

Poznań, 21.04.2022 r.

Dr hab. Agnieszka Żmieńko, prof. IChB PAN
Zakład Genomiki Roślin
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Identyfikacja i charakterystyka genetyczna *SNII*,
genu kodującego podjednostkę kompleksu SMC5/6, jako naturalnego modyfikatora
rekombinacji mejotycznej u *Arabidopsis thaliana*”**
Autor rozprawy: mgr Longfei Zhu

Ocena podjętego problemu naukowego

Rozprawa doktorska mgr. Longfeia Zhu przedstawia badania przeprowadzone w Pracowni Biologii Genomu na Wydziale Biologii UAM, pod kierunkiem dr hab. Piotra Ziółkowskiego, prof. UAM, we współpracy naukowej z zespołami z Uniwersytetu Complutense w Madrycie oraz Uniwersytetu Cambridge. Przedmiotem pracy doktorskiej były identyfikacja i scharakteryzowanie genetycznego czynnika wpływającego na częstość rekombinacji mejotycznych u *Arabidopsis thaliana*.

Zjawisko rekombinacji mejotycznej jest konserwatywnym mechanizmem, który zapewnia utrzymanie różnorodności genetycznej, poprzez tworzenie nowych alleli i ich kombinacji. Jednak nie każde zainicjowane zdarzenie przerwania podwójnej nici DNA, rozwiązywane jest jako crossing-over. Opisano także zjawiska inferencji oraz tzw. redystrybucji w odpowiedzi na wzór heterozygotyczności *in cis*, w odniesieniu do zdarzeń crossing-over klasy I. Tym samym, zarówno rozkład jak i częstość rekombinacji mejotycznej w skali chromosomu musi być poddawana precyzyjnej kontroli. Poznanie mechanizmów tej kontroli u roślin mogłoby się przyczynić do udoskonalenia programów hodowlanych i ułatwić otrzymywanie odmian o korzystnych cechach, poprzez kierowanie zajęć rekombinacyjnych w mejozie w pożądane regiony genomu. Tym samym podjęty przez mgr. Longfeia Zhu problem badawczy ma istotne znaczenie zarówno w kontekście zwiększenia podstawowej wiedzy o rekombinacji mejotycznej u eukariontów, jak i stworzenia nowych kierunków aplikacyjnych, bazujących na tym zjawisku.

Ocena sposobu rozwiązania problemu naukowego

Jak wiele innych cech, częstość rekombinacji crossing-over podlega naturalnej zmienności u *A. thaliana*. Tą zmienność wykorzystano we wcześniejszych pracach grupy Profesora Ziółkowskiego do zidentyfikowania w genomie dwóch loci cech ilościowych, *QTL1* i *QTL4*, różnicujących częstość rekombinacji mejotycznej między ekotypami Ler i Col. Przedmiotem pracy mgr. Longfeia Zhu była identyfikacja i scharakteryzowanie drugiego z nich, czyli *QTL4*. Wykonał on w tym celu rozbudowane eksperymenty mapowania, stosując

dobrze dobrane narzędzia molekularne. Autor skupił swoje badania wyłącznie na chromosomie 4, na którym zlokalizowano *QTLA*, posługując się w tym celu linią w której tylko ten chromosom pochodził z ekotypu Ler, a pozostałe z Col. Co ważne, taki układ badawczy eliminował potencjalny wpływ modyfikatorów z innych obszarów genomu na prowadzone obserwacje. Doktorant wprowadził do tej linii fluorescencyjne markery reporterowe, a następnie przebadał kilka pokoleń roślin, analizując częstość rekombinacji oraz jej związek z występowaniem regionów heterozygotycznych na chromosomie 4. Położenie tych regionów udokładniał w kolejnych pokoleniach, stosując zestawy odpowiednio zaprojektowanych markerów typu *simple sequence length polymorphism* (SSLP), odróżniających haplotypy Col i Ler. To pracowite, ale eleganckie podejście pozwoliło Dmgr. Longfeiowi Zhu zawęzić obszar poszukiwań do przedziału o długości 19.5 kpz, obejmującego zaledwie sześć genów kodujących białka, co w mojej ocenie jest bardzo dobrym wynikiem. Poprzez analizę wpływu mutacji poszczególnych genów na częstość rekombinacji mejotycznych, Doktorant wykazał następnie, że jeden z kandydatów, *SNII*, jest tożsamy z *QTLA*. Dodatkowym potwierdzeniem tego było sprawdzenie, że oba allele dzikie miały zdolność pełnej komplementacji mutantu *sni1-1*. Tym samym mgr Longfeifei Zhu w przekonujący sposób osiągnął pierwszy postawiony przez siebie cel, mianowicie identyfikację czynnika genetycznego, wpływającego na częstość rekombinacji mejotycznej u *Arabidopsis thaliana*.

Autor podjął próby wyjaśnienia sposobu, w jaki naturalna zmienność w genie *SNII* mogła przyczynić się do różnic częstości rekombinacji między ekotypami. Badania sekwencji alleli *SNII* w kilku ekotypach wskazywały, że za ten efekt może odpowiadać niesynonimiczna substytucja I235V. Doktorant w Dyskusji odniósł się do dostępnych wyników modelowania struktury białek kodowanych przez oba allele, wskazujących na istnienie różnic między nimi. Zdaniem Autora, różnice te mogą ograniczać funkcjonalność allelu *SNII*^{Ler}, jako że w mutancie *sni1-1* zaobserwował on zbieżny, choć znacznie bardziej nasilony wpływ na częstość rekombinacji. Myślę, że to ciekawa sugestia, warta rozwinięcia w przyszłych badaniach, zwłaszcza w kontekście udziału *SNII* w kompleksie białkowym SMC5/6.

Mgr Zhu nie zaobserwował istotnych różnic w poziomie ekspresji obu alleli ani wpływu dawki genu *SNII* na częstość rekombinacji. Niemniej, sprawdzenie hipotezy dotyczącej efektu dawki było jak najbardziej zasadne, biorąc pod uwagę, że zmapowany wcześniej w QTL1 gen *HEI0* działa właśnie w ten sposób. Co ciekawe, przy okazji tych badań, mgr Longfeifei Zhu zaobserwował różną reakcję na poddanie roślin działaniu podwyższonej bądź obniżonej temperatury, zależnie od allelu *SNII*, przy czym zmiany w częstości rekombinacji były uwydatnione w roślinach niosących allel *SNII*^{Col}. Jest to ciekawe spostrzeżenie i szkoda, że wątek samej zmienności częstości rekombinacji i jej potencjalnego znaczenia nie został bardziej rozwinięty w pracy. Konkluzja Doktoranta, że polimorfizm genu *SNII* mógł wyewoluować w kierunku modyfikacji odpowiedzi na warunki wzrostu poprzez modulację rekombinacji mejotycznej wydaje mi się odrobinę przedwczesna, natomiast samo zagadnienie jest z pewnością godne uwagi.

W dalszej części mgr Zhu skupił się na drugim celu swojej pracy, mianowicie na dokładniejszej charakterystyce udziału genu *SNII* w rekombinacji mejotycznej. Podjął się tego poprzez wyłączenie działania genu *SNII* w różnych układach eksperymentalnych i analizę częstości rekombinacji w tych układach. Trzeba podkreślić, że w swoim poszukiwaniu mechanizmów molekularnych, z którymi można by powiązać modulujące działanie genu *SNII*

na częstość crossing-over, mgr Zhu przetestował niezwykle bogaty zestaw mutantów. Z uznaniem podkreślam ogrom pracy, który został włożony w przygotowanie i selekcję odpowiednich krzyżówek, zawierających pożądane kombinacje alleli oraz markery rekombinacji położone w różnych miejscach chromosomów. Z kolei genotypowanie metodą sekwencjonowania krzyżówki ekotypów Col x Ct, z których każdy niósł inną dysfunkcyjną mutację genu *SNII*, wymagało uzyskania nowego mutantu, do czego Doktorant zastosował podejście mutagenazy metodą CRISPR. Wszystko to świadczy o świetnie opanowanym przez niego warsztacie badawczym i umiejętności posługiwania się różnorodnymi technikami eksperymentalnymi oraz metodami ich analizy. Choć Autor nie odnotował bezpośredniego związku pomiędzy częścią badanych genów, np. *RAD51*, *BRC2A*, *BRC2B*, *ATR*, *EDS1*, *SPO11-1*, a fenotypem mejotycznym *SNII*, to analiza interakcji genetycznych była istotnym etapem pracy, pozwalającym zawęzić obszar badań i określić dokładniej efekty mutacji *SNII*, a przez to rolę samego białka. W efekcie, mgr Longfei Zhu wykazał, że fenotyp mejotyczny mutantu *sni1* wynika z jego zaangażowania w działanie kompleksu SMC5/6, a mutacja innych genów kodujących białka tego kompleksu wywołuje podobny fenotyp co mutacja *SNII*. Upośledzenie funkcjonalności SMC5/6 poprzez jednoczesne mutacje wielu genów tego kompleksu, pogłębiało zmiany rozwojowe u roślin, potwierdzając wnioski Autora.

Ponadto mgr Zhu ustalił, że mutacja *SNII* wywiera przeciwny efekt na częstość rekombinacji w obszarach subtelomerowych (zwiększenie) i okołowcentromerowych (zmniejszenie) oraz powoduje redukcję interferencji crossing-over na chromosomach. Mutacja ta również przywracała częściowo płodność roślin z upośledzonym szlakiem I crossing-over. Doktorant zbadał wreszcie powiązania pomiędzy *SNII*, a czynnikami antyrekombinacyjnymi RECQ4 i MUS81, co pozwoliło mu zaproponować model, w którym gen ten bierze udział w kontroli crossing-over typu II, w sposób niezależny od innego modyfikatora, jakim jest *FANCM*. Reasumując, Doktorant przeprowadził obszerną i wielostronną charakterystykę zidentyfikowanego przez siebie modulatora częstości rekombinacji, realizując tym samym drugi postawiony sobie cel pracy. W tym miejscu pragnę zaznaczyć, że choć przedstawiona rozprawa doktorska ma tzw. klasyczny układ, to omawiane wyniki weszły w skład artykułu naukowego, opublikowanego w prestiżowym recenzowanym czasopiśmie PNAS. Jest to publikacja wieloautorska, w której mgr Zhu pełni rolę pierwszego autora. Zarówno analiza sekcji opisującej udział poszczególnych autorów jak i porównanie treści rozprawy z artykułem potwierdzają, że badania mgr. Zhu stanowiły kluczowy element tej publikacji, co niezależnie potwierdza ich istotność i oryginalność.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa składa się z kilku rozdziałów: *Wstępu*, *Celu pracy*, *Materiałów i Metod*, *Wyników*, *Dyskusji* oraz *Podsumowania*. Zawiera także spis referencji oraz wykaz skrótów. Została przygotowana w języku angielskim i zgodnie z formalnymi wymogami zawiera streszczenia zarówno w języku angielskim jak i polskim. Praca jest dość krótka, bo nie licząc referencji, ma zaledwie 67 stron. Ta „kompaktowość” niestety w niektórych aspektach odebrała jej przejrzystość, utrudniając odbiór tekstu Czytelnikowi nie związanemu ściśle z tematyką pracy. Pomimo to Doktorantowi udało się zgrabnie i w miarę wyczerpująco zawrzeć w tej objętości swoje wyniki oraz omówić je na tle dotychczasowej wiedzy. We *Wstępie* skupił się on na opisanu przede wszystkim zjawiska rekombinacji mejotycznej, genów w nią

zaangażowanych i czynników modulujących w układzie *cis* i *trans*. Jest to jak najbardziej pożądane wprowadzenie do opisu wyników, biorąc pod uwagę szeroką listę mutantów, które Doktorant wykorzystał w badaniach. Autor podkreślił we *Wstępie*, że znaczna część wiedzy na temat działania kompleksu SMC5/6 jak również samej rekombinacji mejotycznej, pochodzi z badań na drożdżach. Uwypukla to wagę wyników, uzyskanych na modelu roślinnym. Autor wspomniał również o dość szerokim, jak się okazuje, spektrum efektów mutacji elementów kompleksu SMC5/6 na procesy rozwojowe i odpowiedź na stres u roślin. Ta część wydała mi się bardzo interesująca, a jednocześnie pozostawiła u mnie pewien niedosyt. Wiele z analiz Doktoranta wskazuje na swoistą niezależność modulacji częstości rekombinacji mejotycznej od innych efektów fenotypowych w mutancie *sn1*, takich jak wpływ na nabytą odporność systemiczną. Stąd, chętnie dowiedziałabym się z *Wstępu* nieco więcej o np. roli *SN1* jako represora transkrypcji.

Z kolei rozdział *Cel pracy* został trochę niepotrzebnie zagmatwany prezentacją wcześniejszych wyników Zespołu. Ich odpowiednio wyczerpujący opis powinien znaleźć się we *Wstępie*. Alternatywnie, mógłby on otwierać rozdział *Wyniki*, gdzie zresztą jest nawiązanie do tych badań. Byłoby wówczas bardziej oczywiste skąd w *Wynikach* wzięła się „inna linia substytucyjna” (drugie zdanie *Wyników*), a tak mamy do czynienia ze swoistą kontynuacją myśli rozpoczętej dwa rozdziały wcześniej.

Rozdział *Materiały i Metody* prezentuje dobry poziom uszczegółowienia, choć niektóre elementy nie są wystarczająco jasno wyjaśnione. Dotyczy to np. systemu reporterowego Col-420, który paradoksalnie został najlepiej przedstawiony w *Streszczeniu*. Zaobserwowałam pewne drobne braki, np. Tabela 3 nie zawiera informacji o markerze 4-10366 i markery w niej nie są uporządkowane pod względem nazwy i rozłożenia w genomie, co byłoby sporym ułatwieniem podczas czytania *Wyników*, podobnie jak informacja o pokoleniach, w których analizowano poszczególne markery.

Rozdział *Wyniki* zawiera dość wymagający w odbiorze opis imponującej liczby wspomnianych wyżej eksperymentów. Z jednej strony wynika to z ogromu kombinacji krzyżówek mutantów, jakie Autor wyprowadził i przetestował, co jest niewątpliwym plusem pracy. Z drugiej strony, przy tak dużej liczbie testowanych hipotez i możliwości, warto było pokusić się o nieco obszerniejsze zarysowanie tła dla poszczególnych analiz, co dodałoby przejrzystości opisom. Zresztą Autor nierzadko wydaje się sam gubić w tym gąszczu informacji i kilkakrotnie myli efekt działania genu z efektem jego wyłączenia, co - przyznam - utrudniło mi połączenie w całość zawartości wykresów z opisami i wnioskami w tekście głównym. Przykładem może być zdanie ze strony 48: „Mutacja *SN1* hamuje nabytą odporność systemiczną (SAR) (Durrant, et al. 2007).” (tłum. AŻ), gdy tymczasem jest dokładnie odwrotnie, co wynika również z badań własnych Doktoranta. Podobnie, na stronie 8 napisano, że brak białek RECQ4 ogranicza tworzenie crossing-over typu II, w sposób analogiczny do utraty FANCM, podczas gdy mgr Zhu opisał wcześniej przeciwny efekt u mutantu *fancm* i wspomniał, że białka RECQ4 stanowią czynniki antyrekombinacyjne. Po raz kolejny składam to na karb nadmiernej zwięzłości rozprawy. Wyniki są bardzo dobrze zilustrowane w postaci licznych i przejrzystych rysunków oraz wykresów. To czego zdecydowanie jednak w tym rozdziale zabrakło, to szczegółowe przedstawienie pomiarów fluorescencji dokonywanych w poszczególnych liniach. Stanowiły one przecież zasadniczą część eksperymentów tej pracy doktorskiej i powinny być do niej włączone.

W *Dyskusji* Autor unika daleko idącej interpretacji wyników oraz stawiania wizjonerskich tez na temat roli *SNII*. Wynika to z pewnością ze złożoności badanego zjawiska, różnego nasilenia efektów fenotypowych w zależności od użytego mutantu *sni1* i związanej z tym potrzeby dalszych badań, niezbędnych dla pełnego zrozumienia mechanizmu działania *SNII* i jego roli w kompleksie SMC5/6. Na te aspekty wskazuje zresztą sam Doktorant. Natomiast zwróciło moją uwagę, że sekcje 5.2 oraz 5.3 zdecydowanie odstają od reszty *Dyskusji*. Doktorant przedstawia w nich dość szczegółowo kolejne nowe wyniki, co budzi moje wątpliwości odnośnie tego, jak należy je traktować. Jeżeli stanowią one część pracy doktorskiej, to powinny znaleźć się w innym rozdziale. W przeciwnym razie powinny być potraktowane wyłącznie jako punkt odniesienia do dyskusji wyników własnych, jak każde inne doniesienie literaturowe, z podaniem źródła, nawet jeśli są to niepublikowane wyniki Zespołu.

Chciałabym w tym miejscu zadać kilka pytań Doktorantowi, z prośbą o komentarz do nich podczas obrony:

1. Przeglądając literaturę tematu, natknęłam się na pracę mówiącą o bezpośrednim oddziaływaniu *SNII* z czynnikami transkrypcyjnymi E2F, kontrolującymi przejście G1/S cyklu komórkowego. Wspomniano tam również o roli tego białka we integracji cyklu komórkowego z procesami naprawy uszkodzeń DNA (Wang et al., 2018, PNAS). Czy może być jakiś związek pomiędzy takim działaniem *SNII*, a jego wpływem na częstość zdarzeń rekombinacyjnych podczas podziału mejotycznego?
2. Odnośnie naturalnej zmienności genu *SNII* – czy wiadomo coś o częstości obu alleli w populacji *A. thaliana*? Który z nich jest bardziej rozpowszechniony i czy dominuje w jednej lub więcej grupach genetycznych, co mogłoby np. wskazywać na jego pozytywną selekcję?
3. Doktorant skutecznie tworzył liczne linie mutantów z systemem reporterowym do badań rekombinacji. Czy mógłby on wskazać jakieś kolejne geny bądź szlaki, które wydają się dobrymi kandydatami *a priori* do zweryfikowania wpływu ich mutacji na częstość i dystrybucję zdarzeń crossing-over? Czy takie podejście mogłoby być wydajnym narzędziem w bezpośrednim poszukiwaniu modulatorów rekombinacji mejotycznej w genomie *A. thaliana* na większą skalę?
4. Czy zdaniem Doktoranta, różnica w rozkładzie elementów powtórzonych w genomie *A. thaliana*, w szczególności transpozonów, może mieć jakiś związek z redystrybucją zdarzeń rekombinacyjnych u mutantu *sni1* w kierunku obszarów z mniejszą liczbą takich elementów?

Od strony redakcyjnej, praca ma pewne drobne niedociągnięcia, które nie wpływają znacząco na odbiór strony merytorycznej. Mogłabym tu wymienić przede wszystkim nagminny brak spacji, zwłaszcza w miejscu wstawiania cytowań, literówki, kiepskie pozycjonowanie rysunków na stronie (np. Rysunek 12) czy rozplanowanie wzajemnego położenia rysunków i ich opisów tak, że znajdują się na różnych stronach. W tekście brakuje rozwinięcia wielu skrótów. Niektóre z nich, tak jak np. *FANCM* zostały co prawda umieszczone w wykazie skrótów, inne, np. LOD czy FTL, nigdzie nie są wyjaśnione. Z kolei na wykresach prezentujących częstość rekombinacji, oś wartości jest podpisywana na różne sposoby: najczęściej poprzez podanie jednostki cM, ale także enigmatycznie jako niewyjaśniony nigdzie skrót RF (Rysunek 11), a czasem w ogóle (Rys. 13B). Nie wiem również dlaczego na Rysunku

13A jest przedstawiony chromosom 2, choć z tekstu wynika, że nie stosowano żadnego reportera rekombinacji położonego na tym chromosomie.

Konkluzja

Niezależnie od przedstawionych uwag, nie mam wątpliwości, że w swojej rozprawie doktorskiej mgr Longfei Zhu podjął istotny problem badawczy oraz przedstawił w sposób satysfakcjonujący jego oryginalne rozwiązanie. W mojej ocenie niniejsza rozprawa spełnia warunki określone przepisami Ustawy z dn. 20.07.2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, stąd wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Longfeia Zhu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

.....*Agnieszka Żmienko*.....

Dr hab. Agnieszka Żmienko, prof. IChB PAN