



Poznań, 7.05.2018

Dr hab. Piotr Ziółkowski
Zakład Biologii Genomu
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Samelak-Czajki pt. „Adaptacja i zastosowanie multipleksowej zależnej od ligacji amplifikacji sond oraz emulsyjnego PCR w badaniach populacyjnych polimorfizmu liczby kopii DNA u roślin, na przykładzie modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*”

Praca doktorska Pani mgr Anny Samelak-Czajki dotyczy zagadnień związanych z analizą polimorfizmu liczby kopii DNA u roślin. Podjęcie takiej tematyki znajduje swoje uzasadnienie ze względu na ograniczoną wiedzę na temat polimorfizmu CNV u roślin, w porównaniu z badaniami na modelu ludzkim. Warto podkreślić, że zagadnienie to wydaje się być szczególnie istotne dla roślin, które wykazują olbrzymią plastyczność genomu i większą aniżeli zwierzęta odporność na zmiany struktury materiału genetycznego. Szczególny nacisk w prezentowanej pracy położony został na aspekt metodyczny. W mojej opinii jest to dobry kierunek, ponieważ pomimo znacznego postępu w poznawaniu budowy genomów analiza sekwencji powtarzających się, a do takich należy zaliczyć polimorfizm liczby kopii, wciąż stanowi wyzwanie dla badaczy, zwłaszcza w ujęciu populacyjnym, w którym badanych i porównywanych jest wiele ekotypów/odmian. Z tych właśnie względów uważam, że tematyka rozprawy została dobrze dobrana, będąc oryginalną i jednocześnie ważną z poznawczego punktu widzenia. Temat pracy precyzyjnie określa przedmiot dociekań, i chociaż wydaje się stosunkowo długi, wynika to z wielocłonowych nazw zastosowanych technik badawczych.

Rozprawa została przygotowana w formie zbioru trzech artykułów: jest to jeden artykuł przeglądowy oraz dwie prace oryginalne. Wszystkie trzy prace opublikowano w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej, tj. *Theoretical and Advanced Genetics*, *Frontiers in Plant Science* oraz *BMC Genomics*. Publikacje poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim, a także skrócony opis wyników pracy doktorskiej. Do rozprawy dołączono również oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w przygotowaniu poszczególnych publikacji.

Praca przeglądowa w *Theoretical and Advanced Genetics* stanowi gruntowną analizę zarówno technik, jak i dotychczasowych dokonań z zakresu polimorfizmu liczby kopii u roślin. W pierwszej części autorzy pokrótce omawiają podejścia molekularne służące ocenie

polimorfizmu CNV, by za chwilę przejść do wnikliwej i wielopłaszczyznowej oceny tego fenomenu u roślin w skali populacyjnej. Poza przeglądem dokonań różnych zespołów na tym polu, autorzy szerzej zatrzymują się nad znaczeniem polimorfizmu CNV w ewolucji genów roślinnych, kładąc szczególny nacisk na charakterystykę regionów chromosomowych/genów szczególnie podatnych na CNV oraz poznane dotychczas przykłady wpływu CNV na adaptację środowiskową i selekcję w procesie hodowli roślin. Praca została bardzo entuzjastycznie przyjęta przez środowisko naukowe, o czym świadczy bardzo duża jak na tematykę roślinną liczba cytowani – 78 według *Google Scholar*. Na uwagę zasługują również obszerne tabele zamieszczone w tej pracy, które wedle oświadczeń autorów zostały sporządzone przez Kandydatkę. Ponadto, Doktorantka wyszukiwała i opracowywała dane związane z badaniami zmienności liczby kopii u roślin. Podsumowując wydaje się, że udział Doktorantki w przygotowaniu tej pracy był istotny, choć zapewne kluczową rolę odegrał w tym przypadku pierwszy autor publikacji.

Drugi artykuł ma charakter metodyczny i został opublikowany we *Frontiers in Plant Science*. Praca stanowi szczegółowy protokół przeprowadzania analiz przy użyciu techniki MLPA. Na uwagę zasługuje fakt optymalizacji tego protokołu w bardzo przystępny sposób, umożliwiając jego zastosowanie również przez osoby niebędące specjalistami w zakresie biologii molekularnej. W tym celu do protokołu dołączono szereg użytecznych narzędzi, np. skoroszyt Excel pozwalający na półautomatyczne projektowanie sond molekularnych na potrzeby techniki MLPA. Zaprezentowane w protokole dane w sekcji „Anticipated results” zostały dobrze zaplanowane obejmując zarówno zestawy genów niewykazujących zmienności liczby kopii, następnie zestawy bialleliczne pod kątem liczby kopii oraz zestawy multialleliczne. Sprawdzono zostało również jaki wpływ na wyniki ma obecność dodatkowych, niespecyficznych miejsc wiązania sond. Zaprezentowane przykłady dobrze korespondują do potencjalnych sytuacji eksperymentalnych, w których mogą znaleźć się użytkownicy techniki MLPA. W tej pracy Pani mgr Anna Samelak-Czajka jest pierwszym autorem, co samo w sobie podkreśla jej wkład w przygotowanie publikacji. Z informacji zawartych w artykule możemy dowiedzieć się również, że Doktorantka odpowiadała za przygotowanie prób DNA, przeprowadzenie doświadczeń MLPA, ich analizę, oraz przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu.

Ostatni artykuł włączony do rozprawy doktorskiej ukazał się w *BMC Genetics*. Przedstawiono w nim analizę polimorfizmów CNV dla regionu ok. 26 kbp, obejmującego 5 genów. Zastosowano dwa różne, komplementarne podejścia badawcze: analizę MLPA oraz technikę emulsyjnego PCR, a zbadano niemalą liczbę 189 linii *Arabidopsis thaliana*. Dodatkowo, autorzy przeprowadzili analizy filogenetyczne stwierdzając, że opisywane przez nich polimorfizmy liczby kopii zachodziły wielokrotnie i niezależnie w różnych liniach. Ważnym moim zdaniem osiągnięciem jest bardzo wnikliwa analiza regionu CNV_611 zawierającego geny *AT3G18530* i *AT3G18535* w kontekście mechanizmów jego powstawania/usuwania w populacjach *A. thaliana*. Autorom udało się odtworzyć te procesy a weryfikacja



eksperymentalna punktów rekombinacji („breakpointów”) w pełni potwierdziła postawione hipotezy. Wynik ten jest ważny dla pogłębienia naszego zrozumienia praw rządzących ewolucją genomów roślinnych. Udział doktorantki w przygotowaniu pracy oceniłbym jako bardzo znaczący, polegał on na izolacji DNA ze wszystkich linii, przeprowadzeniu doświadczeń MLPA jak i ddPCR, współanalizie otrzymanych wyników a także przygotowaniu materiału do analiz SNP.

Żadnych wątpliwości nie budzi również to, że włączone do rozprawy doktorskiej artykuły stanowią zbiór spójny pod względem tematycznym. Bardzo podoba mi się fakt, że każda z trzech publikacji ma zupełnie inny charakter: pierwsza praca jest pracą przeglądową, w której Doktorantka wraz z Kolegami przedstawia problem badawczy związany z polimorfizmem liczby kopii w genomach roślinnych. Ta praca stanowi odpowiednik wstępu w tradycyjnej pracy doktorskiej. Druga praca ma charakter czysto metodyczny i jest niejako odpowiednikiem rozdziału *Materiały i Metody* w konwencjonalnej dysertacji doktorskiej. Trzeba jednak podkreślić jej dodatkowy wymiar związany z opracowaniem użytecznego protokołu doświadczeń MLPA. Nie jest to zatem odtwórcze zastosowanie opublikowanej wcześniej techniki, ale jej daleko idąca adaptacja i optymalizacja na potrzeby konkretnego zadania badawczego wymagająca jej głębokiego zrozumienia. Ostatnia praca jest z kolei ekwiwalentem części wynikowej rozpraw doktorskich, ponieważ stanowi eksperymentalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Można zatem powiedzieć, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi zbiór publikacji naukowych, które jednocześnie układają się w strukturę organizacyjną konwencjonalnej pracy doktorskiej.

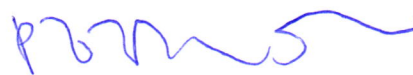
Przedstawione publikacje z całą pewnością zostały szczegółowo ocenione przez edytorów/recenzentów renomowanych periodyków, w których się ukazały, trudno więc dopatrzyć się jakichkolwiek uchybień w materiałach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Niemniej w trakcie studiowania prac nasunęło mi się kilka pytań, które chciałbym zadać Doktorantce podczas obrony doktorskiej:

1) W pracy przeglądowej Doktorantka omówiła podejścia jakie są stosowane w analizie polimorfizmu liczby kopii. Praca ta jednak powstała stosunkowo dawno, w roku 2012. W międzyczasie bardzo dynamicznie rozwinęły się różnego rodzaju wariacje na temat technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego, włączając w to sekwencjonowanie nacelowane (ang. targeted sequencing). Czy Doktorantka mogłaby pokrótce podzielić się swoimi przemyśleniami w zakresie potencjalnego zastosowania tych podejść do analizy polimorfizmu liczby kopii?

2) Jakie inne zastosowania, poza badaniami CNV, widzi Kandydatka w odniesieniu do metod MLPV i ddPCR? Przy roślinach transgenicznym często stosuje się technikę hybrydyzacji Southerna do ustalenia liczby kopii transgeny. Czy metody studiowane przez Doktorantkę mogłyby stanowić alternatywę dla tej relatywnie niedokładnej techniki?

3) W ostatniej pracy zaprezentowanej w *BMC Genetics* do analizy polimorfizmów CNV wybrano grupę genów z chromosomu 3. Obejmuje ona trzy geny wykazujące polimorfizm liczby kopii – *MSH2*, *AT3G18530* i *AT3G18535*. O ile *MSH2* jest ważnym elementem systemu naprawy niedopasowań DNA, wedle mojej wiedzy nie istnieją przesłanki, które mogłyby wskazywać na znaczenie polimorfizmu tego genu w ewolucji eukariontów. Dwa pozostałe geny w ogóle są bardzo słabo poznane. Zastanawiam się zatem, skąd właśnie taki wybór obiektu badań – w publikacji uzasadnienie jest dość zdawkowe. Czy nie bardziej interesujące byłoby wybranie grupy genów, u których polimorfizm CNV ma dobrze umocowane w naszej wiedzy implikacje dla ewolucji, np. geny odporności na patogeny?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Anny Samelak-Czajki pt. „Adaptacja i zastosowanie multipleksowej zależnej od ligacji amplifikacji sond oraz emulsyjnego PCR w badaniach populacyjnych polimorfizmu liczby kopii DNA u roślin, na przykładzie modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Anny Samelak-Czajki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy i oryginalność zaprezentowanych wyników wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.



Piotr Ziółkowski