



Poznań, 02.09.2020

Dr hab. Piotr Ziółkowski, prof. UAM
Pracownia Biologii Genomu
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Hus pt. „Wykorzystanie systemu ukierunkowanej mutagenazy CRISPR/Cas9 w edycji i badaniach genomów *Brachypodium distachyon* i *B. hybridum*”

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hus było wprowadzenie systemu ukierunkowanej mutagenazy z użyciem technologii CRISPR/Cas9 do badań *Brachypodium distachyon* oraz *B. hybridum*. W związku z rosnącym znaczeniem technologii edycji genomów CRISPR/Cas9, a także stosunkowo ubogimi kolekcjami mutantów uzyskanych w toku mutagenazy przypadkowej dla rodzaju *Brachypodium* podjęcie takiej tematyki jest jak najbardziej uzasadnione. Co więcej, autorka postanowiła zastosować ten system do badań funkcji genów będących homologami *CDKG1* i *CDKG2* u *A. thaliana* w kontroli parowania chromosomów i rekombinacji homeologicznej w mejozie. Ten aspekt pracy Pani Hus nie wybrzmiał w tytule, zapewne ze względu na uzyskanie wyników niezgodnych z oczekiwaniami, co jednak nie umniejsza jego rangi.

Praca Pani mgr Hus ma typową dla dysertacji doktorskich strukturę obejmującą Wstęp, wydzieloną część opisującą Cel badań, następnie Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusję i Wnioski. Ponadto autorka opatrzyła pracę Wykazem skrótów, Streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz Spisem literatury.

Zastanawiający, a raczej dość przypadkowy, wydaje się dobór terminów do listy skrótów. Nawet recenzent powinien bowiem wiedzieć, że ‘pz’ oznacza ‘pary zasad’, natomiast ‘kpz’ – ‘tysiące par zasad’. Z kolei Doktorantka nie zająknęła się nad skrótami takimi jak ‘CRISPR’, ‘Cas9’, ‘GFP’, czy ‘Ph1’, których wyjaśnień na próżno szukać nie tylko w spisie skrótów, ale też w samej pracy.

Wstęp został napisany w sposób bardzo przejrzysty, przystępnym i klarownym językiem. Nie udało mi się znaleźć ani jednego błędu gramatycznego czy też stylistycznego, co świadczy o bardzo starannym podejściu Doktorantki do przygotowania dysertacji. Wstęp jest dobrze ustrukturyzowany a poszczególne podrozdziały ułożone są w kolejności od najbardziej ogólnych do szczegółowych. Zawartość merytoryczna Wstępu została dobrze przemyślana, Doktorantka omawia wszystkie zagadnienia, które są ważne dla zrozumienia przedmiotu jej

1

badania. Szczególnie wnikliwie omawiane są zagadnienia związane z technikami transformacji gatunków *Brachypodium*, co jest zrozumiałe biorąc pod uwagę fakt, że techniki te nie są łatwe i nie tak wydajne jak w przypadku *Arabidopsis thaliana*, a Doktorantka poświęciła wiele czasu by zoptymalizować ją na potrzeby realizacji swojego projektu doktorskiego. Dość skromnie w tym kontekście wygląda omówienie systemu CRISPR-Cas9 (1,5 strony), który przecież stanowił podstawową metodę i główne wyzwanie zastosowane w pracy. Uważam, że można było nieco szerzej omówić aplikacje tego systemu, czy też różne jego wersje obecnie szeroko stosowane, szczególnie w badaniach człowieka. Moim zdaniem pewną niezręcznością jest też brak choćby krótkiego uzasadnienia podejmowania we Wstępie danego zagadnienia. Na przykład po podrozdziale, w którym opisywany jest system CRISPR-Cas9, ni stąd ni zowąd pojawia się rozdział traktujący o desaturacji fitoenu i syntezie karotenoidów. O ile po przeczytaniu całości pracy sens umieszczenia takiego podrozdziału, właśnie w tym miejscu, wydaje się jak najbardziej zrozumiały, o tyle w trakcie pierwszego czytania zdaje się być bardzo przypadkowy, wywołujący pewną dezorientację czytelnika. Myślę, że rozpoczęcie każdej nowej tematycznie sekcji jednozdaniowym wyjaśnieniem jej celu, wpłynęłoby pozytywnie na odbiór pracy.

W przypadku umocowanych we Wstępie rozważań na temat wpływu homologów *Ph1* na powstawanie crossing-over brak jest właściwego wprowadzenia opisującego samo zjawisko, przez co pojawiające się w toku tego podrozdziału odniesienia do białek ZMM czy crossing-over klasy I mogą być niezrozumiałe dla czytelnika. Analogicznie, moim zdaniem nie jest właściwie nakreślony problem z parowaniem chromosomów homeologicznych u pszenicy, ani też nawet czym są chromosomy homeologiczne – wyjaśnienie znajduje się dopiero w końcowej części Dyskusji. Z kolei omówienie kinaz CDKG1 i 2 jest zbyt szczegółowe zamiast odnosić się wyłącznie do ich roli w temacie parowania chromosomów homeologicznych, zwłaszcza że w pracy nie zostały podjęte próby scharakteryzowania innych cech fenotypowych otrzymanych mutantów poza aspektami związanymi z podziałem mejotycznym. Trzeba jednak zaznaczyć, że są to drobne zastrzeżenia, będące wynikiem moich subiektywnych odczuć na temat tego, co i w jakim zakresie we Wstępie powinno się znaleźć, które nie mają wpływu na moją wysoką ocenę sposobu przygotowania Wstępu.

Cel pracy został opatrzony krótkim wprowadzeniem wyjaśniającym zasadność podjętych badań oraz podstawowe założenia (dotyczące roli genów *CDKG1/2* w procesie parowania chromosomów). Same cele zostały trafnie określone, są dobrze zdefiniowane i zbieżne z tematem pracy; do tej części dysertacji nie mam żadnych zastrzeżeń.

Z kolei Materiały i Metody są jednymi z najbardziej szczegółowo opisanych, jakie kiedykolwiek miałem okazję czytać. To bardzo dobrze, biorąc pod uwagę fakt, że jednym z najważniejszych efektów tej pracy jest właśnie dopracowana metodyka badawcza. Nie oznacza to, że nie znajdziemy w tej części pracy kilku drobiazków, do których krytyczne oko recenzenta nie powinno się doczepić. Przykładowo, Doktorantka przy wszystkich technikach z zakresu biologii

molekularnej podaje użyte w reakcji objętości poszczególnych buforów, enzymów i substratów, nie zawsze jednak pamięta by podać ich stężenia. Również stosowane przez Doktorantkę podawanie prędkości wirowania prób w obrotach na minutę należy uznać za nieprecyzyjne, ponieważ wydajność sedymentacji zależy od siły odśrodkowej, a ta będzie różna dla tej samej prędkości obrotów w zależności od promienia zastosowanego rotora. Trzeba jednak podkreślić, że są to uchybienia drobne, które nie wpłyną na możliwość odtworzenia eksperymentów przeprowadzonych przez Panią Karolinę, co stanowi przecież podstawowe założenie przygotowywania rozdziału Materiały i Metody w pracach dyplomowych.

Rozdział Wyniki rozpoczyna się krótkim podsumowaniem badań prezentowanych w pracy, w którym Kandydatka do stopnia doktora wyjaśnia w jakim celu podejmowane były poszczególne zadania badawcze. Następnie Doktorantka przechodzi do bardziej dokładnego ich omówienia w poszczególnych podrozdziałach. Z dużą szczegółowością opisywane są wszystkie mutanty uzyskane przy zastosowaniu techniki CRISPR-Cas9. Badanie parowania chromosomów w mejozie jest wykonane z użyciem analiz cytologicznych. Na szczególne uznanie zasługują eksperymenty wykonane na allotetraploidzie *B. hybridum*, gdzie dla rozróżnienia obu subgenomów zastosowano technikę FISH. Uzyskane w ten sposób wyniki są bardzo czytelne i świadczą o znakomitym warsztacie badawczym. To, czego mi w tym rozdziale zabrakło, to szczegółowego opisu identyfikacji genów *CDKG1* i *CDKG2* u *Brachypodium*, analizy porównawczej z ich homologami u *A. thaliana* oraz w locus *Ph1* pszenicy i omówienia wzajemnych relacji filogenetycznych. Praca opierała się na założeniu, że homologi tych genów będą jednocześnie ich ortologami funkcjonalnymi, dlatego tego typu analiza byłaby jak najbardziej pożądana. Ponadto przydałaby się tabela obrazująca otrzymane przez Doktorantkę wydajności transformacji roślin oraz wydajności mutagenyzy.

Dyskusja podzielona jest na kilka podrozdziałów, z których pierwszy dotyczy aspektów metodycznych pracy, natomiast ostatni dotyczy aspektu badawczego związanego z poznawaniem funkcji genów *CDKG1* i *CDKG2* w parowaniu chromosomów w mejozie. Jest ona napisana w sposób dojrzały i pojawiają się w niej wszystkie aspekty wymagające przedyskutowania w świetle uzyskanych wyników. Wnioski są dobrze przemyślane i trafne. Mam jednak pewne zastrzeżenia do wniosku nr 3, w którym Kandydatka konkluduje na temat skutków aktywności Cas9: Trzeba pamiętać, że nukleaza ta dokonuje jedynie podwójnego cięcia DNA, natomiast od mechanizmów naprawczych zależy, czy dojdzie do powstania mutacji, czy też naprawa będzie bezbłędna. Co więcej, Cas9 będzie dopóty przecinał substrat, dopóki na skutek mutacji nie zaniknie sekwencja komplementarna do gRNA. Zdecydowana większość cięć jest prawidłowo naprawiana, a jedynie wielokrotność tego procesu skutkuje ujawnianiem się mutacji opisanych przez Doktorantkę. Zatem sformułowany przez Kandydatkę wniosek można więc rozpatrywać jako poprawny jedynie w kategorii pewnego skrótu myślowego.

Z technicznych aspektów przygotowania pracy niepotrzebne wydaje mi się przedstawianie każdej ilustracji aż na trzech stronach, gdzie pierwsza zawiera wyłącznie numer takiej tablicy, druga jej opis, a dopiero trzecia prezentuje samą ilustrację. Praca jest napisana ładną polszczyzną, a żargon laboratoryjny pojawia się w niej bardzo rzadko (np. przy opisach wyników elektroforezy Doktorantka używa terminu „prążek” zamiast poprawnego terminu „fragment”).

Pod względem merytorycznym pracę oceniam bardzo wysoko. Sam projekt doktorski jest świetnie przemyślany i w zasadzie doskonale zrealizowany. Doktorantka skutecznie zaprezentowała działanie systemu CRISPR-Cas9 do specyficznej inaktywacji genów w dwóch gatunkach *Brachypodium*. O ile dla *B. distachyon* technika ta była już wcześniej stosowana, dotąd nie podjęto się jej wykorzystania u *B. hybridum*. Co ważniejsze, technika CRISPR-Cas9 wciąż jest traktowana jako swego rodzaju *novum*, a jej zastosowanie nie jest wbrew pozorom łatwe w przypadku roślin innych niż *A. thaliana*. Niewiele też jest publikacji, w których technika ta została z powodzeniem użyta w badaniach. Doktorantce udało się wprowadzić ją do repertuaru technik stosowanych w zespole prof. Hasteroka i opublikować protokół dotyczący jej użycia w poważnym czasopiśmie naukowym. Pani Karolina zastosowała kilka różnych wektorów do transformacji roślin, eksperymentalnie stwierdziła ograniczoną przydatność badania przesiewowego opartego na transformacji protoplastów oraz przetestowała możliwość jednoczesnego uszkodzenia dwóch nieallelicznych loci przy użyciu konstruktów z dwoma różnymi gRNA. Wysoka skuteczność mutagenyzy w wykonaniu Pani mgr Kus potwierdza, iż uzyskanie tych mutantów nie było dziełem szczęśliwego przypadku czy zbiegu okoliczności, ale rezultatem znakomicie opanowanej techniki badawczej.

Sam dobór genów użytych do mutagenyzy uważam za znakomity. Najpierw Doktorantka testowała swego rodzaju układ kontrolny, jakim był gen *PDS* kodujący desaturazę fitoenu. Jest to świetny wybór, ponieważ mutanty *pds* charakteryzują się silnym fenotypem, umożliwiającym ich natychmiastową detekcję wizualną. Dzięki temu łatwo można było sprawdzić, czy wszystkie elementy systemu CRISPR-Cas9 działają zgodnie z oczekiwaniami. Następnie Doktorantka skupiła się na dwóch genach kodujących kinazy cyklinozależne, co do których istniało uzasadnione przypuszczenie, iż uczestniczą one w parowaniu chromosomów homologicznych w mejozie. Podjęcie tego tematu jest niezwykle istotne z perspektywy badań roślin w rodzinie traw, ponieważ ekonomicznie najważniejszy w warunkach Europejskich i jeden z najważniejszych w skali światowej przedstawiciel tej rodziny – pszenica zwyczajna – jest alloheksaploidem. Zrozumienie mechanizmu parowania chromosomów homologicznych leżące u podstaw prawidłowej rekombinacji chromosomów w mejozie, a także poznanie, w jaki sposób kontrolowane jest parowanie chromosomów homeologicznych, pochodzących z różnych subgenomów pszenicznych, byłoby prawdziwym przełomem w nauce i z pewnością umożliwiłoby rozwój nowych strategii hodowlanych. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wykluczyły model, w którym homologi kinaz cyklinozależnych występujących w locus *Ph1* pszenicy pełnią analogiczną funkcję u *Brachypodium*.

Na koniec chciałbym skierować do Doktorantki kilka pytań dotyczących pracy prosząc o odpowiedź w trakcie publicznej części obrony doktorskiej:

1. Detekcja mutacji opierała się na zastosowaniu analizy restrykcyjnej produktów reakcji PCR, czyli w zasadzie markerów typu CAPS. Z mojego doświadczenia wygodniejsze jest użycie markerów typu indel poprzez zastosowanie pary gRNA targetujących Cas9 w niewielkiej odległości od siebie, w tym samym genie. W ten sposób dochodzi do powstawania dłuższych delecji, których wykrycie nie wymaga użycia enzymów restrykcyjnych. Zaletą takiego podejścia jest również brak konieczności szukania sekwencji gRNA/PAM obejmujących miejsce restrykcyjne, a także możliwość całkowitego usunięcia genu. Czy Doktorantka brała takie rozwiązanie pod uwagę, czy były może inne przyczyny, dla których nie zostało ono zastosowane?
2. Doktorantka podjęła próbę jednoczesnego wyłączenia obu genów *CDKG* przy zastosowaniu pary gRNA u *B. hybridum*, jednak zakończyła się ona niepowodzeniem. Czy można zaproponować inny sposób uzyskania podwójnego mutantu?
3. Chociaż technika CRISPR-Cas9 jest znacznie bardziej precyzyjna aniżeli TALENS czy ZNF, to jednak i w jej przypadku może dochodzić do nieplanowanych modyfikacji genomu (mutacje 'off-target'). Jak Doktorantka słusznie zauważyła, przeszukanie całego genomu wzgl. sekwencji gRNA powinno zminimalizować ryzyko ich wystąpienia. Jednak nawet w przypadku *A. thaliana* pewna część genomu pozostaje niezsekwencjonowana a powstawanie modyfikacji off-target może zachodzić także dla nie do końca dopasowanych sekwencji, choć zapewne z mniejszą wydajnością. Czy Doktorantka może zaproponować sposób eliminacji potencjalnych mutacji off-target możliwy do zastosowania w przypadku *Brachypodium*?
4. Na stronie 194 Dyskusji pojawia się zdanie: „Chociaż najbardziej optymalne wydaje się projektowanie sekwencji gRNA w obrębie pierwszego eksonu, przedstawione w niniejszej pracy wyniki, jak również dane literaturowe (Shan i in., 2013b, Odipio i in., 2017) jasno pokazują, iż edycja innych eksonów również może być użyteczna w badaniach z zakresu genomiki funkcjonalnej.” Prosiłbym Doktorantkę o wskazanie, na co należałoby zwrócić uwagę analizując mutanty genów, w których edycja nastąpiła w ich końcowej części?
5. Zastosowany w badaniach gatunek *B. hybridum* jest allotetraploidem powstałym w wyniku hybrydyzacji *B. distachyon* ($2n=10$) i *B. stacei* ($2n=20$) i został w pracy użyty jako roślina modelowa w stosunku do heksaploidalnej pszenicy. W obu przypadkach praktycznie nie dochodzi do parowania chromosomów homeologicznych w mejozie. Prosiłbym o porównanie na ile genomy A, B i D pszenicy oraz dwa homeologiczne genomy *Brachypodium* można ze sobą porównywać. Czy wiadomo jak odległe ewolucyjnie są *B. distachyon* i *B. stacei*?



W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Karoliny Hus pt. „Wykorzystanie systemu ukierunkowanej mutagenezy CRISPR/Cas9 w edycji i badaniach genomów *Brachypodium distachyon* i *B. hybridum*” w pełni spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, który stanowi, że przewody doktorskie, (...), wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art. 1, są przeprowadzane na zasadach dotychczasowych, z tym że jeżeli nadanie stopnia doktora, (...), następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień (...) nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Karoliny Hus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Ziółkowski