

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK  
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie  
Al. 29-Listopada 54, 31-425 Kraków

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

pt.:

### **„Badania zależności metylacji DNA oraz uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach *Brachypodium distachyon*”**

autor rozprawy:

**mgr Adrianna Halama**

Przedmiotem badań recenzowanej rozprawy jest porównawcza analiza zmian metylacji DNA w jądrach komórkowych *Brachypodium distachyon* traktowanych dwoma mutagenami tj. hydrazidem kwasu maleinowego (MH) oraz N-nitrozo-N-metylomocznikiem (MNU). Metylacja DNA, jako jedna z modyfikacji epigenetycznych genomu, ma istotny wpływ na przestrzenną strukturę chromatyny, a ta m.in. odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórki na stresy zewnętrzne. Tym samym architektura jądra komórkowego, obejmująca epigenetyczne modyfikacje chromatyny, pełni istotną rolę funkcjonalną w odpowiedzi komórek na działanie mutagenów. Jednocześnie stopień kondensacji chromatyny, który zależy m.in. od metylacji DNA, odgrywa ważną rolę w powstawaniu i naprawie uszkodzeń DNA. W ten ciekawy i aktualny nurt badań nad organizacją przestrzenną chromatyny i jej związków z mutagenezą wpisuje się praca Pani Adrianny Halama.

#### **OCENA ROZPRAWY**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem. Artykuły zostały opublikowane w latach 2021-2022, w międzynarodowych czasopismach naukowych z zakresu nauk o życiu i charakteryzujących się znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi tj.: *Plants* (IF<sub>2021</sub>=4,658; pkt<sub>MEIN</sub>=70) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF<sub>2021</sub>=6,208; pkt<sub>MEIN</sub>=140). Ich sumaryczny Impact Factor wg Journal Citation Reports wynosi 17,074 a suma punktów wg punktacji MEiN to 350.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są 2-3 autorskie. Doktorantka jest pierwszym autorem w pierwszym i trzecim artykule, które są eksperymentalne oraz drugim autorem w drugim artykule, który jest przeglądowy. Włączone do dokumentacji oświadczenia współautorów artykułów eksperymentalnych wskazują na dominujący wkład Doktorantki w ich powstanie. Doktorantka przygotowała (1) materiał badawczy, (2) wykonała wszystkie analizy laboratoryjne tj.: traktowanie siewek mutagenami, przygotowanie preparatów



mikroskopowych, immunocytochemiczną detekcję 5-metylocytozyny (5mC), przygotowanie sond do FISH, przeprowadzenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, (3) przeprowadziła wszystkie analizy mikroskopowe wraz z przygotowaniem dokumentacji fotograficznej, uczestniczyła w: (4) przygotowaniu rycin, (5) przygotowaniu oryginalnego manuskryptu oraz (6) korekcie manuskryptu po recenzjach. Oświadczenie Doktorantki dotyczące artykułu przeglądowego oraz jej druga pozycja na liście współautorów świadczą o jej mniejszej roli w przygotowaniu tego artykułu.

Rozprawa oprócz artykułów, obejmuje: (1) wstęp stanowiący wprowadzenie do prowadzonych badań, (2) hipotezy i cele pracy doktorskiej, (3) rozdział poświęcony wykorzystanym materiałom i metodom, (4) omówienie wyników i ich dyskusję oraz (5) spis wykorzystanej literatury. Całość zamyka siedem wniosków podsumowujących badania oraz streszczenia w j. polskim i angielskim. Opracowanie to jest podsumowaniem treści zawartych w cyklu trzech artykułów. Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane ze środków projektu doktorskiego i Rezerwy Dziekańskiej WNP UŚ i zostały wykonane w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ pod kierunkiem Pani dr hab. Jolanty Kwaśniewskiej, prof. UŚ.

Rozdział Wstęp, obejmujący 8 stron tekstu, jest syntetycznym opisem przedstawiającym zagadnienia związane z podjętym przez Doktorantkę problemem badawczym. Autorka zwraca uwagę na konformację chromatyny i jej modyfikacje pod wpływem działania mutagenów. Przybliża pojęcie mikrojądra, przedstawia okoliczności powstawania mikrojąder oraz przedstawia techniki wykrywania mikrojąder w komórkach roślinnych. Wprowadza pojęcie testu mikrojądrowego jako techniki stosowanej do wykrywania klastogennych efektów działania mutagenów. W kontekście identyfikacji frakcji genomu występujących w mikrojądrach przybliża technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* oraz charakteryzuje sondy DNA najczęściej stosowane w technice malowania chromosomów. Przytacza inne techniki wykorzystywane do badania frakcji chromatyny występujących w mikrojądrach. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka krótko charakteryzuje zastosowane w pracy mutageny. Treści przedstawione w tym rozdziale uważam za właściwie dobrane i wyczerpujące w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej. Tekst rozdziału został przygotowany w oparciu o liczną, w tym najnowszą, literaturę anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych. Wynika z niego, że Doktorantka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki.

W kolejnym rozdziale Doktorantka sformułowała pięć hipotez badawczych odnośnie metylacji DNA pod wpływem działania mutagenów i jej roli w powstawaniu i naprawie uszkodzeń DNA. Głównym celem podjętych badań było określenie roli metylacji DNA w odpowiedzi komórek roślinnych na stres wywołany zastosowaniem dwóch mutagenów. Postawione hipotezy były weryfikowane w oparciu o dwa zadania badawcze obejmujące: (1) porównawczą analizę zmian metylacji DNA w jądrach komórkowych i mikrojądrach oraz (2) porównanie metylacji DNA w loci 5S i 35S rDNA. Zarówno hipotezy jak cel prowadzonych badań zostały czytelnie nakreślone.



Rozdział Materiały i metody opisuje w skrócie materiał badawczy wykorzystany w badaniach i stosowane metody, łącznie dla wszystkich badań opisanych w dołączonym cyklu dwóch artykułów eksperymentalnych. Rozdział pozwala wstępnie zapoznać się ze stosowanymi metodami w sposób wystarczający dla zrozumienia przebiegu prowadzonych doświadczeń i wykonanych analiz. Niemniej jednak proszę Doktorantkę o doprecyzowanie następujących zagadnień:

1. zakładając, że preparat cytologiczny wykonano z jednego merystemu (tak wynika z opisu na str. 14 "merystem korzeniowy .... przenoszono na szkiełko") ile siewek przeanalizowano na każdy wariant doświadczenia tj. mutagen/czas postinkubacji/powtórzenie
2. publikacja 3 – skoro w metodyce tej publikacji podano, że traktowanie siewek hydrazidem kwasu maleinowego wykonano w dwóch powtórzeniach (tożsama informacja jest w polskim opisie metodyki) to dlaczego wyniki w publikacji 3 nie poddano analizie statystycznej? Jak powtarzalne były otrzymane wyniki wyrażone w wartościach procentowych?

Kolejny rozdział rozprawy poświęcony jest omówieniu wyników zawartych w dołączonych dwóch artykułach eksperymentalnych i ich dyskusji. W ramach badań opisanych w pierwszym artykule przedstawiono analizę korelacji między modyfikacjami epigenetycznymi a niestabilnością genomu *Brachypodium distachyon* w odpowiedzi na działanie hydrazidu kwasu maleinowego i N-nitrozo-N-metylomocznika. Charakter i częstotliwość zmian genomu określano poprzez oszacowanie liczby mikrojąder w badanych preparatach cytologicznych oraz analizę poziomu metylacji DNA w jądrach komórkowych i mikrojądrach poprzez immunochemiczną detekcję 5-metylocytozy (5mC). Otrzymane wyniki wskazują, że (1) poziom metylacji DNA w jądrach traktowanych mutagenem (zarówno z mikrojądrami, jak i bez) jest inny w porównaniu z kontrolą oraz (2) poziom metylacji DNA w jądrach traktowanych mutagenem zależy od rodzaju zastosowanego mutagenego. Ponadto wykazano, że MH i MNU indukują mikrojądra o różnym poziomie 5 mC.

W drugiej pracy ekperymentalnej poddano analizie poziom metylacji DNA w obrębie sekwencji rDNA zlokalizowanych w mikrojądrach po traktowaniu komórek *Brachypodium distachyon* hydrazidem kwasu maleinowego. Do tego celu zastosowano sekwencyjną immunodetekcję 5-metylocytozyny i fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH) z sondami rDNA. Otrzymane wyniki wskazują, że: (1) rDNA 5S i 35S w MN może być metylowany lub nie; (2) częstotliwość MN niosąca tylko 5S rDNA (bez 35S rDNA) bez sygnałów 5mC w tym regionie była dwukrotnie wyższa niż częstotliwość tych z sygnałem 5mC. Ponadto (3) nie zaobserwowano różnic w częstotliwości występowania MN z metylowanym lub niemetylowanym 35S rDNA.

Przedstawione w tej części rozprawy omówienie wyników powyższych dwóch artykułów eksperymentalnych i ich dyskusja w pełni oddaje treści w nich zawarte. Uważam jednak, że zamieszczenie dodatkowych schematów czy rysunków, innych niż w opublikowanych artykułach, podsumowującym przeprowadzone badania byłoby twórczym uzupełnieniem do omawianych treści.



Rozdział Podsumowanie i wnioski to zbiór siedmiu dobrze sformułowanych punktów zestawiających najważniejsze informacje z przeprowadzonych badań i odpowiadających postawionym celom badawczym.

Streszczenia w j. polskim i angielskim właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Doktorantkę.

W kontekście lektury recenzowanej rozprawy proszę Doktorantkę o rozwinięcie poniższych zagadnień:

1. Hipermetylacja vs hipometylacja DNA – przyczyny i skutki.
2. Architektura jądra komórkowego – co ją determinuje?
3. Efekty działania czynników mutagennych na genomy organizmów eukariotycznych. Jakie inne techniki, oprócz tych zastosowanych w rozprawie, można wykorzystać do ich identyfikacji?

#### **PODSUMOWANIE**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Adrianny Halama jest wartościowym opracowaniem nt. identyfikacji poziomu i specyfiki metylacji DNA w komórkach roślinnych w odpowiedzi na związki mutagenne z wykorzystaniem technik cytogenetycznych, a otrzymane wyniki są oryginalne i w mojej opinii mają dużą wartość poznawczą. Za szczególnie wartościowe w kontekście tematyki rozprawy uważam określenie poziomu globalnej metylacji DNA w mikrojądrach, w tym regionalnej w obrębie loci rDNA. Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych materiałów i metod w celu uzyskania zakładanych celów i zweryfikowania postawionych hipotez. Wyniki zostały poprawnie opracowane, zaprezentowane, omówione jak również zinterpretowane i poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie prowadzonych badań oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187) – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574 i **wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Halama do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Kraków, 27 stycznia 2023

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK