



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Poznań, 20 stycznia 2023 r.

Prof. dr hab. Barbara Naganowska
Zakład Struktury i Funkcji Genów
Instytut Genetyki Roślin PAN

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

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Halamy przedstawiona do recenzji została wykonana w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Jolanta Kwaśniewska, prof. UŚ, promotorem pomocniczym – Pani dr Agnieszka Brąszewska. Badania zostały częściowo sfinansowane z Rezerwy Dziekańskiej WNP Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz w ramach programu ‘Inicjatywa Doskonałości Badawczej’ Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Podstawą rozprawy jest zbiór trzech publikacji, których współautorką jest Doktorantka. Prace te zostały zrecenzowane w ramach procesu zatwierdzania do druku, celem recenzji jest więc ocena formalna rozprawy oraz wartości i spójności badań.

Praca doktorska Pani mgr Adrianny Halamy dotyczy roli metylacji DNA w reakcji komórek *Brachypodium distachyon*, gatunku modelowego dla traw strefy umiarkowanej, na traktowanie mutagenami o różnym mechanizmie działania. Efekty tych oddziaływań w postaci tworzenia tzw. mikrojąder były analizowane z użyciem zaawansowanych metod cytogenetycznych. Problematyka rozprawy jest dobrze osadzona w obszarze badań Zespołu, które od szeregu lat obejmują zagadnienia związane z wpływem czynników mutagennych na uszkodzenia i procesy naprawcze oraz na replikację DNA w komórkach roślinnych. Molekularne mechanizmy tych procesów pozostają jeszcze w dużej mierze niewyjaśnione. Znaczenie ich badań ma więc istotną wagę ze względu na powiązanie poziomu metylacji i upakowania chromatyny ze stabilnością genomu i z ekspresją genów.

Na całość rozprawy przedstawionej do recenzji składa się sześć rozdziałów. Pierwszy z nich, **Autoreferat**, zawiera podrozdziały: *Wstęp*, *Hipotezy i cele pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki i dyskusja*, *Literatura*.

Rozdział drugi to **Publikacje wchodzące w skład rozprawy:**

[1] **Bara A.W.**, Braszewska A., Kwasniewska J. 2021. DNA methylation – an epigenetic mark in mutagen-treated *Brachypodium distachyon* cells. *Plants* 10, 1408. <https://doi.org/10.3390/plants10071408>

[2] Kwasniewska 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., Kwasniewska 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>.

Kolejne rozdziały to: **Podsumowanie i wnioski, Streszczenie, Summary oraz Oświadczenia autorów.**

We *wstępie* do Autoreferatu, liczącym ponad siedem stron, Doktorantka wyczerpująco i kompetentnie omówiła stan wiedzy z zakresu tematyki pracy. Przedstawiła kwestie zmian organizacji chromatyny i modyfikacji epigenetycznych w odpowiedzi komórek eukariotycznych na czynniki środowiskowe, badanych na różnych poziomach organizacji genomu. Skupiła się na testach cytogenetycznych, stosowanych do analizy efektów działania mutagenów, a szczególnie tzw. teście mikrojąder i możliwościach wykorzystywania go do wykrywania i ilościowego badania zmian wywołanych w genomie. Zostały też omówione wyniki dotychczasowych badań Zespołu, które obejmowały m.in. zastosowanie testu mikrojąder wraz z techniką FISH oraz biblioteki BAC genomowego DNA do określenia pochodzenia mikrojąder i wrażliwości różnych regionów chromatyny *B. distachyon* na niektóre mutageny.

W dalszym ciągu Autoreferatu Kandydatka przedstawiła *hipotezy i cele pracy*. Zostały sformułowane następujące hipotezy badawcze:

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.

Jako **główny cel** rozprawy Kandydatka określiła próbę zrozumienia **roli metylacji DNA w odpowiedzi komórek roślinnych na mutageny jako czynniki stresowe**. Badania dotyczyły dwóch związków chemicznych o różnym działaniu: MH (hydrazyd kwasu maleinowego, o mechanizmie działania nie do końca znanym, hamujący syntezę DNA;

czynnik klastogenny, prowadzący do pęknięć DNA, powstawania aberracji chromosomowych i mikrojąder) i MNU (N-nitrozo-N-metylomocznik, czynnik alkilujący, indukujący głównie mutacje punktowe). Efektem ich wpływu była destabilizacja części jąder komórkowych i powstawanie mikrojąder.

Materiał badawczy stanowiły nasiona *Brachypodium distachyon* (2n=10), genotyp Bd21. Do badań wykorzystano metodę immunocytochemicznego wykrywania 5-metylo-cytozyny (5mC) z użyciem przeciwciała Alexa Fluor 488 oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Preparaty cytogenetyczne analizowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i systemu rejestracji obrazu. Obliczano częstość występowania jąder i mikrojąder z odpowiednimi sygnałami, jak też intensywność fluorescencji Alexa Fluor 488. Statystyczną analizę wyników przeprowadzono z użyciem testu ANOVA oraz testu Tukey (publ. [1]). Podrozdział **Materiały i metody** obejmuje ponad cztery strony, jest podzielony na podpunkty. Został napisany dokładnie i jasno.

Publikacja [1] dotyczy badania korelacji pomiędzy modyfikacjami epigenetycznymi pod wpływem traktowania MH i MNU a niestabilnością genomu *B. distachyon*, obserwowaną jako powstawanie mikrojąder. Poziom metylacji DNA był oceniany metodą immunocytochemicznego wykrywania 5mC. Pozwoliło to na przeprowadzenie porównawczej analizy zmian metylacji DNA w komórkach kontrolnych i traktowanych mutagenami, w pojedynczych jądrach komórkowych i utworzonych mikrojądrach. Poziom metylacji zależał od mutagenu i mechanizmu jego działania. Na podstawie wykrytego zróżnicowania Autorzy wnioskują, że metylacja DNA może być czynnikiem aktywnie uczestniczącym w odpowiedzi genomu *B. distachyon* na działanie mutagenów, a nie tylko markerem wyłączenia części chromatyny do mikrojąder. Jest to pierwsza publikacja dotycząca wpływu MNU na tworzenie mikrojąder u *B. distachyon*.

W **publikacji [3]** przedstawiono analizę metylacji DNA w loci 5S i 35S rDNA w poszczególnych mikrojądrach *B. distachyon*, utworzonych pod wpływem traktowania MH. Do analiz niedzielących się komórek wykorzystano sekwencyjnie procedurę immunocytochemicznego wykrywania 5mC oraz technikę FISH z sondami 5S i 25S rDNA. Stwierdzono obecność w mikrojądrach sekwencji 5S i 35S rDNA zarówno metylowanych, jak niemetylowanych. Wśród mikrojąder zawierających tylko 5S rDNA dwukrotnie więcej było tych bez sygnału 5mC niż z sygnałem, natomiast częstość mikrojąder z sekwencją 35S rDNA z metylacją i bez była jednakowa. Zlokalizowanie metylacji *in situ*, w konkretnych sekwencjach DNA, było nowatorskim aspektem tych badań w zakresie mutagenезы roślin. Autorzy podkreślają znaczenie analiz metylacji DNA w obrębie specyficznych sekwencji, ze względu na wpływ tego procesu na zmiany ekspresji genów.

Publikacja [2] jest natomiast pracą przeglądową. Dotyczy stosowania zaawansowanych technik cytogenetyki molekularnej i wizualizacji mikroskopowej w badaniach genotoksycznych efektów działania mutagenów w komórkach, a także perspektyw dalszych badań w tym obszarze. Przedstawiono przede wszystkim wykorzystanie testu mikrojąder, badania mechanizmów ich powstawania, struktury i aktywności genetycznej. Podkreślono przy tym, że omówione metody były dotychczas wykorzystywane do badań komórek

roślinnych w ograniczonym stopniu. Praca jest ciekawym kompendium wiedzy w obszarze tematyki badawczej Doktorantki.

Istotą rozprawy doktorskiej powinny być prace oryginalne, publikacja przeglądowa może wchodzić w skład rozprawy jako uzupełnienie czy poszerzenie. W tym przypadku pewne wątpliwości budzi umiejscowienie pracy przeglądowej jako drugiej w kolejności, ponieważ treść zawiera w dużej mierze materiał omówiony we wstępie Autoreferatu. Z drugiej strony publikacja chronologicznie pojawiła się w tym miejscu, a także jest w niej już cytowana publikacja oryginalna [1]. Powoduje to pewną niezręczność, jednak przedstawione trzy prace są powiązane tematycznie i tworzą całość, która może być podstawą rozprawy doktorskiej.

Pani mgr Adrianna Halama jest pierwszym (lecz nie korespondencyjnym) autorem publikacji [1] i [3], które ukazały się w czasopismach *Plants* (IF₂₀₂₁=4,658; 70 pkt. MEiN) i *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₁=6,208; 140 pkt. MEiN), oraz autorem drugim pracy przeglądowej [2] opublikowanej również w *IJMS* (jest to praca dwuautorska). Wszystkie publikacje ukazały się więc w uznanych czasopismach z obszaru biologii molekularnej, z listy JCR, o znaczących wskaźnikach bibliometrycznych. Na podstawie oświadczeń Doktorantki i współautorów można stwierdzić, że Doktorantka odegrała wiodącą rolę w powstaniu dwóch prac oryginalnych oraz istotną rolę w przygotowaniu publikacji przeglądowej.

W połączonym podrozdziale **Wyniki i dyskusja**, liczącym ponad siedem stron tekstu podzielonego na podpunkty, Autorka przedstawiła rezultaty eksperymentów całości pracy doktorskiej i w dojrzały sposób przedyskutowała je w odniesieniu do danych literaturowych. Nawiązała m.in. do wcześniejszych badań członków Zespołu, dotyczących wzorców metylacji DNA niektórych chromosomów u *B. distachyon*, udziału tych chromosomów w mikrojądrach tworzonych pod wpływem mutagenów, jak również obserwacji sekwencji rDNA w procesie mutagenezy u innych gatunków roślin. W rozprawie Doktorantka wskazała ponadto interesujące Jej zdaniem kierunki dalszych badań, m.in. wykorzystanie jako mutagenów kolejnych związków chemicznych i fizycznych o innych mechanizmach działania; analiza roli metylacji konkretnych sekwencji w procesie ich eliminacji z genomu poprzez tworzenie mikrojąder; badania ewentualnej zależności dalszego losu mikrojąder od poziomu metylacji DNA; wykorzystanie innych markerów, takich jak poziom metylacji histonów. Problem dalszych losów mikrojąder – ich późniejszej eliminacji i/lub ponownego włączenia do jąder komórkowych - wydaje się szczególnie ciekawy, zwłaszcza, że nie ma jeszcze na ten temat doniesień dotyczących komórek roślinnych.

Zestawienie **Literatury** obejmuje 60 pozycji piśmiennictwa od wcześniejszych, leżących u podstaw kierunku badań, do najnowszych. Treść wstępu, dyskusji oraz dobór literatury świadczą o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do realizacji rozprawy.

W rozdziale **Podsumowanie i wnioski** znalazło się siedem wniosków. Spośród nich stwierdzenia nr 1. i 4. dotyczą trafności wyboru metod. Natomiast pozostałe oddają istotę osiągnięć badawczych i wskazują, że postawione w rozprawie hipotezy znalazły potwierdzenie w otrzymanych wynikach.

Ostatnie rozdziały to **Streszczenia** rozprawy, w języku polskim i angielskim, napisane zwięźle i przejrzysto, oraz **Oświadczenia** Doktorantki i współautorów publikacji składających się na rozprawę.

Mam kilka zastrzeżeń do przedstawionej rozprawy. Pierwsze dotyczy kolejności zestawionych publikacji, co omówiłam już powyżej. Drugie zastrzeżenie dotyczy sformułowania tytułu pracy. Słowo „zależność” jest zwykle używane w wyrażeniu „zależność od”, wskazującym na kierunek relacji. Natomiast analizowane oddziaływania, jak sugerują badania, to w zasadzie procesy wpływające na siebie wzajemnie. Proponowałabym więc, że może bardziej trafne byłoby użycie w tytule słowa „współzależność”. Błędne jest wyrażenie „w tym loci” (str. 79), jak też „at this loci” (str. 81); liczba pojedyncza to „locus”. Zachęcałabym do używania zwrotu „zmetylowany DNA” zamiast potocznego „zmetylowane DNA” (str. 21). Odnotowałam też powszechnie spotykany błąd edycyjny, jakim jest stosowanie litery „x” zamiast znaku „×”, zwłaszcza w opisie metod badawczych; w niektórych tekstach może to powodować nieporozumienia. Ponadto, zauważyłam kilka nieistotnych pomyłek (m.in. „Technika BrdU zostało zastąpiona...”, str. 9; hypometylacja, str. 10, hypometylowane, str. 12; „Celem pracy doktorskiej było próba zrozumienia...”, str. 79). Uważam jednak, że rozprawa jest napisana jasno, poprawnie i starannie zredagowana. Powyższe uwagi nie obniżają jej wartości.

Podsumowując, pracę doktorską Pani mgr Adrianny Halamy oceniam wysoko, biorąc pod uwagę osiągnięcia badawcze, rolę Doktorantki w powstaniu publikacji składających się na rozprawę, jak też poziom opracowania rozprawy. Oryginalne wyniki stanowią znaczący postęp w badaniach nad procesami dynamicznych oddziaływań mutagenów chemicznych i metylacji DNA w komórkach roślinnych, ich wpływu na stabilność genomu. Na podkreślenie zasługuje przeniesienie obserwacji tworzenia mikrojąder na poziom analizy konkretnych sekwencji DNA. Należy docenić wykorzystanie wymagających metod z zakresu cytogenetyki molekularnej i immunocytochemii. Moim zdaniem Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że recenzowana **rozprawa Pani mgr Adrianny Halamy spełnia ustawowe warunki wymagane dla rozprawy doktorskiej** [Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. (art. 187) – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574.]. Przedstawiam zatem **wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Barbara Naganowska