

Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
i
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Tomasza Bieluszewskiego pt. „Budowa i funkcja roślinnego kompleksu acetylotransferazy histonowej NuA4”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Recenzowana praca doktorska, dotyczy jednego z najbardziej aktualnych i ważnych dziś obszarów badań nad mechanizmami regulacji genów u organizmów eukariotycznych. Chodzi o system znakowania *loci* genowych w chromosomach, określany jako epigenetyczny, który umożliwia elastyczne sterowanie ich funkcją bez konieczności wprowadzania zmian w sekwencji DNA. Systemy regulacji epigenetycznej grają kluczową rolę w trakcie rozwoju złożonych organizmów wielokomórkowych – roślin i zwierząt, a także w ich interakcjach ze środowiskiem, w szczególności w sytuacjach wymagających adaptacji do niekorzystnych warunków. Duża złożoność systemów epigenetycznych sprawia, że wiedza o nich jest wciąż fragmentaryczna. Dotyczy to szczególnie roślin które, w przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae* i zwierząt, przez długi czas nie były liczącym się obiektem w badaniach molekularnych i genetycznych nad strukturą i funkcją chromosomów. Należy też pamiętać, że pomimo znaczącego zakresu ewolucyjnej konserwatywności mechanizmów epigenetycznych działających u eukariontów, wniosków z badań nad grzybami i zwierzętami nie można automatycznie przenosić na rośliny. Dwie dominujące dziś grupy organizmów wielokomórkowych - zwierzęta i rośliny, wydzieliły się ze wspólnego pnia około miliarda lat temu, i od tego czasu ewoluują osobno, a ich „bauplany” organizacyjne i funkcjonalne są optymalizowane w kontekście całkowicie odmiennych strategii życiowych. Te same pierwotnie mechanizmy molekularne podlegały w nich zatem wielu niezależnym od siebie zmianom i modyfikacjom dostosowującym je do specyficznych dla każdej z tych grup wymagań. W wypadku roślin, taką całkowicie niepowtarzalną w odniesieniu do organizmów wielkokomórkowych specyfikę od początku narzuciła symbioza z sinicami i pojawienie się

procesu fotosyntezy. W porównaniu do sytuacji u zwierząt, wymusiło to dramatycznie odmienne warunki brzegowe w odniesieniu do niemal wszystkich aspektów funkcjonowania organizmu. Wśród biologów powszechne jest przekonanie, że poznanie sposobu, w jaki w ten szczególny układ autotrofii energetyczno-pokarmowej wprzęgnięte zostały systemy epigenetyczne, jest niezbędne dla pełnego zrozumienia ewolucji molekularnego instrumentarium umożliwiającego funkcjonowanie roślin.

Praca doktorska mgra Tomasza Bieluszewskiego dotyczy generalnie acetylacji histonów, jednej z najwcześniej odkrytych, najpowszechniejszych i najważniejszych z potranslacyjnych modyfikacji w chromatynie. Z uwagi na neutralizowanie przez grupy acetylowe dodatnich ładunków histonów, co prowadzi do osłabiania ich interakcji z DNA i udostępniania go dla oddziaływań z różnymi regulatorami, acetylacja kojarzona jest z aktywną transkrypcyjnie chromatyną. Jej efekty są jednak daleko bardziej złożone i specyficzne niżby to wynikało z działania wyłącznie na poziomie oddziaływań elektrostatycznych. Przyczyna leży w różnicach w specyficzności kodowanych w genomach acetylotransferaz histonowych w odniesieniu do bezpośrednich substratów, ale także w ich zdolności do tworzenia wielobiałkowych kompleksów nadających im dodatkową specyficzność w odniesieniu do miejsca i sposobu działania w chromatynie, a także możliwości sprzężenia z różnymi systemami sygnałowymi działającymi w komórkach.

Celem badań doktoranta była próba odpowiedzi na pytanie, czy u roślin, reprezentowanych tu przez modelowy organizm *Arabidopsis thaliana*, zachowany jest stary ewolucyjnie system sprzężenia między acetylacją histonu H4 przez acetylotransferazę z ważnej podrodziny zwanej MYST (od pierwszych liter białek MOZ, YbF2, Sas2 i Tip60), działającą w homologicznych kompleksach NuA4 u drożdży i TIP60-p400 u człowieka, i wymianą wariantów histonowych w nukleosomie, katalizowaną przez kompleks remodelujący chromatynę, znany u drożdży jako SWR1-C.

Ze względu na kluczową rolę acetylacji histonów w systemie epigenetycznej kontroli rozwoju roślin i ich adaptacji do środowiska, brak szczegółowych danych o potencjalnych roślinnych kompleksach – homologach dobrze opisanych kompleksów NuA4 o TIP60-p400, stanowi zasadniczą lukę w wiedzy na temat chromatyny i jej regulacyjnej roli u roślin. Uzyskanie odpowiedzi na pytanie postawione przez doktoranta, uważam nie tylko za bardzo istotne poznawczo, ale także za otwierające drogę dla wielu różnych badań, w tym także, w obszarze szeroko pojętej biotechnologii roślin. Z tych powodów, tematykę rozprawy uznaję za aktualną i nadzwyczaj ważną merytorycznie.

Szczegółowe cele rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

U *Arabidopsis* zidentyfikowano homologi większości podjednostek kompleksu NuA4, z wyjątkiem jednak kluczowego białka EAF1A, które służy jako platforma organizacyjna całego systemu, umożliwiając ściąganie i strukturalno-funkcjonalną integrację pozostałych podjednostek. Pierwszym i głównym celem autora była zatem próba wykazania, że odpowiednik tego białka (lub jego homologa u ludzi – białka P400) występuje w *Arabidopsis* i pełni podobną funkcję. Drugim, wynikającym logicznie z pierwszego, celem pracy było rozszerzenie dość skąpej wiedzy na temat zakresu oddziaływań domniemanego roślinnego kompleksu NuA4 na fenotyp *Arabidopsis*, zarówno na poziomie organizmowym, jak i molekularnym.

Do realizacji tych celów doktorant wykorzystał szeroką paletę różnorodnych i bardzo nowoczesnych metod bioinformatycznych, molekularnych, biochemicznych i biofizycznych, cytologicznych i genetycznych. Dla ilustracji ich zakresu i stopnia technicznego zaawansowania, wymienię tu następujące:

- 1) Bioinformatyczna identyfikacja i charakterystyka motywów i domen strukturalnych białek;
- 2) Przejściowa nadekspresja białek w protoplastach uzyskanych z komórek roślinnych;
- 3) Ilościowe analizy poziomu transkrypcji;
- 4) Analiza oddziaływań białek metodą ko-immunoprecypitacji;
- 5) Identyfikacja białek za pomocą spektrometrii mas (we współpracy);
- 6) Edytowanie genomu *Arabidopsis* za pomocą technologii CRISPR/Cas9;
- 7) Konstrukcja, wyprowadzanie i genetyczna komplementacja linii *Arabidopsis* z mutacjami w konkretnych obszarach genomu;
- 8) Techniki mikroskopowe i ilościowa analiza obrazu;
- 9) Ilościowa analiza cech fenotypowych.

Zastosowane w pracy metody doświadczalne były w pełni odpowiednie dla realizacji celów rozprawy. Doktorant opisał je w pracy bardzo szczegółowo, a sposób w jaki je stosował, świadczy o jego bardzo wysokich umiejętnościach, jako eksperymentatora, i zawodowym profesjonalizmie.

Najważniejsze uzyskane wyniki

Rozprawa przedstawia rezultaty kilkudziesięciu obszernych, starannie zaplanowanych i poprawnie wykonanych doświadczeń. Najistotniejsze uzyskane wyniki to:

1. Bezspornie najważniejszym osiągnięciem było zidentyfikowanie i charakterystyka nieznanego do tej pory białka AtEAF1 (kodowanego w genomie Arabidopsis przez dwa ściśle sprzężone paralogi AtEAF1a i AtEAF1b), o cechach podjednostki platformowej całego kompleksu NuA4. Na silne przesłanki potwierdzające domniemaną rolę tego białka w roślinnym odpowiedniku NuA4 składają się wyniki wykazujące, że wraz z AtEAF1 ko-precypitują się dwa inne znane wcześniej roślinne homologi drożdżowych podjednostek kompleksów NuA4 i SWIR1-C, białka ARP4 i SWC4, oraz że AtEAF1 oddziałuje również z dwoma roślinnymi homologami białka YAF9, składnika kompleksu u drożdży.

2. Komplementarne do wyników opisanych powyżej są dane z analizy fenotypowej mutantów w genach kodujących AtEAF1. Tu, na silne pokreślenie zasługuje wykorzystanie z sukcesem technologii CRISPR/Cas9 do obejścia trudności, jaką dla uzyskania podwójnego mutantu w obu paralogach AtEAF1 stanowiło silne sprzężenie ich genów. Wykazanie, że jednoczesna inaktywacja obu paralogów jest najprawdopodobniej letalna, wskazuje na fundamentalną rolę kompleksu NuA4 w procesach rozwoju u Arabidopsis. Podobnie letalna okazała się jednoczesna eliminacja paralogów podjednostki Arp4.

3. Wykazanie, że zakłócenie integralności kompleksu NuA4 w Arabidopsis prowadzi do poważnych defektów w rozwoju i funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego. Szczegółowa analiza efektów fenotypowych mutacji w innych podjednostkach AtNuA4 ujawniła, że prawidłowy skład i funkcjonowanie kompleksu są niezbędne do normalnego działania jądrowych genów kodujących białka aparatu fotosyntetycznego.

Znaczenie wyników

Wyniki uzyskane przez mgra Bieluszewskiego mają oczywisty walor odkrycia naukowego. Dobrze przemyślane podejście badawcze oparte na starannej analizie właściwości zawierającego acetylotransferazę histonów kompleksu NuA4, w szczególności struktury domenowej jego kluczowego składnika architektonicznego, wraz z umiejętnym zastosowaniem odpowiednich metod eksperymentalnych, doprowadziły do identyfikacji prawdopodobnego roślinnego homologa drożdżowego białka EAF1. Wykonane następnie charakterystyki oddziaływań i znaczenia funkcjonalnego tego białka w Arabidopsis, w pełni zweryfikowały postulat takiej właśnie jego roli. Drugim znaczącym odkryciem było wykazanie związku między funkcją kompleksu NuA4 w Arabidopsis, a działaniem aparatu

fotosyntetycznego – w ten sposób otwarta została nowa ścieżka eksploracji ekscytującego obszaru badawczego dotyczącego powiązań metabolizmu i bilansu energetycznego roślin z systemem epigenetycznej regulacji genomu.

Komentarze i uwagi krytyczne

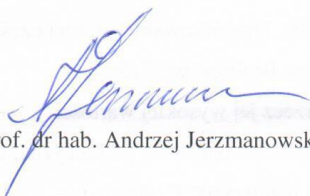
Nie mam żadnych poważniejszych zastrzeżeń do jakości przedstawionych wyników, a także do sposobu ich prezentacji, który jest dogłębny, wyczerpujący i wyjątkowo jasny. Autor przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej ma doskonałą orientację nie tylko w odniesieniu do tematu swojej pracy, ale także znacznie szerszego zagadnienia dotyczącego skomplikowanych relacji między genami a środowiskiem. Doskonale ilustruje to dyskusja, która jest wnikliwa, interesująca i krytyczna, zawiera także ciekawą ocenę możliwości na przyszłość i sugestie kierunków dalszych badań w oparciu o ustalenia rozprawy. Po raz pierwszy mam do czynienia z pracą doktorską, w której tak skutecznie wykorzystano możliwości nowej i przełomowej technologii edycji genomów. Opublikowanie istotnej części wyników rozprawy w renomowanym czasopiśmie *BMC Plant Biology* w 2015r. jest dodatkowym i niezależnym od tej recenzji argumentem na rzecz jej wysokiej wartości naukowej. Nie mogę też nie podkreślić, że praca napisana została znakomitą polszczyzną, w sposób, jak już wyżej wspomniałem, wyjątkowo klarowny i przejrzysty. Czyta się ją z prawdziwą przyjemnością.

Pewien niedosyt, jeśli idzie o szerszy kontekst dyskusji wyników, odczuwam w odniesieniu do dwóch kwestii. Pierwsza to problem interpretacji opisanego w literaturze fenotypu podwójnej mutacji w bliźniaczych genach *Ham1* i *Ham2* kodujących acetylotransferazy MYST w *Arabidopsis*. Fenotyp polega na zaburzeniu gametogenezy, szczególnie żeńskiej, przy czym zakłócenie, o ile mogę się zorientować z danych literaturowych, ma dotyczyć przebiegu pierwszej mitozy post-mejotycznej. O co tu może chodzić, gdyż trochę trudno mi sobie wyobrazić by ten raczej strukturalny problem wiązał się z bezpośrednią regulacją transkrypcji? Druga, pośrednio wiążąca się z tym kwestia, to prawdopodobny udział wymienionych acetylotransferaz w modyfikacji białek niechromatynowych. Jaka może być skala tego zjawiska, i czy może ono wpływać na warunki funkcjonowania kompleksu NuA4?

Wniosek końcowy:

Rozprawa mgra Tomasza Bieluszewskiego zawiera właściwie zaprojektowane i starannie wykonane doświadczenia naukowe, w których uwzględniono wszystkie niezbędne kontrole. Wyniki są w pełni oryginalne i zawierają element prawdziwego odkrycia naukowego. Zostały zaprezentowane w sposób pełny i przejrzysty, a wyciągnięte na ich podstawie wnioski są całkowicie uzasadnione. Zasadnicze osiągnięcie pracy zostało opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym, w publikacji, w której mgr Bieluszewski jest pierwszym autorem. Ze względu na powyższe oraz, według mnie, wybitną wartość merytoryczną rozprawy, wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza:

o dopuszczenie mgra Tomasza Bieluszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i rozważenie możliwości wyróżnienia jego rozprawy.



Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski

Warszawa, 27.12.2016