



Poznań, 12.09.2022

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Morończyk
pt. „Rola acetylacji histonów w epigenetycznej regulacji somatycznej embriogenezy u
Arabidopsis thaliana”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani Joanny Morończyk dotyczy szeroko badanego w zespole Pani Prof. Gaj zagadnienia regulacji ekspresji genów związanych z somatyczną embriogenezą roślin. Zrozumienie mechanizmów rządzących regulacją tego procesu ma duże znaczenie aplikacyjne, ponieważ metoda ta jest z powodzeniem wykorzystywana m.in. w propagacji roślin ozdobnych, niektórych gatunków drzew iglastych, czy regeneracji roślin transgenicznych. Wnikliwe poznanie przebiegu embriogenezy somatycznej (ES) może przyczynić się do obniżenia kosztów jej stosowania a co za tym idzie, dalszej komercjalizacji tej metody. W szczególności, Kandydatka do stopnia naukowego doktora podjęła się zbadania wpływu acetylacji histonów H3 i H4 na zachodzenie ES. Dotychczasowa wiedza na ten temat jest stosunkowo uboga, biorąc więc pod uwagę fakt, że acetylacja histonów jest ważnym elementem ko-aktywacji transkrypcyjnej genów, wybranie takiego właśnie zagadnienia jako tematu rozprawy doktorskiej uważam za bardzo celne i naukowo intrygujące.

Rozprawa ma postać zbioru czterech prac oryginalnych, w których Pani Morończyk odgrywa rolę pierwszego, drugiego (dwukrotnie) lub trzeciego autora. Prace ukazały się w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej: dwa z nich w *Cells*, jeden w *International Journal of Molecular Sciences* oraz jeden we *Frontiers in Plant Science*. Ponieważ publikacje są wieloautorskie, Kandydatka opatrzyła całą rozprawę autoreferatem, w którym opisane i pokrótce przedyskutowane są wyniki uzyskane w trakcie doktoratu. Autoreferat obejmuje także wprowadzenie, klarownie zdefiniowane cele pracy, a także, co jest dość nietypowe w przypadku rozpraw będących zbiorami publikacji, opis materiałów i metod. Uważam zresztą takie rozwiązanie za bardzo dobre, ponieważ w samych publikacjach uwzględnione są również te metody, które nie były osobiście stosowane przez Doktorantkę; pozwala więc to recenzentowi na lepsze poznanie warsztatu metodycznego, z którym Kandydat do stopnia doktora się zapoznał w trakcie swojej pracy. Ponadto autoreferat zawiera podsumowanie wraz z perspektywami oraz odrębnie opisane wnioski. Ogólnie autoreferat napisany jest bardzo dobrze i przejrzysto, ładnym językiem i z dużą dbałością o styl wypowiedzi. Z racji mojej roli

1

recenzenta rozprawy pozwolę sobie wypunktować kilka elementów, do których mam pewne zastrzeżenia:

1. Definicja pojęcia „epigenetyka”, znajdująca się na stronie 6, jest niekompletna. O ile istotnie, epigenetyka dotyczy mechanizmów regulacji ekspresji genów nie wynikających ze zmian w sekwencji DNA, to należy dodać, że zmiany epigenetyczne mogą być przekazywane w kolejnych pokoleniach komórek; bez tego uszczegółowienia również działanie czynników transkrypcyjnych należałoby traktować jako elementy regulacji epigenetycznej, a przecież w powszechnym rozumieniu tak ich nie klasyfikujemy. Warto by także dodać, że zmiany epigenetyczne, w przeciwieństwie do zmian genetycznych, mogą być, i często są, w pełni odwracalne.
2. We wprowadzeniu opisane zostały dość szczegółowo czynniki transkrypcyjne istotne w kontroli ES, zabrakło mi natomiast choćby pobieżnej charakterystyki używanych w pracy mutantów genów acetylotransferaz histonowych z przypisaniem do poszczególnych rodzin.
3. O ile większość wniosków nie budzi u mnie poważniejszych zastrzeżeń merytorycznych, to wniosek 3.2., w którym Autorka stwierdza, że „Specyficzny dla genu mechanizm działania HAT/HDAC w SE wymaga badań” jest truizmem, mógłby więc być śmiało pominięty.

W dalszej części swojej pracy Kandydatka do stopnia doktora zamieściła kopie artykułów, które wchodziły w skład jej pracy doktorskiej. Nie do końca rozumiem, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na uporządkowanie prac stanowiących jej dorobek zaczynając od najnowszej pracy a następnie przedstawiając prace wcześniejsze. Bardziej logiczny dla mnie wydawałby się układ chronologiczny, gdyż jak to z reguły w takich sytuacjach bywa, późniejsze prace opierają się na wcześniej uzyskanych wynikach; w takiej też kolejności omówię pokrótce te publikacje.

W pracy Wójcikowska i in. (2018) autorzy badają wpływ trychostatyny A (TSA), specyficznego inhibitora deacetylaz histonowych, na ES u *Arabidopsis*. Najpierw przeprowadzają wnikliwe doświadczenia z wykorzystaniem techniki SEM by potwierdzić stymulujący efekt tego czynnika w ES pod nieobecność auksyn. Poprzez testy enzymatyczne pokazują, że efekt ten jest związany ze spadkiem aktywności zarówno acetylotransferaz histonowych, jak i deacetylaz. Dalsze analizy wykazały, że TSA powoduje wzrost poziomu indoli, który z reguły jest związany z produkcją auksyn. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że TSA działa w embriogenezie w sposób zależny od auksyn. Zgodnie z tą hipotezą, zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów syntezy auksyn. Wyniki zawarte w tej pracy dość zgodnie wskazują na właśnie taki mechanizm indukcji SE w próbach traktowanych TSA.

W pracy pokazano, że jednoczesne traktowanie eksplantatów auksyną i TSA powodowało inhibicję embriogenezy, i że było to związane z represją transkrypcji genów kluczowych dla SE. Ponieważ auksyna jest fitohormonem kluczowym dla indukcji SE, wydawać by się mogło, że jednoczesne traktowanie eksplantatów zarówno TSA jak i 2,4-D w pewnych zakresach stężeń powinno stymulować SE, a przynajmniej jej nie hamować. Prosiłbym zatem Doktorantkę o zaproponowanie wyjaśnienia tej obserwacji.

Kolejne dwie publikacje, Nowak i in. (2020 i 2022), koncentrują się na opisanu regulacji SE na poziomie specyficznych czynników transkrypcyjnych oraz modulacji tego procesu przez microRNA. W pierwszej z nich autorzy zbadali zależność pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym AGL15 a miR156 w kulturach embriogenicznych Arabidopsis. Wykazano, że AGL15 stymuluje ekspresję genu kodującego miR156 a jednocześnie hamuje transkrypcję genów kluczowych dla biogenezy miRNA. W przypadku tego drugiego aspektu aktywności AGL15 autorzy udowodnili również jego współdziałanie z elementami kontrolującymi aktywność deacetylaz histonowych, wiążąc w ten sposób różne poziomy kontroli indukcji embriogenezy somatycznej. W drugiej pracy studiowana jest szerszej roli innej rodziny microRNA, mianowicie miR172, w regulacji genów bezpośrednio związanych z odpowiedzią embriogeniczną. W szczególności opisano szlak, w którym miR172 wpływa na poziom czynnika transkrypcyjnego AP2, a ten z kolei odpowiada za represję transkrypcyjną jednego z kluczowych dla ES genów, tj. *WUS*. Dzięki zastosowaniu mutantów deacetylaz histonowych oraz analizom ChIP-qPCR autorzy pokazali również, że w miR172/AP2-zależnych zmianach ekspresji *WUS* uczestniczą również zmiany poziomu acetylacji H3 w promotorze tego genu.

W przypadku tej pracy autorzy proponują model, w którym regulacja *WUS* obejmuje zależną od AP2 rekrutację komponentów kompleksu SIN3/HDAC, co skutkuje deacetylacją histonów w obrębie genu. Hipoteza ta opiera się jednak jedynie na obserwacjach podobnego kierunku zmian w ekspresji *WUS* pod wpływem zmian ekspresji *AP2*, mutacjach komponentów SIN3/HDAC i poziomów acetylacji H3 w obrębie genu *WUS*. Czy zatem nie jest możliwe, że opisany przez autorów szlak regulacyjny opiera się na wcześniej scharakteryzowanym mechanizmie, w którym uczestniczą ko-represory TPL (na co, notabene, dowody przedstawiają w swej pracy autorzy), a zmiany acetylacji histonów w obrębie genu *WUS* zachodzą wprawdzie równolegle, lecz niezależnie od opisanego szlaku?

W publikacji Morończyk i in. (2022) autorzy przedstawiają wnikliwą charakterystykę zmian w poziomie acetylacji histonów H3 i H4 w trakcie indukcji SE w odpowiedzi na auksynę i trichostatynę TSA. Do tego celu stosują zarówno podejścia całogenomowe (ELISA i eseje immunohistochemiczne), jak i specyficzne dla wybranych, kluczowych dla tego procesu genów (poprzez ChIP-qPCR). Uzyskane na obu tych poziomach wyniki pokazują, że proces SE jest związany z istotnymi zmianami w acetylacji obu histonów i w większości przypadków indukcja SE zasocjowana jest ze wzrostem acetylacji tych histonów. Potwierdzeniem tego rezultatu w oparciu o „genetykę odwrotną” (ang. *reverse genetics*) jest charakterystyka wydajności i

produktywności SE w tle mutantów genów kodujących wybrane podjednostki acetylotransferaz histonowych: Spośród 13 przetestowanych mutantów, aż w sześciu zaobserwowano spadek potencjału embriogenicznego. Natomiast dla dwóch mutantów, *hag1-5* oraz *gcn5-1*, zaobserwowano efekt odwrotny, tj. wzrost odpowiedzi embriogenicznej. W dalszej części autorzy testowali udział deacetylaz histonowych, które katalizują reakcję odwrotną aniżeli acetylotransferazy. Co ciekawe, aż siedem z 16 linii mutantów deacetylaz histonowych wykazywało obniżoną produktywność SE. Z kolei linia z obniżoną ekspresją deacetylaz HDA19 wykazała zwiększony potencjał embriogeniczny.

Wyniki uzyskane dla mutantów tych dwóch grup enzymów o przeciwstawnych funkcjach wydają się sprzeczne, ponieważ w obu przypadkach przeważa spadek potencjału embriogenicznego. Prosiłbym Doktorantkę, by podczas obrony pracy przedstawiła szerzej swoją interpretację tej obserwacji.

Acetylacja histonów jest charakterystycznym i uniwersalnym elementem aktywacji transkrypcyjnej genów u eukariontów. Dlatego bardzo trudne jest jednoznacznie określenie, w jakim stopniu wzrost acetylacji genów jest kluczowy dla ich transkrypcji, a w jakim jest tylko ko-aktywatorem dla precyzyjnych mechanizmów regulatorowych opartych na czynnikach transkrypcyjnych. Acetylacja może również być konsekwencją, a nie przyczyną aktywacji transkrypcyjnej. Prosiłbym Doktorantkę o rozwinięcie tej myśli i przedstawienie swojego punktu widzenia w odniesieniu do własnych badań nad regulacją procesu embriogenezy somatycznej.

Nie mam wątpliwości, że prezentowane przez Doktorantkę prace stanowią spójny tematycznie i wartościowy naukowo cykl. Na podstawie przedstawionych oświadczeń autorów mogę stwierdzić, że jej udział w przygotowaniu tych publikacji był bardzo znaczący. Podsumowując moją recenzję chciałbym podkreślić bogaty i zaawansowany technicznie warsztat metodyczny zastosowany przez Doktorantkę w jej badaniach, szczególnie w odniesieniu do technik z zakresu biologii molekularnej. Duże wrażenie zrobił na mnie również ogrom wykonanej pracy, choćby liczba zbadanych mutantów genów HAC i HDAC jest porażająca. Jest to szczególnie warte podkreślenia w kontekście trudności technicznych związanych ze specyfiką samego materiału i pracochłonnością jego przygotowania na potrzeby doświadczeń.

Nie mam wątpliwości, że w swojej rozprawie Pani mgr Joanny Morończyk podjęła istotny problem badawczy oraz przedstawiła w sposób satysfakcjonujący jego rozwiązanie. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Joanny Morończyk pt. „Rola acetylacji histonów w epigenetycznej regulacji somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym art. 14 ust. 2 pkt.2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, który stanowi, że „w okresie od dnia wejścia w życie ustawy, o której mowa



w art. 1, do dnia 30 kwietnia 2019 r. przewody doktorskie (...) wszczyna się na podstawie przepisów dotychczasowych”. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Joanny Morończyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy i oryginalność zaprezentowanych wyników wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Dr hab. Piotr Ziółkowski, prof. UAM