzięki którym można przystępnie zobrazować i zinterpretować wyniki. Najważniejszym mankamentem jest jednak to, że konfrontacji uzyskanych wyników z opublikowanymi pracami na tym samym modelu nie poświęcono odrębnego rozdziału. Utrudnia to zrozumienie osiągnięcia naukowego oraz nowatorskich aspektów uzyskanych wyników.

To podejście znajduje również odzwierciedlenie w kolejnym rozdziale, w którym przedstawiono wnioski. W moim mniemaniu nie są to wnioski a jedynie przedstawienie i podsumowanie uzyskanych wyników. Wnioskiem może być na przykład stwierdzenie, że analiza transkryptomyczna pozwala odróżnić delikatny przebieg infekcji od przebiegu ostrego. Wnioskiem natomiast nie jest stwierdzenie, że ekspresja jakiejś grupy genów była wyższa w danym wariancie. Wtedy należy wnioskować, że infekcja prowadzi do zmian dotyczących konkretnego procesu co może mieć związek z konkretną odpowiedzią/sytuacją etc. **Proszę spróbować przedstawić dwa lub trzy wnioski wypływające z prowadzonych analiz i uzyskanych wyników.**

Podsumowanie oceny dysertacji:

Praca jest przygotowana starannie i nie znalazłem w niej większych błędów merytorycznych lub zaniedbań dotyczących planowania czy realizacji poszczególnych eksperymentów. Praca napisana jest w sposób przystępny, z zachowaniem odpowiednich proporcji pomiędzy wstępem, wynikami i dyskusją. Generalnie nie znalazłem rażących błędów stylistycznych a ryciny przedstawione są w sposób estetyczny. Zagadnienie, nad którym pracowano jest ciekawe i ważne. Dobór metodyki jest właściwie poprawny chociaż praca zyskałaby gdyby autorka pokusiła się o bardziej wnikliwe analizy. Interpretacja wyników oraz sformułowane wnioski niestety są najsłabszą częścią niniejszej pracy. Do pewnego stopnia rozumiem, że autorka usiłowała uniknąć nadinterpretacji co zdarza się przy tworzeniu sieci oddziaływań. Należy jednak zrozumieć, że pewna nadinterpretacja wpisana jest w prace „omiczne” ponieważ prezentowane tu wyniki są niejako hipotezami, dzięki którym wytyczane są kierunki do badań szczegółowych. Stąd też bardzo bezpieczne i na miejscu jest tu używanie terminów

takich jak: przypuszczalny, przewidziany etc. (*ang. hypothetical, predicted*). Ogólnie pracę oceniam wysoko i uważam, że po wykonaniu bardziej szczegółowych analiz uzyskanych wyników przyczyni się ona do dalszego poznania biologicznych podstaw reakcji roślin-patogen oraz ewentualnych prac aplikacyjnych. Praca spełnia warunki wymagane ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

dr hab. Robert Malinowski, prof. IGR PAN



Bibliografia:

Owens, R.A., Tech, K.B., Shao, J.Y., Sano, T., and Baker, C.J. (2012). Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 582-598.