



Poznań, 5 stycznia 2023 r.

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Dojazd 11, 60-637 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Adrianny Halamy** pt.:  
**„Badania zależności metylacji DNA oraz uszkodzeń i naprawy DNA  
w komórkach *Brachypodium distachyon*”**

Pracę doktorską wykonano w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, na Wydziale Nauk Przyrodniczych w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, a jej promotorem jest Pani dr hab. Jolanta Kwaśniewska, prof. UŚ oraz dr Agnieszka Brąszewska jako promotor pomocniczy. Recenzję pracy wykonano na podstawie uchwały Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, na posiedzeniu w dniu 04.11.2022 r. (pismo z dnia 14 listopada 2022 r.), zawierającej informację o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej, zgodnie z wymogami ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi zbiór opatrzonego komentarzem trzech artykułów naukowych, opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej, które są spójne tematycznie i stanowią podstawę dysertacji, co dopuszcza artykuł 187 wspomnianej wyżej Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.

Prezentowane badania zostały częściowo sfinansowane z Rezerwy Dziekańskiej WNP, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz w ramach programu ‘Inicjatywa Doskonałości Badawczej’ Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Prace naukowe będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej:

- 1) Bara A.W., Brąszewska A., Kwaśniewska J. 2021. DNA methylation – an epigenetic mark in mutagen-treated *Brachypodium distachyon* cells. *Plants* 10, 1408. <https://doi.org/10.3390/plants10071408>;
- 2) Kwaśniewska J., Bara A.W. 2022. Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation - The Past, Current Status, and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms23031306>;
- 3) Bara-Halama A.W., Idziak-Helmcke D., Kwaśniewska J. 2022. Unraveling the DNA Methylation in the rDNA Foci in Mutagen-Induced *Brachypodium distachyon* Micronuclei. *International Journal of Molecular Sciences* 23(12): 6797. <https://doi.org/10.3390/ijms23126797>;

zostały opublikowane w latach 2021-2022 a ich sumaryczny wskaźnik wpływu Impact Factor wg Journal of Citation Reports wynosi 10,403 punktów. Suma punktów Ministerstwa Edukacji



i Nauki wynosi 380. Niestety Doktorantka nie określiła procentowego wkładu w powstanie przedstawionych prac naukowych wynosi, co utrudnia recenzentowi ocenę rzeczywistego udziału w opisanych badaniach. Jednakże z oświadczeń zamieszczonych na stronach 84-86 wynika, że Pani mgr Adrianna Halama brała udział zarówno w przeprowadzeniu części eksperymentalnej badań, jak i w analizie i interpretacji wyników, a także w opracowaniu pierwotnych wersji manuskryptów oraz partycypowała w korektach tekstów prac po recenzjach.

Artykuły naukowe wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej zostały już zrecenzowane na etapie zatwierdzania publikacji do druku. Moja rola jako recenzenta niniejszej rozprawy doktorskiej sprowadza się do oceny formalnej rozprawy doktorskiej a także oceny merytorycznej badań zawartych w rozprawie oraz ich spójności a także oceny tekstu rozprawy doktorskiej, który został przygotowany samodzielnie przez Autorkę.

Praca doktorska Pani mgr Adrianny Halamy zawiera 91 stron i jest uporządkowana według następującego podziału:

- Autoreferat rozprawy, w którego skład wchodzi następujące podrozdziały: Wstęp, Hipotezy i Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki i Dyskusja oraz Literatura;
- Publikacje wchodzące w skład rozprawy;
- Podsumowanie i wnioski;
- Streszczenie w języku polskim i angielskim;
- Oświadczenia autorów.

Rozdział „Wprowadzenie” zawarty na dziewięciu stronach tekstu prezentuje stan wiedzy będącej podstawą przedmiotowej pracy badawczej. Ta część pracy napisana jest bardzo w sposób poprawny i przejrzysty. Na początku Autorka dość krótko, ale za to zwięźle opisała proces metylacji, który jest głównym przedmiotem badań tej pracy doktorskiej. Genomowy DNA można być modyfikowany przez metylację cytozyny (rzadziej adeniny). Miejsca metylacji nie są przypadkowe, a wzór ich występowania jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku, tkanki, a nawet typu komórki i ulega silnym zmianom w trakcie trwania rozwoju. Poziom metylacji zmniejsza się również wraz z rozwojem organizmu. W dorosłych, somatycznych tkankach, jest ona typowa dla rejonów CpG i zachodzi symetrycznie na obu niciach. **W tym miejscu chciałbym zadać następujące pytania:**

- 1) **Jaka jest przyczyna oraz mechanizm prowadzący do metylacji DNA.**
- 2) **Czy zmieniając profil metylacji możemy regulować wrażliwość organizmu na działanie czynników stresowych?**

W tekście wprowadzenia Autorka w sposób umiejętny wykazuje, że proces metylacji, a dokładniej hipermetylacja oraz hipometylacja, są zaangażowane w odpowiedź na stresy środowiskowe (w tym mutageny) i mogą prowadzić do zmian w ekspresji genów. W dalszej kolejności Autorka wymienia poziomy organizacji genomu, na których można obserwować działanie czynników mutagennych. W tym miejscu Autorka poświęca dużo uwagi metodom



wykrywania efektów działania ww. czynników na poziomie chromosomowym (tzw. efekt klastogeny) w szczególności powstawaniu mikrojąder. W tym miejscu automatycznie nasuwają się **dwa pytania o:**

- 1) **definicję i opis efektu klastogennego oraz**
- 2) **motywy, które skłoniły Doktorantkę do badań zależności metylacji DNA oraz uszkodzeń na poziomie chromosomowym a w szczególności w mikrojądrach.**

Podsumowując pierwszą część rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że Autorka kompleksowo i zwięźle przybliżyła czytelnikowi tło rozprawy doktorskiej, choć rozdział ten mógłby w sposób bardziej klarowny przybliżyć przesłanki jakimi kierowała się Autorka w celu analizy związku pomiędzy procesem metylacji a efektem działania mutagenów.

W kolejnym podrozdziale („Hipotezy i Cele Pracy”) Doktorantka zauważa, że ważną rolę w powstawaniu uszkodzeń DNA odgrywa stopień kondensacji chromatyny, który to zależny jest między innymi od metylacji. Autorka stwierdziła, że indukowany stresem wzrost poziomu metylacji DNA może stanowić mechanizm chroniący genom jądrowy przed rearanżacjami. Hipotezy badawcze zostały określone przejrzysto w postaci czterech punktów:

1. Poziom metylacji DNA zmienia się w odpowiedzi genomu jądrowego *Brachypodium distachyon* na działanie wybranych mutagenów chemicznych, a tym samym może odgrywać rolę w powstawaniu i naprawie uszkodzeń DNA.
2. Metylacja/demetylacja DNA prowadząca do zmian w kondensacji chromatyny może stanowić czynnik decydujący o odpowiedzi genomu jądrowego *B. distachyon* na traktowanie mutagenami.
3. Zmiany w poziomie metylacji DNA zależą od rodzaju zastosowanego mutagenu i mechanizmu jego działania.
4. Loci rDNA w poszczególnych mikrojądrach, indukowanych działaniem mutagenów różnią się poziomem metylacji DNA
5. Udział loci rDNA w tworzeniu mikrojąder zależy od obecności zmetylowanego DNA w ich obrębie.

Treść pierwszej hipotezy skłania mnie do zadania następującego pytania: **Jakie było kryterium doboru mutagenów tj. hydrazynu kwasu maleinowego (MH) oraz N-nitrozo-N-metylomocznika (MNU), które zostały zastosowane w pracy badawczej Autorki?**

Rozdział „Materiały i Metody” jest opisany w sposób wyczerpujący i pozwalający w pełni na odtworzenie opisanych badań. Doktorantka w sposób trafny dobrała zarówno materiał roślinny jak i metody indukcji mutagenyzy oraz obserwacji. Szczegółowy sposób opisu metodyki pozwala sądzić, iż Autorka ma rozległą wiedzę oraz umiejętności w prowadzeniu doświadczeń naukowych w zakresie mutagenyzy oraz cytogenetyki molekularnej.



Do tej części pozwoliłem sobie zadać **dwa pytania natury technicznej:**

- 1) W analizach FISH wykorzystano sekwencje 5S i 35S rDNA jako sondy molekularne. Czy były to sekwencje pochodzące z komercyjnych klonów BAC, czy też zostały pozyskane w ramach własnych badań lub współpracy?
- 2) Czy podjednostkę 5S rDNA za pomocą NickTranslacji, czy użyto innej metody (np. PCR)?

„Wyniki i dyskusja” zostały połączone przez Autorkę w jeden podrozdział składający się z trzech części. Jego treść w pełni oddaje istotę opublikowanych badań, które przedstawiają analizę metylacji DNA w komórkach *B. distachyon*, poddanych działaniu dwóch mutagenów: MH i MNU. Analizy metylacji przeprowadzono w oparciu o immunocytochemiczne wykrywanie 5mC w jądrach komórkowych, a dla materiału traktowanego mutagenem również w mikrojądrach. Ponadto wykorzystano metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sekwencjami powtarzalnymi DNA w charakterze sond molekularnych w celu analizy metylacji DNA w loci 5S i 35S rDNA w komórkach *Brachypodium distachyon* traktowanych MH. Badania wykazały różnice w obecności i poziomie metylacji DNA w jądrach komórek kontrolnych oraz po traktowaniu mutagenami. Intensywność fluorescencji 5-metylocytozyny (5mC) w jądrach komórkowych zmieniała się po traktowaniu mutagenami i zależała od rodzaju mutagenu oraz zastosowanego czasu postinkubacji. Autorka zasugerowała, że demetylacja DNA w mikrojądrach może być związana z aktywnymi procesami replikacji DNA. **Mam prośbę o wyjaśnienie następującego fragmentu ze str. 21, cyt.:** „Obecność sygnałów EdU w MN wykazana przez Kwaśniewską i innych (2018) może również wskazywać na inkorporowanie jej w jądrze komórkowym w fazie S, a następnie utworzenie z tej chromatyny MN.” **Co jest inkorporowane? Co to jest inkorporacja?**

W badaniach wykazano także, że intensywność fluorescencji 5mC w jądrach matecznych dla mikrojąder była niższa niż w jądrach komórek bez mikrojąder. Zaobserwowano także różnice w obecności metylacji DNA w loci 5S i 35S rDNA w mikrojądrach. Częstość mikrojąder z sygnałem 5S rDNA, z nieobecną metylacją DNA w tym rejonie, była dwukrotnie wyższa niż częstość mikrojąder z metylacją DNA obecną w tym loci. Podsumowując, wyniki badań pozwoliły stwierdzić, iż poziom metylacji DNA w genomie jądrowym *B. distachyon* zmienia się po działaniu wybranych mutagenów chemicznych, a tym samym może odgrywać rolę w powstawaniu i naprawie uszkodzeń DNA, decydując o utrzymaniu integralności i stabilności genomu.

Na podstawie otrzymanych wyników sformułowano siedem wniosków, które w mojej ocenie są trafnymi konkluzjami płynącymi z zebranych danych badawczych. Mam drobne zastrzeżenia do wniosku nr 2, który ma charakter ogólny. Ponadto, wniosek nr 7 należy traktować jako przypuszczenie lub hipotezę do testowania w dalszych badaniach.

Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim w sposób syntetyczny oddaje treść



pracy. Autorka, zgodnie ze sztuką, zawarła w streszczeniu przesłanki do podjęcia badań, hipotezy i cele pracy, metody, wyniki oraz wnioski.

Z obowiązku recenzenta przyjrzałem się tekstowi pracy pod kątem interpunkcji, stylistyki i ortografii. Tekst pracy doktorskiej mgr Adrianny Halamy został przygotowany w sposób dokładny i profesjonalny, a treści w nim zawarte były nie tylko poprawne merytorycznie i rzetelne, ale także pozbawione błędów stylistycznych czy ortograficznych.

Podsumowując, w mojej opinii podjęty przez mgr Adriannę Halamę temat badawczy mający na celu zrozumienie zależności metylacji DNA oraz uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach *Brachypodium distachyon* jest bardzo istotny z punktu widzenia zarówno badań poznawczych, jak i aplikacyjnych. Wszak metylacja DNA to proces indukujący odwracalne modyfikacje epigenetyczne (np. dotyczące reakcji na stresy środowiskowe), który reguluje przestrzenną i czasową ekspresję genów w krótkim i długim okresie. Uzyskane przez mgr Adriannę Halamę i współpracowników wyniki mogą przyczynić się do dogłębnego zrozumienia wspomnianych mechanizmów co może pomóc w przyszłości w opracowaniu narzędzi genetycznych do ulepszania roślin w kwestii odporności na stresy środowiskowe.

Uważam, że rozprawa przedłożona przez mgr Adriannę Halamę stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574. Rozprawa stanowi w mojej ocenie świadectwo, że kandydatka posiada bogatą wiedzę teoretyczną oraz osiągnęła umiejętność samodzielnego prowadzenia prac naukowych. Pragnę zaznaczyć, iż wymienione przeze mnie w niniejszej recenzji uwagi oraz komentarze mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wnioskuje do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Adrianny Halamy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, dnia 5 stycznia 2023 roku