



# UNIwersytet Warszawski

## Wydział Biologii



Dr hab. Marta Koblowska, prof. ucz  
Zakład Biologii Systemów  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 26.01.2025

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr Wojciecha Dziegielewskiego  
**„Funkcje chromatyny w transkrypcji, odpowiedzi na stres oraz rekombinacji mejozy u *Arabidopsis thaliana*”**

Wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Ziółkowskiego  
W Laboratorium Biologii Genomu  
Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana Wojciecha Dziegielewskiego wykonana pod opieką prof. Piotra Ziółkowskiego jest absolutnie wyjątkowym osiągnięciem, zarówno pod względem merytorycznym, jak i technologicznym. Już na początku recenzji chcę podkreślić, że jest najlepszą rozprawą doktorską, jaką miałam okazję oceniać. Tematyka związana z rolą chromatyny w regulacji transkrypcyjnej genów w odpowiedzi na stres u roślin, a także badania nad rekombinacją mejozy u *Arabidopsis*, to obszary nie tylko fundamentalne dla zrozumienia mechanizmów genetycznych adaptacji roślin, ale również niezwykle złożone. Imponujący zakres prac, łączących eksperymenty molekularne z analizami danych uzyskanych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA i DNA oraz opracowaniem autorskich narzędzi bioinformatycznych, świadczy o absolutnie wyjątkowej interdyscyplinarności, głębokiej wiedzy i niezwyklej kreatywności Doktoranta. Publikacje składające się na część wyników doktoratu, w tym trzy prace oryginalne opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Nature Communications*, jedna publikacja metodyczna w *Methods in Molecular Biology* oraz artykuł przeglądowy w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*, jednoznacznie potwierdzają znaczenie naukowe badań Pana Wojciecha Dziegielewskiego oraz pokazują niezwykle wysoki poziom międzynarodowego uznania dla jego osiągnięć. Trudno nie wyrazić głębokiego podziwu dla tej pracy doktorskiej oraz dla Zespołu, w którym powstały i zostały wykonane badania. Ta dysertacja nie tylko spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim i zasługuje na szczególne wyróżnienie, ale wyznacza nowe standardy w badaniach molekularnych nad roślinami.

Oceniana praca doktorska składa się z cyklu pięciu artykułów naukowych oraz niepublikowanych jeszcze wyników. Dla każdej z publikacji Autor wyraźnie określił zakres wykonanych przez siebie badań. Do dysertacji dołączono stosowne oświadczenia, które jednoznacznie potwierdzają i precyzyjnie określają jego wkład we wszystkie włączone do pracy artykuły. Zaangażowanie Autora pracy nie budzi wątpliwości.

Praca została napisana w języku angielskim w sposób niezwykle klarowny. Łączy w sobie elementy klasycznej dysertacji doktorskiej oraz podrozdziały w skrócie przedstawiające wyniki opublikowanych już prac. We wstępnej części znajdują się podziękowania, spis treści, informacje o źródłach finansowania oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, które pomimo ogromu prezentowanych wyników, jest krótkie i przejrzyste. Ta część pracy doskonale podkreśla najważniejsze osiągnięcia Doktoranta. W początkowej

1

części dysertacji znajduje się również lista publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, wykaz skrótów i symboli, a także życiorys naukowy Doktoranta.

Wstęp dysertacji umiejętnie wprowadza czytelnika w tematykę pracy, przedstawiając kluczowe informacje dotyczące struktury chromatyny oraz jej podstawowych białek. Szczególną uwagę poświęcono znaczeniu białek modyfikujących chromatynę i ważnych dla regulacji genów odpowiedzi na stres. W dalszej części omówiono znaczenie struktury chromatyny w procesie rekombinacji mejozy. Autor wyraźnie podkreślił istotność struktury chromatyny w kontekście badawczym, co stanowi solidne fundamenty dla dalszych części pracy doktorskiej. Następnie rozprawa zawiera jasno sformułowane dwa cele i dwie hipotezy badawcze. Taki podział zapewnił przejrzystą strukturę pracy oraz jej spójność.

Pierwsza część wyników poświęcona jest analizom dynamiki zmian chromatynowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli wariantu H2A.Z i jego acetylacji w regulacji genów odpowiedzi na stresy oraz wybranych modyfikacji histonu H3 w rekombinacji mejozy. Autor przypisał do tej części trzy publikacje, które zostały skrótowo omówione w kontekście ich założeń oraz uzyskanych wyników. Na końcu dysertacji dołączono PDFy opublikowanych artykułów. Ta część pracy zawiera także obszerną część z niepublikowanymi dotąd danymi, w formie dwóch gotowych manuskryptów. Pierwszy obejmuje badania nad rolą deacetylazy histonowej HDA19 w regulacji genów odpowiedzi na stres *Arabidopsis* w kontekście modyfikacji histonu H3 i H2AZ. Drugi manuskrypt zawiera wyniki badań dotyczące funkcji modyfikacji chromatynowych i procesu transkrypcji w zachodzeniu crossing-over podczas mejozy u *Arabidopsis*.

Lista publikacji włączonych do pierwszej części dysertacji Pana Wojciecha Dziegielewskiego obejmuje 3 publikacje:

**Publikację metodyczną** – Doktorant występuje jako współautor.

Bieluszewski, T., Szymanska-Lejman, M., **Dziegielewski, W.**, Zhu, L., & Ziolkowski, P. A. "Efficient Generation of CRISPR/Cas9-Based Mutants Supported by Fluorescent Seed Selection in Different *Arabidopsis* Accessions" *Methods Mol Biol* 2484, 161–182 (2022).

Praca metodyczna włączona do rozprawy doktorskiej zawiera niezwykle precyzyjnie opracowany protokół generowania mutantów w różnych odmianach *Arabidopsis thaliana* z wykorzystaniem nowoczesnej technologii inżynierii genetycznej CRISPR-Cas9. Opracowany system umożliwia efektywne tworzenie mutantów typu *knock-out* w genach *Arabidopsis*, a jednocześnie pozwala na szybkie i dokładne identyfikowanie uzyskanych mutantów, co znacząco zwiększa wydajność oraz praktyczność całego procesu. W ramach pracy uzyskano aż 15 mutantów w genach kodujących deacetylazy histonowe *Arabidopsis*. Opracowana metoda, jest już teraz wykorzystywana w projektach prowadzonych w ramach Zespołu, co stanowi wyraźne świadectwo jej praktycznego zastosowania i efektywności. Jestem głęboko przekonana, że opublikowana metodyka znajdzie szerokie zastosowanie również w pracach badawczych innych grup naukowych, przyczyniając się do dalszego rozwoju badań z zakresu biologii molekularnej roślin.

**Publikacja oryginalna opublikowana w *Nature Communications*** – Doktorant, wspólnie z dwoma innymi osobami, jest równorzędnym pierwszym autorem, co podkreśla jego kluczowy wkład w badania.

Bieluszewski, T.\*, Sura, W.\*, **Dziegielewski, W.\***, Bieluszewska, A., Lachance, C., Kabza, M., Szymanska-Lejman, M., Abram, M., Włodzimierz, P., De Winne, N., De Jaeger, G., Sadowski, J., Côté, J., & Ziolkowski, P. A. "NuA4 and H2A.Z control environmental responses and autotrophic growth in *Arabidopsis*" *Nat Commun* 13, 277 (2022)

Praca w znakomity sposób integruje analizy pojedynczych i wielokrotnych mutantów *Arabidopsis* (uzyskanych zarówno metodami klasycznymi, jak i z wykorzystaniem precyzyjnej edycji genomu za pomocą systemu Cas9-gRNA) z zaawansowanymi analizami molekularnymi skoncentrowanymi na interakcjach międzybiałkowych oraz szczegółowymi i na bardzo wysokim poziomie przeprowadzonymi analizami wysokoprzepustowymi, takimi jak RNA-seq oraz ChIP-seq. Publikacja obfituje w wyniki naukowe o wysokiej wartości merytorycznej. W mojej ocenie jednym z najważniejszych osiągnięć pracy jest wykazanie kluczowej roli kompleksu acetylotransferazy NuA4 w aktywacji transkrypcyjnej genów związanych ze wzrostem *Arabidopsis*. Mechanizm ten opiera się na acetylacji histonów H4 oraz H2A.Z w +1 nukleosomie. Jednocześnie praca pokazuje istotność NuA4 w depozycji acetylowanego wariantu H2A.Zac w ciałach genów odpowiedzi na stres, co, po usunięciu grup acetylowych, skutkuje represją tych genów. To odkrycie rzuca nowe światło na mechanizmy epigenetycznej regulacji genów zarówno w kontekście rozwoju, jak i odpowiedzi na stres środowiskowy.

Niejako uzupełnieniem opublikowanej już pracy o acetylotransferazie histonowej NuA4 są zaprezentowane wyniki, jeszcze nie opublikowane, a dotyczące roli deacetylazy histonowej HDA19. Wyniki mają formę manuskryptu.

Celem przedstawionych w tej części badań była identyfikacja deacetylazy wariantu H2A.Z, która wspólnie z acetylotransferazą NuA4 uczestniczy w regulacji genów odpowiedzi na stres. Wśród mutantów uzyskanych za pomocą metody CRISPR-Cas9 w genach kodujących kilkanaście deacetylaz histonowych poszukiwano fenotypów przypominających mutanta z zaburzeniami w depozycji H2A.Z do chromatyny (*arp6-1*). Na podstawie analizy fenotypowej do dalszych badań wytypowano mutanta w genie kodującym enzym HDA19 (*hda19-5*). Analizy transkryptomocne *hda19-5* wykazały podwyższoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres. Rośliny te charakteryzowały się również zwiększoną acetylacją wariantu H2A.Z, podobnie jak rośliny dzikiego typu *Arabidopsis* hodowane w warunkach stresu cieplnego.

Wyniki analiz molekularnych potwierdziły obserwowane podobieństwa fenotypowe pomiędzy mutantem *hda19-5* a roślinami dzikiego typu hodowanymi w podwyższonej temperaturze. Integracja danych z RNA-seq i ChIP-seq dla wybranych modyfikacji histonowych pozwoliła sformułować wniosek, że aktywacja genów zależy od poziomu H3K9ac, H2A.Zac oraz obecności wariantu H2A.Z w obrębie ciała genu. Porównanie wyników analizy transkryptomocnej oraz danych ChIP-seq roślin *hda19-5* i mutantu *Atepl1-2* w genie kodującym podjednostkę katalityczną kompleksu acetylotransferazy NuA4 wykazało wysoki poziom zgodności zmian. Na tej podstawie sformułowano wniosek, że geny związane ze stresem są współregulowane przez oba enzymy – NuA4 oraz HDA19.

Dodatkowo, zidentyfikowano mechanizm rekrutacji deacetylazy HDA19 do chromatyny za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego WRKY. Zaproponowano model regulacji genów przez kompleks NuA4 oraz HDA19, który w sposób przekonujący wyjaśnia mechanizm precyzyjnej regulacji odpowiedzi na stres u *Arabidopsis*.

## Uwagi i pytania:

Według mnie w tej części pracy brakuje badań potwierdzających bezpośrednie oddziaływanie *in vitro* HDA19 z acetylowanym H2A.Z, i/lub dowodów na aktywność deacetylazy HDA19 względem tego wariantu histonowego. Czy mógłby Pan zaproponować doświadczenia, których wyniki uzupełniłyby te braki?

Mam również pytanie natury ogólnej: czy na podstawie przedstawionych wyników oraz dostępnych badań dotyczących modyfikacji chromatyny u *Arabidopsis* można przypuszczać, że struktura chromatyny genów związanych z procesami wzrostu istotnie różni się od struktury chromatyny genów odpowiedzi na stres? Jeśli tak, to czy, według Pana, różnice te mogą być dziedziczone i utrzymywane w trakcie podziałów komórkowych? Poproszę o komentarz w tej sprawie podczas obrony.

Wiadomo, że struktura chromatyny w chromosomach mejoetycznych może wpływać na zachodzenie rekombinacji mejoetycznej. Zaobserwowano związki pomiędzy rekombinacją, transkrypcją i wybranymi modyfikacjami histonowymi. W pierwszej części pracy zamieszczono także nieopublikowane dotąd wyniki, zaprezentowane w formie manuskryptu, dotyczące potencjalnego wpływu aktywacji transkrypcji i związanych z tym modyfikacji histonowych w tzw. gorącym miejscu dla crossing-over (ang. crossover hotspots), na zwiększenie częstości zachodzenia rekombinacji mejoetycznej. Do tego celu wykorzystano zmodyfikowaną technologię CRISPR-Cas9. W tym przypadku fuzja białkowa enzymatycznie nieaktywnej formy Cas9 (deadCas9, dCas9) z aktywatorem transkrypcyjnym VP64 pochodzącym z wirusa opryszczki pospolitej została skierowana do promotora genu *AT3G05605*, kodującego lncRNA. Docelowy promotor dla dCas9-VP64 ulokowany był w gorącym miejscu dla crossing-over. W celu realizacji zadania nadekspresowano fuzję białkową dCas9-VP64 z odpowiednim gRNA w liniach *Arabidopsis* zawierających skonstruowane elementy genetyczne ESILs, flankowane sekwencjami kodującymi białka fluorescencyjne dsRED i eGFP, które są wyrażane w nasłódku nasion. Takie markery pozwalają na oszacowanie częstości zachodzenia rekombinacji. Pomiar rekombinacji oparty jest na segregacji tylko zielonych i tylko czerwonych nasion.

Z sukcesem udało się wykonać zaplanowane eksperymenty, wykazując podwyższoną częstotliwość rekombinacji w wyznaczonym miejscu, zależną od rekrutacji dCas9-VP64. Zaobserwowano zwiększenie w obszarze promotora trimetylacji lizyny 4 histonu H3, zwiększenie poziomu transkryptu genu *AT3G05605* oraz wyższą częstość zachodzenia rekombinacji w modyfikowanym miejscu. Niestety nie udało się rozdzielić potencjalnego wpływu większej ilości transkryptu od zmian w poziomie H3K4me3.

**Czy wprowadzenie dodatkowej kopii genu *AT3G05605* do wykorzystywanej w badaniu linii *Arabidopsis* i nadekspresja jego transkryptu mogłyby pomóc w odpowiedzi na pytanie, czy to chromatyna, czy transkrypt?**

Ostatnim elementem pierwszej części wyników prezentowanej pracy była praca przeglądowa.

**Artykuł przeglądowy dwuautorski** – Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego wiodącej roli w opracowaniu publikacji.

**Dziegielewski, W., & Ziolkowski, P. A.** "License to Regulate: Noncoding RNA Special Agents in Plant Meiosis and Reproduction" *Front Plant Sci* 12, 662185 (2021).

Przeglądówka w sposób kompleksowy i klarowny przedstawia wiedzę na temat roli niekodujących cząsteczek RNA w procesie mejozy. Ilustracje są przystępne i dobrze obrazują omawiane zagadnienia, co czyni tę pracę cennym źródłem wiedzy zarówno dla doświadczonych naukowców, jak i dla studentów rozpoczynających swoją przygodę z tą tematyką.

Pierwsza część wyników została bardzo dobrze i zwięźle podsumowana przez Autora.

Podsumowując, pierwsza część dysertacji została zrealizowana w sposób bardzo rzetelny, pomysłowy i z dbałością o szczegóły. Prezentowane zarówno opublikowane, jak i niepublikowane wyniki wnoszą istotny wkład w poszerzenie naszej wiedzy na temat mechanizmów regulacji transkrypcyjnej oraz procesów rekombinacji mejotycznej, stanowiąc cenne źródło nowych informacji.

**Dwie publikacje oryginalne opublikowane w *Nature Communications*** stanowią drugą część dysertacji, dotyczą zagadnień związanych z rekombinacją mejotyczną u *Arabidopsis*. W obu włączonych do dysertacji pracach Doktorant jest drugim autorem.

Szymanska-Lejman, M., **Dziegielewski, W.**, Dłuzewska, J., Kbir, N., Bieluszewska, A., Poethig, R.S. & Ziolkowski, P.A. "The effect of DNA polymorphisms and natural variation on crossover hotspot activity in *Arabidopsis* hybrids" *Nat Commun* 14, 33 (2023).

Dłuzewska, J., **Dziegielewski, W.**, Szymanska-Lejman, M., Gazecka, M., Henderson I.R., Higgins, J.D., Ziolkowski P.A. "MSH2 stimulates interfering and inhibits non-interfering crossovers in response to genetic polymorphism" *Nat Commun* 14, 6716 (2023).

W pierwszej z prac skoncentrowano się na ustaleniu roli zmienności genetycznej w zachodzeniu crossing over. Opracowana w ramach badań pomysłowa i skuteczna metoda selekcji nasion, w których doszło do crossing-over w zdefiniowanym obszarze DNA, umożliwiła precyzyjne mapowanie miejsc CO z rozdzielczością na poziomie par zasad. Stworzono linie zawierające krótkie fragmenty DNA (*Extremely Short Interval Lines*, ESILs), oflankowane genami kodującymi białka fluorescencyjne dsRED i eGFP, które są wyrażane w epidermie nasion ekotypu Col. Jeżeli pomiędzy markerami doszło do crossing-over, zrekombinowane nasiona wykazywały ekspresję wyłącznie jednego z białek fluorescencyjnych. Dzięki temu możliwe było ręczne selekcjonowanie rzadkich nasion rekombinantów spośród tysięcy nasion niezrekombinowanych. Pomysłowość tego układu eksperymentalnego robi wrażenie. Następnie takie linie krzyżowano z dwoma innymi ekotypami *Arabidopsis* – Ler i C24. W uzyskanych roślinach analizowano częstość crossing-over. Z wykorzystaniem systemu opartego na Cas9 wygenerowano także rośliny z delecjami w obrębie gorących miejsc DNA w liniach zawierających obszary ESILs. Dodatkowo, ponieważ dynamika crossing-over (CO) w regionach zawierających polimorfizmy SNP zależy od białka MSH2, które jest kluczowym elementem systemu naprawy nieprawidłowo sparowanych zasad (MMR), uzyskano odpowiednie linie krzyżówkowe w celu zbadania, jak genetyczna inaktywacja głównego detektora niedopasowań DNA wpływa na rekombinację. W celu przeanalizowania zachodzenia crossing-over w przygotowanych liniach krzyżówkowych sekwencjonowano zdefiniowane fragmenty DNA. Doktorant opracował skuteczne narzędzie bioinformatyczne umożliwiające zautomatyzowaną analizę sekwencji wytypowanych regionów 1 172 rekombinantów. Narzędzie jest dostępne na platformie GitHub. Analiza bioinformatyczna stanowi bardzo ważną część tej pracy.

W drugim artykule włączonym do tej części dysertacji przedstawiono wyniki analiz mechanizmów regulacji crossing-over przez białko MSH2 w odniesieniu do dwóch klas crossing-over: klasy I, wrażliwej na

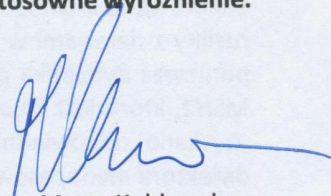
interferencję (gdzie jedno zdarzenie CO ogranicza występowanie kolejnego w pobliżu), oraz klasy II, nieinterferencyjnej, charakteryzującej się przypadkowym rozmieszczeniem CO na chromosomie. Wcześniejsze badania wykazały, że obecność polimorfizmów w DNA może wpływać na rozmieszczenie crossing-over klasy I, stymulując ich zachodzenie. Dzięki serii eksperymentów wykorzystujących linie hybrydowe *Arabidopsis*, ich obserwacje fenotypowe oraz szczegółowe analizy DNA genomowego przy użyciu metody GBS (Genotyping-by-Sequencing) na dużej liczbie pojedynczych roślin, udało się wykazać, że białko MSH2 odgrywa kluczową rolę jako regulator naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (DSB) podczas mejozy u *Arabidopsis*. Stwierdzono, że MSH2 wywiera antagonistyczny wpływ na crossing-over klasy I i II, kształtując rozmieszczenie miejsc rekombinacji meiotycznej. W ramach tej pracy Autor dysertacji opracował aplikację internetową RShiny, nazwaną *Arabidopsis Maps of Recombination* (AMoR), dedykowaną analizie danych GBS. Aplikacja umożliwia wizualizację i porównanie rozkładu crossing-over na chromosomach *Arabidopsis* oraz jest dostępna publicznie pod adresem: [https://genomebiol.shinyapps.io/AMOR\\_PUBLIC/](https://genomebiol.shinyapps.io/AMOR_PUBLIC/).

Badania zaprezentowane przez Doktoranta są szczególnie ważne. Regulacja genów odpowiedzialnych za reakcje stresowe u roślin oraz mechanizmy crossing-over w mejozie mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia podstawowych procesów biologicznych oraz zwiększają możliwości praktycznych zastosowań w rolnictwie. Poznanie mechanizmów regulacji genów stresowych daje szansę na identyfikację szlaków molekularnych warunkujących adaptację roślin do zmieniających się warunków środowiskowych i w efekcie podstawy dla opracowania bardziej odpornych odmian uprawnych. Z kolei zrozumienie mechanizmów crossing-over, będących kluczowym elementem rekombinacji meiotycznej, umożliwi precyzyjne mapowanie genów i potencjalnie kontrolę zmienności genetycznej, co może przyczynić się do zwiększenia wydajności produkcji roślinnej.

Recenzując tę pracę, zyskałam dużo głębsze zrozumienie skomplikowanych mechanizmów molekularnych, które regulują odpowiedzi roślin na stresy oraz procesy rekombinacji meiotycznej. Pozostaję pod wielkim wrażeniem osiągnięć i dojrzałości naukowej Pana Wojciecha Dziegielewskiego.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pana Wojciecha Dziegielewskiego spełnia wymogi ustawowe zgodnie z wymaganiami określonymi 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.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana Wojciecha Dziegielewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Jeszcze raz chcę podkreślić, że tak wyróżniająca się praca doktorska zasługuje na stosowne wyróżnienie.**



Marta Kobłowska