

Warszawa, 12. 11. 2024 r.

Dr hab. inż. Barbara Łotocka
Katedra Botaniki, Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-766 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Przemysław Olejnika z Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu,

kandydata do stopnia doktora w dyscyplinie biotechnologia,

**pt. „Poznanie funkcji wybranych białek z rodziny cyklofilin *Lotus japonicus*
z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy”**

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Kierownika Dziekanatu Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z 14. października 2024 r. (WRO-36/4000/2024), powołujące się na uchwałę Rady Wydziału ROB UPP z 7. lipca 2024 r.

Praca została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UPP pod kierunkiem opiekuna naukowego, dr hab. Katarzyny Nuc, prof. UPP i przy udziale dr inż. Karoliny Jarzaniak jako promotora pomocniczego.

Charakterystyka i ocena rozprawy pod względem formy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zatytułowana „Poznanie funkcji wybranych białek z rodziny cyklofilin *Lotus japonicus* z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy”. Tytuł rozprawy w pełni oddaje jej problematykę naukową.

W rozprawie nie podano źródeł finansowania badań, zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska, napisana w tradycyjnej formie jako samodzielne dzieło, liczy 180 stron standardowego wydruku i obejmuje kolejno streszczenie w języku polskim i angielskim, wykazy rycin, tabel i skrótowców, spis treści oraz zasadnicze rozdziały rozprawy, czyli Wprowadzenie (32 strony), Cel pracy (1 strona), Materiały i metody (40 stron), Wyniki (35 stron), Dyskusja (9 stron), Wnioski (2 strony) oraz wykaz literatury (399 pozycji) i załączniki, zawierające dokumentację obserwacji mikroskopowych (10 mikrofotografii). Rozprawa jest poprawnie podzielona na rozdziały, zgodnie ze standardami przyjętymi dla eksperymentalnych prac biologicznych. Tekst ma przejrzysty układ i jest bardzo dobrze ilustrowany rycinami

(ryciny zawierające mikrofotografie powinny być wydrukowane na papierze fotograficznym gładkim do druku w wysokiej rozdzielczości, zwykły papier nie nadaje się do tego celu, ponieważ „gubi” szczegóły).

Rozprawa jest napisana w języku polskim, na ogół poprawnie, jednak czuję się w obowiązku wytknąć Doktorantowi, że w rozprawie zdarzają się błędy interpunkcyjne, stylistyczne i anglicyzmy, jak również sformułowania nieprecyzyjne, żargon laboratoryjny oraz skróty myślowe. Anglicyzmy najczęściej przejawiają się odwróconą kolejnością rzeczownika i przymiotnika w terminach z nich złożonych. Ponieważ wymienione niedociągnięcia nie mają znaczenia merytorycznego i nie wpływają na moją ocenę rozprawy, nie umieszczam ich listy w recenzji, ograniczę się jedynie do przekazania Doktorantowi pliku z zaznaczonymi uwagami.

Oceniam, że wszystkie wymogi formalne dotyczące zawartości rozprawy doktorskiej zostały spełnione.

Charakterystyka i ocena rozprawy pod względem merytorycznym

Problematyka

Założony przez Doktoranta cel jest ważny pod względem poznawczym, ponieważ dotyczy bardzo ciekawej grupy enzymów o ciągle jeszcze niezadowolająco zbadanych funkcjach biochemicznych i znaczeniu w fizjologii roślin. Cyklofiliny jednodomenowe (tj. zawierające tylko domenę cyklofilinową) funkcjonują zazwyczaj jako izomerazy peptydyloprolilowe, tj. katalizują izomeryzację *cis*→*trans* wiązania peptydowego pomiędzy dowolnym aminokwasem a proliną, co skutkuje przyspieszeniem fałdowania białek i ich lepszą ochroną przed degradacją. Cyklofiliny wielodomenowe zawierają co najmniej jedną domenę dodatkową, dzięki której ich zakres funkcji jest szerszy (lub inny) w porównaniu do jednodomenowych – i mniej poznany. Niektóre z dodatkowych domen ułatwiają interakcje pomiędzy białkami, dzięki czemu zawierające je cyklofiliny uczestniczą w składaniu kompleksów białkowych lub w innych procesach wymagających przejściowego ustawienia białek w określonej konfiguracji tworzonego kompleksu. Znaczenie funkcjonalne innych domen dodatkowych nie jest zbadane eksperymentalnie u roślin.

W związku z powyższym podjęcie przez Doktoranta badań nad cyklofilinami *L. japonicus* było uzasadnione, ponieważ stwarzało nadzieję istotnego poszerzenia wiedzy o tych ważnych i różnorodnych białkach.

Rozdział "Wprowadzenie"

Ta część rozprawy zawiera stosunkowo krótki przegląd literatury, w którym Autor opisał, przechodząc od problematyki ogólnej do szczegółowej, przedmioty eksperymentów: # *Lotus japonicus* jako gatunek (modelowy) zdolny do diazotrofii symbiotycznej, # brodawki korzeniowe jako organy wyspecjalizowane do tej symbiozy oraz # cyklofiliny jako białka o wielorakich funkcjach, także w brodawkach korzeniowych. W ten sposób nakreślone zostało tło dla oceny * wagi celu głównego pracy doktorskiej i pięciu celów szczegółowych, * zasadności wykorzystanych metod, * wyników pracy w szerszym kontekście i * ich dyskusji. We Wprowadzeniu omówione są także metody mutagenyzy stosowane w badaniach funkcji białek, przy czym najwięcej miejsca jest poświęcone metodom mutagenyzy ukierunkowanej jako najbardziej precyzyjnym – i wykorzystanym w badaniach wykonanych przez Autora.

"Wprowadzenie" właściwie nie zawiera zbędnych informacji, tj. takich które nie są istotnie związane z zagadnieniami poruszonymi w rozprawie (dyskusyjne jest jedynie zamieszczenie informacji o nietypowym powstawaniu brodawek korzeniowych u *Sesbania*), jednocześnie jako recenzent nie odczuwam braku jakiegoś tematu w tym rozdziale. Oceniam, że Doktorant dobrze orientuje się w literaturze problemu, potrafi dokonać syntezy wiedzy pochodzących z prac realizowanych różnymi technikami oraz - co bardzo ważne - potrafi bardzo dobrze wzbogacić opis poglądowymi rysunkami (głównie pochodzącymi z cytowanych prac), które zdecydowanie ułatwiają zrozumienie treści i czynią czytanie pracy po prostu przyjemnym.

Pomimo generalnie pozytywnej opinii o „Wprowadzeniu”, z obowiązku wspomnę o kilku problematycznych kwestiach:

1. Doktorant umieszcza cytowanie na końcu fragmentu odnoszącego się do cytowanej pracy – jest to niewygodne dla czytelnika, często mylące. Lepiej sprawdza się umieszczenie cytowania już w pierwszym zdaniu.
2. Rozdział 1.3.6 Regulacja procesu brodawkowania powinien mieć inny tytuł (Autoregulacja brodawkowania, AON), obecny sugeruje szerszą problematykę.
3. Jaki jest poprawny polski termin dla chaperone? Autor zastosował różne terminy w rozprawie i w swoim artykule na ten temat (<https://postepybiochemii.ptbioch.edu.pl/index.php/PB/article/view/104>).
4. Zbyt krótko omówiona jest we wstępie wcześniejsza praca Nuc i wsp. (2001) o cyklofilinach i ich potencjalnej roli w organogenezie brodawki korzeniowej hubinu.
5. Doktorant niesłusznie zawęził zakres diazotrofów i taksonomię ryzobiów do rodziny Rhizobiaceae.
6. We Wprowadzeniu więcej miejsca powinno być poświęcone systemowi obniżania stężenia wolnego O₂ we wnętrzu brodawki, a zwłaszcza w korze brodawki i w endodermie korowej

(nie mylić z endodermą waskularną), ponieważ analiza fenotypu mutantów wykazała, że różniły się one od roślin typu dzikiego grubością tej warstwy komórek.

Bardzo proszę, żeby Doktorant odniósł się do ostatnich dwóch zagadnień w trakcie obrony.

Rozdział "Cel pracy"

Przegląd literatury został napisany na tyle umiejętnie, że po jego przeczytaniu cel zaplanowanych badań można uznać za oczywisty, ;-)) niemniej został on oczywiście formalnie określony przez Doktoranta w rozdziale 2. jako, cyt.: „poznanie funkcji, jaką mogą pełnić cyklofiliny LjCYP18, LjCYP25-2, LjCYP56, LjCYP71 i LjCYP92 u *Lotus japonicus* z uwzględnieniem formowania układu symbiotycznego z bakteriami *Mesorhizobium loti* (MAFF303099).”

W celu znalezienia odpowiedzi na pytanie o funkcje wymienionych cyklofilin, zdefiniowane zostały cele szczegółowe, które zdeterminowały, jakie następnie wykonano doświadczenia i obserwacje. Dwa z celów szczegółowych dotyczyły określenia skutków fenotypowych mutacji *LORE1* w genach *LjCYP18*, *LjCYP56* lub *LjCYP71*, a trzy – określenia wpływu wyciszenia genów *LjCYP18*, *LjCYP25-2*, *LjCYP56* lub *LjCYP92* na poziom ekspresji w korzeniach transgenicznych *L. japonicus* innych genów kodujących cyklofiliny, kierowane do tych samych przedziałów komórki (cytoplazmy lub jądra komórkowego).

Rozdział "Materiały i metody"

Zrealizowanie badań zdefiniowanych w celu pracy wymagało wykorzystania wielu narzędzi i technik. Z opisu metod wynika, że Doktorant rozumie je wnikliwie, a nie tylko rutynowo stosuje.

Doktorant umiejętnie zastosował do analizy fenotypu gatunek modelowy (trudniejszy od *Arabidopsis thaliana*!) i jego mutanty insercyjne, przy czym do analizy tej wykorzystał mikroskopię świetlną i skrawki żywicowe brodawek korzeniowych, co dalece wykracza poza zakres metod opanowanych zazwyczaj przez biologów molekularnych. Doktorant biegle zastosował narzędzia bioinformatyczne do analizy filogenetycznej białek, projektowania sekwencji i analizy wyników eksperymentów przeprowadzonych metodami inżynierii molekularnej. Doktorant rutynowo posługuje się (oczywiście!) różnymi technikami pracy z kwasami nukleinowymi oraz bakteriami i konstrukcjami genetycznymi do transformacji, przy czym konstrukcje te samodzielnie projektuje i wykonuje. Takie wszechstronne podejście do badań, wymagające odpowiedniego nastawienia mentalnego (otwartości na „nowe”, gotowości do zmierzenia się z narzędziami/ metodami spoza własnej specjalności) oraz sprawności warsztatowej i organizacyjnej, bardzo dobrze świadczy o kompetencjach

Doktoranta i jego przygotowaniu do samodzielnej pracy naukowej w przyszłości.

Przedstawione w rozprawie opisy materiałów i metod są z reguły wystarczająco precyzyjne, aby na ich podstawie powtórzyć przedstawione w rozprawie analizy i doświadczenia. Jedynie w niektórych miejscach rozdział ten nie zawiera niezbędnych informacji (np. pomiary grubości kory brodawki) lub brak jest odniesień do źródeł (szczegółowe uwagi naniesiono w tekście rozprawy i przekazano Doktorantowi). „Materiał i metody” jest konieczną częścią pracy naukowej, ponieważ zapewnia powtarzalność (*reproducibility*) badań. Dlatego podawane informacje muszą być jak najdokładniejsze, nawet jeśli jest to śmiertelnie nudne. Aby mieć pewność, że Doktorant w pełni rozumie wagę problemu określanego jako *reproducibility crisis*, przekazano Mu zestaw artykułów naukowych na ten temat z prośbą o przedstawienie krótkiej analizy i własnego zdania w trakcie obrony.

Rozdział "Wyniki"

Rozdział „Wyniki” jest napisany szczegółowo, precyzyjnie i jasno, zawiera też właściwie dobrane ryciny, ilustrujące lub dokumentujące poszczególne etapy prac, którymi były analiza filogenetyczna cyklofilin *L. japonicus* i dalsza analiza bioinformatyczna sekwencji cyklofilin najbardziej interesujących, identyfikacja roślin będących mutantami insercyjnymi w populacji pozyskanej z nasion kilku linii *L. japonicus* i ich analiza fenotypowa oraz cały segment prac związanych z wytworzeniem i analizami materiału transgenicznego (korzeni) z wyciszonymi genami poszczególnych cyklofilin - projektowanie sekwencji sgRNA do metody CRISPR/Cas, przygotowanie konstrukcji genetycznych, transformacja roślin i analiza poziomu ekspresji genów. Zwraca uwagę, w pozytywny sposób, że Doktorant nie unika podawania wyników mniej przyjemnych, jak na przykład zerowa wydajność edycji w przypadku jednej z cyklofilin.

W mojej ocenie, w kontekście założonego celu, najważniejszymi wynikami pracy Doktoranta są: * zidentyfikowanie dwóch cyklofilin których poziom ekspresji lub specyficzna reakcja kory brodawek korzeniowych sugerują ich szczególną rolę w funkcjonowaniu tych organów oraz * dopracowanie metody CRISPR/Cas do *L. japonicus*, ponieważ pozwala na wytwarzanie narzędzi do wielu dalszych interesujących analiz i eksperymentów.

Ogólnie, omawiany rozdział oceniam bardzo dobrze - prawie celująco - "prawie", ponieważ mam dwie wątpliwości, dotyczące kwestii pobocznych. Pierwsza odnosi się do zamieszczania na początku podrozdziałów informacji dotyczących materiałów i metod. Jest to kontrowersyjne, ponieważ z jednej strony może ułatwiać percepcję bieżącej treści, ale z drugiej strony dodaje tekstowi niepotrzebnej objętości. Druga wątpliwość dotyczy rozdziału 4.4. „Analiza profilu ekspresji genów kodujących wybrane cyklofiliny *L. japonicus*”,

w którym Autor chyba zastosował błędny termin do nazwania jednego z analizowanych organów - pisze o pędzie (jest to cała nadziemna część rośliny), a powinna być chyba łodyga. W przypadku transformacji za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* roślina wytwarza korzenie przybyszowe, w założeniu transgeniczne, ale w istocie mogą wśród nich być także korzenie wyrastające z grupy komórek zarówno stransformowanych, jak i nie zawierających wprowadzonego konstruktów - takie korzenie są właściwie chimerami. Bardzo dobrze zjawisko to wizualizuje GUS. Nie jest jasne dla mnie, czy takie korzenie były identyfikowane w ocenianej pracy (miały wklonowany gen kodujący GFP, co pozwala identyfikować takie rośliny przy pomocy np. mikroskopu fluorescencyjnego stereoskopowego lub odwróconego), a jeśli nie, to czy takie „częściowe stransformowanie” mogło „obciążyć” wyniki analizy poziomu ekspresji genów kodujących cyklofiliny? Uprzejmie proszę Doktoranta o odniesienie się do tej kwestii w toku obrony.

Rozdział "Dyskusja"

W rozdziale tym wyniki pracy zostały zestawione z danymi literaturowymi i skomentowane. Bardzo interesującą częścią dyskusji jest porównanie wad i zalet zastosowanej w pracy metody edycji genomu CRISPR/Cas do wyciszania genów metodą interferencji RNA. W mojej ocenie zbyt krótko została potraktowana dyskusja wyników własnych z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi na *Lupinus luteus* w macierzystej katedrze. Są to jedne z nielicznych danych literaturowych dotyczące cyklofilin w brodawkach korzeniowych, co prawda bardzo odmiennego gatunku rośliny gospodarza. Doktorant skupił się jednak w "Dyskusji" tylko na wynikach i danych literaturowych, które mają ścisły związek z celem podjętych badań lub zastosowanymi metodami. Takie podejście ma i zalety, i wady: świadczy o - jakże potrzebnej - dyscyplinie intelektualnej i sprzyja zwięzłości wypowiedzi, ale też ogranicza kreatywność kryjącą się w kojarzeniu odległych nieraz faktów. Zasadniczo pochwalam dyscyplinę i zwięzłość, mam jednak nadzieję, że Doktorant pozwala sobie także na śmielsze naukowe eksploracje myślowe w okolicznościach mniej formalnych niż obrona pracy doktorskiej. 😊

Fragment „Dyskusji” odnoszący się do analizy profilu ekspresji genów kodujących badane cyklofiliny w 10-tygodniowych roślinach jest trudny w percepcji. Jest jeden artykuł naukowy (Verdier i wsp. 2013) zawierający porównawcze dane, ale wraz z wynikami Doktoranta danych tych jest dużo. Sugeruję, że zestawienie wyników własnych i literaturowych w przejrzystej tabeli, a następnie wskazanie i dyskusja najistotniejszych różnic i podobieństw znacznie ułatwiłoby czytanie tego fragmentu ze zrozumieniem.

Tak jak zakres przeprowadzonych doświadczeń wskazuje na biegłość metodyczną i badawczą

oraz ponadprzeciętną pracowitość Doktoranta, tak rozdział „Dyskusja” (wraz z przeglądem literatury we „Wprowadzeniu”) świadczą o Jego dużej wiedzy teoretycznej, dobrej znajomości literatury przedmiotu, umiejętności kojarzenia faktów i krytycyzmie.

Rozdział "Wnioski"

Doktorant umiejętnie wyselekcjonował najważniejsze wyniki i obserwacje i podsumował je w punktach. Wnioski są syntetyczne i trafne.

Celem pracy było, cyt.: "poznanie funkcji, jaką mogą pełnić cyklofiliny LjCYP18, LjCYP25-2, LjCYP56, LjCYP71 i LjCYP92 u *Lotus japonicus* z uwzględnieniem formowania układu symbiotycznego z bakteriami *Mesorhizobium loti* (MAFF303099)". Uznaję, że Doktorant **zrealizował założony cel**, uzyskując wyniki nowe dla nauki. Nie są one kompletne i zamknięte, ponieważ będą wymagały dalszych prac, aby można było przejść od przypuszczenia („mogą pełnić”) do pewności („pełnią”), ale to już po prostu cecha badań naukowych – jeśli są dobrze zaprojektowane, to otwierają nowe, dalsze kierunki badań ☺

Podsumowanie recenzji

Pragnę ponownie stwierdzić, że zawarte w recenzji nieliczne zarzuty czy uwagi nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy. Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej Mgr inż. Przemysława Olejnika chcę silnie podkreślić, że pod względem naukowym rozprawa jest **bardzo dobra**: problem badawczy jest ciekawy i ważny, układ eksperymentalny kompleksowy i dobrze zaprojektowany, wykorzystane metody są adekwatne do zadań, analizy i dokumentacja wykonane w sposób systematyczny i rzetelny, dyskusja wyników przeprowadzona jest wnikliwie i kompetentnie, a wnioski są trafne. Doktorant z sukcesem zmierzył się z trudnym metodycznie materiałem, wymagającym dużo pracy i cierpliwości.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie forma i treść rozprawy doktorskiej mgr inż. Przemysława Olejnika pt. „Poznanie funkcji wybranych białek z rodziny cyklofilin *Lotus japonicus* z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenezy” spełniają wszystkie wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 3. 07. 2018 (Dz.U. poz. 1669). **Na tej podstawie wnioskuję o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Przemysława Olejnika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Biorąc pod uwagę nakład pracy Doktoranta, ciekawie zaplanowane, przeprowadzone

i dobrze opisane eksperymenty, wykorzystanie metod badawczych spoza typowego warsztatu biotechnologa, zrealizowanie celu pracy oraz ze względu na fakt, że cała praca świadczy o dojrzałości i samodzielności naukowej Autora, **wniosuję do Rady Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie tej pracy.**

Barbara Łotocka

dr hab. inż. Barbara Łotocka