



Prof. zw. dr hab. Małgorzata D. Gaj

Katowice, 15.01.2025

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych | Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
tel. +48322009360 | kom. +48322009360
e-mail: malgorzata.gaj@us.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej pana mgr Wojciecha Dzięgielewskiego

pt. „ **Functions of chromatin in transcription, stress response and meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana***”
 (“Funkcje chromatyny w transkrypcji, odpowiedzi na stres oraz rekombinacji mejotycznej u *Arabidopsis thaliana*”)

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana na Uniwersytecie im Adama Mickiewicza w Poznaniu na Wydziale Biologii w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Przyrodniczych Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii i wykonana pod kierunkiem naukowym Pana prof. Piotra Ziółkowskiego w Laboratorium Biologii Genomu.

Struktura i forma rozprawy oraz udział Doktoranta

Rozprawa została napisana w języku angielskim i liczy 281 stron druku. Struktura pracy doktorskiej jest przejrzysta, spójna i zawiera wszystkie części wymagane w tego typu pracach. **Znaczna część wyników została opublikowana w czterech oryginalnych pracach, które ukazały się w wysoko punktowanych czasopismach zagranicznych w latach 2022- 2023, w tym trzy z nich w Nature Communication (IF=14,7; 2023).** Na rozprawę składa się także jedna praca typu ‘review’. Kopie wszystkich pięciu publikacji składających się na rozprawę, **4. prac oryginalnych i jednego artykułu typu ‘review’, Autor dołączył do manuskryptu.** W jednej publikacji badawczej mgr. W. Dzięgielewski jest pierwszym ko-autorem, w pozostałych jest drugim (2 prace) lub trzecim współautorem (1 praca). Praca przeglądowa jest dwuautorska; Doktorant jako pierwszy autor współpracował przy jej tworzeniu ze swoim promotorem, prof. Piotrem Ziółkowskim. Pozycja Doktoranta na liście współautorów opublikowanych prac, oraz zamieszczony w manuskrypcie szczegółowy opis analiz i prac w jakie był On zaangażowany oraz oświadczenia innych współautorów **wskazują na znaczącą rolę mgr Dzięgielewskiego w powstawaniu tych artykułów.**

Nieopublikowane wyniki badań przedstawione są w dwóch tematycznie spójnych rozdziałach wchodzących w skład manuskryptu i mają strukturę artykułów badawczych zawierających Introduction, Results ilustrowane figurami i tabelami, Discussion oraz Material and Methods. Referencje do badań omówionych w tej części manuskryptu Autor zebrał w zbiorczym rozdziale (str. 91-108)

Biorąc pod uwagę mnogość i różnorodność przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych w ramach doktoratu wyników, należy docenić przejrzystość struktury, jak i treści manuskryptu ułatwiający recenzentowi poruszanie się po licznych i różnorodnych metodycznie badaniach i ich wynikach.





Przygotowując rozprawę Autor zadbał o syntetyczne wprowadzenie w zakres wiedzy związanej z przeprowadzonymi badaniami, oraz czytelne przedstawienie najważniejszych wyników i wniosków uzyskanych zarówno w toku opublikowanych, jak i nieopublikowanych jeszcze badań.

Język pracy jest klarowny i spójny a terminy właściwe. Zapewne przygotowanie rozprawy w j. angielskim było tu znacznym ułatwieniem, co nie umniejsza jednak wkładu Autora.

Badania finansowano z 4. zewnętrznych grantów badawczych pozyskanych przez promotora prof. P. Ziółkowskiego.

Przedmiot i cel rozprawy

Mechanizmy epigenetyczne pozwalające komórkom bardzo różnie, zależnie od środowiska i kontekstu, odczytywać i interpretować zakodowaną w ich genomach informację genetyczną są coraz lepiej poznawane. Jednakże odkrywana wielość i różnorodność czynników zaangażowanych w epigenetyczną regulację procesów oraz skomplikowane zależności między tymi czynnikami i różnymi procesami epigenetycznymi otwierają ciągle nowe obszary badań i skłaniają do kolejnych pytań. W tę trudną i bardzo fascynującą dziedzinę epigenomiki wpisują się prace Zespołu pana prof. Ziółkowskiego. Rozprawa mgr W. Dziegielewskiego przedstawia badania z zakresu epigenetyki roślin, intensywnie rozwijanej w ostatnich latach dziedziny badań w wyniku postępu w adoptowaniu metod epigenetyki do analizy komórek roślinnych.

Objęte rozprawą doktorską badania mgr Dziegielewskiego koncentrowały się na funkcji chromatyny w regulacji transkrypcji genów oraz w rekombinacji genetycznej warunkującej zjawisko crossing-over. Ze względów oczywistych dla biologa molekularnego obiektem badań była roślina modelowa genomiki, *Arabidopsis thaliana* (L.). W badaniach objętych rozprawą doktorską Autor zastosował dwie strategie badawcze współczesnej genomiki: eksperymentalną i analizy *in silico*. Eksperymenty laboratoryjne zmierzały to opisanie funkcji chromatyny w regulacji ekspresji genów stresu oraz częstości mejozytycznej rekombinacji. Doktorant badał dynamiczne modyfikacje histonów, w tym acetylację i depozycję histonu H2A. Z towarzyszące transkrypcji genów związanych z odpowiedzią roślin na stres oraz zależność pomiędzy markerami chromatyny otwartej H2K4me3 i zamkniętej H3K27me3 a częstością rekombinacji genetycznej. Druga zastosowana przez Doktoranta w rozprawie strategia badawcza to analizy bioinformatyczne dostępnych w bazach danych NGS celem globalnego i precyzyjnego mapowania występowania miejsc crossing-over w genomie *Arabidopsis*. Zbudowane przez Doktoranta narzędzia bioinformatyczne i wykonane z ich użyciem analizy *in silico* zastosowane zostały do określenia roli czynników genetycznych, w tym polimorfizmu typu SNP and białka naprawy DNA - MSH2, w kontroli zjawiska CO (crossingover) podczas mejozy.

Podjęte w rozprawie **badania uważam za bardzo aktualne, nowatorskie i niezmiernie interesujące dla współczesnej nauki.** W dobie postępujących zmian klimatycznych kreowanie nowych odmian roślin uprawnych o cechach zwiększających ich szanse plonowania przy niedostatku wody i wzroście średniej temperatury jest priorytetem współczesnej hodowli. Stąd też badane w rozprawie doktorskiej epigenetyczne mechanizmy kierujące odpowiedzią roślin na stres, w tym stres termiczny, oraz czynniki genetyczne wpływające na częstotliwość rekombinacji w mejozie mogą mieć w perspektywie duże znaczenie praktyczne dla wyprowadzania genotypów użytecznych w biotechnologii i hodowli roślin.



Należy podkreślić, że Doktorant nie porzucił w swych badaniach na wykorzystaniu publicznie dostępnych i licznych mutantów insercyjnych *Arabidopsis* lecz także brał udział w opracowaniu i zastosowaniu efektywnej i nowatorskiej metody uzyskiwania nowych alleli *Arabidopsis* na drodze edycji genomu techniką CRISP-Cas9. Opracowana i opublikowana metoda mutagenyzy edycyjnej, jak i wyprowadzone z jej udziałem mutanty delecyjne w genach różnych deacetylaz histonów znacznie poszerzyły możliwości badawcze Doktoranta oraz wzbogaciły zasoby narzędzi genomiki dostępne u *Arabidopsis*.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie naukowe

W ostatnich latach rośnie liczba prac podkreślających wagę dynamicznych zmian wariantów histonów w regulacji transkrypcji genów odpowiedzi na stres. W mechanizmie tym aktywacja transkrypcji genów zależy od ścisłej koordynacji depozycji wariantu H3.3 i usuwania H2A.Z, co wykazano dla genów reagujących na podniesienie temperatury w pracy Zhao i in., 2023. Procesy dynamicznych przemian histonów kontrolują modyfikacje epigenetyczne, w których znaczącą rolę mają kompleksy acetylujące histony z udziałem acetylotransferaz HAT i deacetylaz HDAC. Właśnie tymi gorącymi i niełatwymi w analizie mechanizmami kontroli transkrypcji genów zajął się w badaniach przedstawionych w pierwszej części rozprawy pan mgr W. Dziegielewski.

Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych prac, w tym macierzystego Zespołu badawczego, Doktorant sformułował hipotezę twierdzącą, że:

- W represji genów odpowiedzi na stres zaangażowane są deacetylazy histonów, które usuwając grupy acetylowe z histonu H2A.Zac deponowanego w obszarze ‘gene-body’ blokują transkrypcję tych genów w warunkach nieindukcyjnych.

Drugim bardzo interesującym zagadnieniem badawczym podjętym w rozprawie jest związek pomiędzy aktywnością transkrypcyjną chromatyny a częstością rekombinacji genetycznej. Autor postawił hipotezę, że:

- Ektopowo indukowana w obszarze podwyższonej frekwencji CO (tzw. CO hotspot) aktywacja transkrypcji genu zwiększa częstość rekombinacji.

Dla zweryfikowania postawionych hipotez w pracy zastosowano różnorodne materiały, w tym wyprowadzone zmodyfikowaną metodą CRISP-Cas mutanty, i różnorodne genetyczne, molekularne i bioinformatyczne metody badawcze. Ppo raz pierwszy w badaniach częstotliwości rekombinacji genetycznej zastosowano fuzyjne białko dCas9-VP64.

Rozprawa doktorska dostarczyła licznych nowych i cennych dla współczesnej genomiki i epigenetyki wyników wzbogacających współczesną wiedzę na temat mechanizmów epigenetycznej kontroli ekspresji genów i rekombinacji genetycznej u roślin. **Za szczególnie wartościowe dla nauki uważam:**

- Poszerzenie wiedzy o mechanizmie działania acetylotransferazy histonowej NuA4, mało dotąd zbadanej u roślin, w regulacji genów związanych z fotosyntezą i rozwojem chloroplastów oraz odpowiedzi na stres. Badania te pokazały, że mechanizmy regulacji transkrypcji z udziałem enzymów HAT, w tym NuA4, oraz HDAC, są znacznie bardziej skomplikowane niż są obecnie postrzegane.





- Zaproponowanie modelu regulacji genów stresu opartego o balans pomiędzy acetylotransferazami HAT i deacetylazami histonów, HDAC. Istotnymi elementami tego modelu są acetyltransferaza NuA4 i HDAC oraz histon H2A.Z.
- Wykazanie, że aktywność NuA4 jest niezbędna dla deponowania histonu H2A.Z w formie acetylowanej, w obszarze „gene body” genów stresu; deacetylacja gbH2A.Z skutkuje represją genów stresu w warunkach nie-indukcyjnych. Wyniki badań nad NuA4 przedstawiono w pracy Bieluszewski et al. 2022; która ukazała się w prestiżowym Nature Commun. W powstawanie tej obszernej, wieloautorskiej i ważnej dla nauki pracy Doktorant miał znaczny wkład; przeprowadził On eksperymenty związane z RNA-seq i ChIP-qPCR oraz analizował ich wyniki, jak również współuczestniczył w powstawaniu manuskryptu publikacji;
- Wykazanie zaangażowania deacetylazy HDA19 w deacetylację histonu H2A.Z. Wynik ten jest nowatorski bo wcześniej deacetylazy specyficzne dla tego histonu nie zostały opisane u roślin. Należy podkreślić, że aby zidentyfikować powiązane z H2A.Z deacetylazy, Autor rozprawy wyprowadził metodą CRISP/Cas9 mutanty edycyjne w 15 genach HDAC Arabidopsis; nowe mutanty znacznie poszerzają możliwości badań nad zjawiskiem deacetylacji histonów u roślin.
- Pokazanie, że modyfikując chromatynę i aktywując transkrypcję genu zlokalizowanego można w obszarze genomu o zwiększonej rekombinacji („recombination hotspot”) można stymulować poziom crossingover (CO). Pragnę podkreślić, że dla zbadania wpływu modyfikacji chromatyny na częstość rekombinacji genetycznej Doktorant zaprojektował i przeprowadził wieloetapowe i nowatorskie eksperymenty, w których zaadoptował system CRISP z użyciem białka fuzyjnego Cas9-VP64 do celowanej aktywacji transkrypcji wybranego genu Arabidopsis zlokalizowanego w obszarze hotspotu („Coco”) dla rekombinacji. Ponadto, dla detekcji zdarzeń rekombinacyjnych Doktorant wyprowadził transformanty rekombinacyjne Arabidopsis w stanie hemizygotycznym pod względem genu reporterowego RG warunkującego fluorescencję epidermy nasion.
- Opracowanie zestawu narzędzi bioinformatycznych dla analizy danych NGS w poszukiwaniu miejsc CO w genomie Arabidopsis oraz zaprojektowanie narzędzi internetowych umożliwiających łatwe przeglądanie zestawów danych z genotypowania-poprzez-sekwencjonowanie (GBS) pochodzących z różnych mutantów. Narzędzia te zostały wykorzystane w pracach opublikowanych w 2023 r w Nature Communication, co dowodzi ich wysokiej jakości i walorów aplikacyjnych w genomice roślin.

Komentarze i pytania do wyników

Uzyskane przez Doktoranta wyniki są bardzo ciekawe i prowadzą do wielu pytań. Przedstawione w rozprawie badania zainspirowały mnie do poniższych komentarzy i pytań do Doktoranta.

- Z racji moich zainteresowań naukowych związanych z genetycznymi i epigenetycznymi mechanizmami kontrolującymi pluripotencję somatycznych komórek roślin szczególnie ciekawią mnie wyniki pokazujące rolę HDA19 w deacetylacji H2A.Z podczas regulacji ekspresji genów odpowiedzi na stres. Deacetylaza HDA19 uczestniczy w procesach reprogramowania transkryptomu komórek podczas somatycznej embriogenezy i reguluje geny TF uczestniczące w regeneracji roślin w kulturze *in vitro* tkanek somatycznych. Nowe dane wskazują także na istotne funkcje wariantu histonu H2A.Z w regeneracji roślin w kulturze *in vitro*. Pokazano bowiem, że podwyższona temperatura zwiększa regenerację pędów u *Arabidopsis thaliana*, co jest związane z usuwaniem H2A.Z z chromatyny (Lamblez i in., Plant and Cell Physiology, 2022, 63 (5), pp.618-634. 10.1093/pcp/pcac017).





Chciałabym poznać Pana opinie, czy wyłaniająca się rola H2A.Z w regulacji genów odpowiadających na warunki kultury *in vitro* wpisuje się w znane dotąd warunki i mechanizmy działania tego wariantu? Czy poza represyjną oczekiwac możemy aktywującej roli tego wariantu w reprogramowaniu transkryptomu towarzyszącego regeneracji roślin *in vitro*?

- Jaki molekularny mechanizm może powodować niepowodzenie w uzyskaniu podwójnego mutantu *hda19-5 arp6-1* z mutacjami w genie deacetylazy HDA19 i białka Actin-related protein 6 (Arp6), istotnego komponentu kompleksu SWR1 rekrutującego H2A.Z do nukleosomów?
- Badania wykazały pozytywny wpływ ekspresji genu kodującego lncRNA na częstotliwość rekombinacji w obszarze hotspotu dla CO zlokalizowanego w promotorze tego genu. Biorąc pod uwagę prace innych wykazujące, że w przeciwieństwie do drożdży, u roślin częstość CO nie jest zwiększona z genami o wysokiej ekspresji nie wykazuję CO nie koreluje pytanie o związek poziomu CO i transkrypcji pozostaje otwarty. Dla definitywnego rozstrzygnięcia tej kwestii Doktorant zaplanował zastosowanie mutantów z delecją obejmującej TSS badanego genu i dla uzyskania takich mutantów proponuje zastosowanie innych białek Cas9. Czy takie próby są już w toku?
- Ciekawi mnie także, jak zaawansowane są prace zmierzające do stworzenia opartego o dCas9 systemu umożliwiającego specyficzne modyfikowanie chromatyny w obszarze CO hotspotu? Doktorant proponował zastąpienie białka VP64 białkami modyfikującymi chromatynę i np. metylotransferazą histonową, dlaczego wybór tego enzymu? Czy zasadne byłoby także modyfikowanie poziomu acetylacji histonów dla kontroli CO, np. z udziałem badanych w rozprawie acetyltransferazy NuA4 i deacetylazy HDAC19? Czy też inne enzymy z grupy HAT/HDAC byłyby lepszym wyborem?
- Jak słusznie podkreśla Doktorant, do wyjaśnienia pozostaje mechanizm molekularny odpowiedzialny za wzrost częstości CO w „Coco” hotspotie – czy jest to (jak pisze Autor, str. 74) efekt bezpośredniego zwiększenia transkrypcji genu lncRNA zlokalizowanego w obszarze hotspotu, czy wynik lokalnych modyfikacji i remodelowania chromatyny w tym obszarze. Prosiłabym także o wyjaśnienie, jak Doktorant rozumie mechanizm opisany jako „an effect of direct overexpression of the targeted lncRNA gene”?
- Jaki mechanizm może odpowiadać za letalność podwójnych mutantów *arp6-1 hda19-5* (tzw. efekt „synthetically lethal plants” -str. 44)? Czy w łuszczynach krzyżówki heterozygot *hda19-5 +/- x arp6-1 -/-* obserwował Pan wyższą sterylność i np. zamieranie zarodków lub nasion?

Na koniec, spełniając zadość oczekiwany obowiązkowi recenzenta, drobne uwagi krytyczne:

- W analizie genetycznej, wielkość analizowanej populacji roślin ma podstawowe znaczenie dla słuszności wnioskowania i stąd powinna być w wynikach podawana. Stąd też pytanie dotyczy liczby roślin F2 zastosowanych do określenia częstości CO w rejonie o zwiększonej ekspresji lncRNA (str. 70; Fig. 12 D)? nie znalazłam w rozprawie tych informacji.
- Autor zamiennie stosuje terminy „gene expression”, „expression” i „gene transcription”, jednak terminy te nie są synonimami
- Poza nielicznymi literówkami nie znalazłam niedociągnięć edycyjnych.





Podsumowując, recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi także znacznej ogólnej wiedzy teoretycznej i swobodnego poruszania się Autora w badanej tematyce oraz umiejętności praktycznego stosowania nowoczesnych metod z zakresu genomiki, epigenomiki i bioinformatyki. Opublikowane wieloautorskie prace oryginalne, w których Doktorant wykonywał istotną część eksperymentów dowodzi, że posiada On zdolności do samodzielnej, jak i zespołowej pracy naukowej.

Ponadto, wyróżniająca się na tak wczesnym etapie kariery duża aktywność publikacyjna Doktoranta dowodzi Jego znacznego potencjału jako naukowca. W zgodzie z tą tezą, ukazała się właśnie (styczeń 2025) kolejna bardzo dobra publikacja, w której Doktorant był zaangażowany zarówno w część eksperymentalną, jak i analizy danych. Praca Zhu et al. 2025 pt. „The kinase ATR controls meiotic crossover distribution at the genome scale in Arabidopsis” opublikowana została w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym, The Plant Cell, 2025, 37, koae292 (<https://doi.org/10.1093/plcell/koae292>). Ponadto, wg. deklaracji Autora zawartej w manuskrypcie rozprawy na str. 84, w przygotowaniu są dalsze publikacje wyników badań, w które Doktorant miał wkład.

Wnioski końcowe

Podsumowując, recenzowana rozprawa dowodzi pogłębionej wiedzy oraz zdolności do posługiwania się imponującym wachlarzem metod z zakresu genetyki i biologii molekularnej, jak i umiejętności poprawnej analizy i wnioskowania naukowego Doktoranta.

Wyrażona w recenzji analiza i ocena rozprawy doktorskiej p. mgr Wojciecha Dzięgielewskiego, uzasadnia, że praca całkowicie spełnienia przewidziane prawem wymagania dla uzyskania stopnia naukowego doktora określone w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 ze zm.).

Tym samym, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu o **dopuszczenie magistra Wojciecha Dzięgielewskiego ubiegającego się o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Równocześnie stawiam wniosek o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Wojciecha Dzięgielewskiego zgodnie z obowiązującymi w macierzystej jednostce procedurami.**

Z poważaniem

