



Dr hab. Marta Kobłowska, prof. UW
Kierownik Zakładu Biologii Systemów
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 07.09.2018

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Sury
pt. " Udział Wariantu histonowego H2A.Z w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów u *Arabidopsis thaliana*"
wykonanej w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem dr hab. Piotra Ziółkowskiego

Chromatyna zbudowana przede wszystkim z DNA i zasadowych białek histonowych to podstawowa forma organizacji eukariotycznego genomu, o kluczowym znaczeniu dla regulacji ekspresji genów. Fundamentalna funkcja struktury chromatyny w regulacji transkrypcji, pierwszego etapu ekspresji genów, stawia tematykę związaną z ustaleniem roli poszczególnych składowych chromatyny w procesach komórkowych w centrum zainteresowania naukowców. Wiadomo, że ten nukleoproteinowy kompleks podlega dynamicznej przebudowie w odpowiedzi na sygnały płynące z wnętrza komórki oraz na zmiany środowiska zewnętrznego. Efektem tych modyfikacji struktury chromatyny jest często przekształcenie profilu transkrypcyjnego komórki. Na strukturę chromatyny wpływa wiele elementów, a jednym z najważniejszych są histony rdzeniowe budujące wraz z DNA jej podstawową jednostkę - nukleosom. Oprócz kanonicznych histonów rdzeniowych w komórkach występują także inne warianty, które nadają wybranym obszarom chromatyny szczególne właściwości. Choć wiemy o istnieniu tych wyspecjalizowanych białek histonowych od wielu lat, nasza znajomość roli wariantów histonów rdzeniowych w regulacji transkrypcyjnej jest nadal niepełna.

Rozprawa doktorska Pani Weroniki Sury dedykowana jest ustaleniu roli jednego z wariantów histonowych w regulacji transkrypcyjnej genów. Doktorantka wybrała do badań histon H2A.Z, jest to jeden z najsilniej konserwowanych ewolucyjnie wariantów. Sekwencja białka H2A.Z jest silniej zachowana w ewolucji niż kanonicznego histonu H2A. Co warto podkreślić stanowi on blisko 10% całkowitej ilości histonu H2A w jądrze komórkowym. Prace wielu badaczy wskazują, że H2A.Z jest konieczny dla życia większości eukariontów. To białko jest elementem regulatorowym różnych procesów komórkowych, w tym takich, które mają przeciwstawne działanie jak np. heterochromatyzacja powiązana z wyciszaniem genów oraz aktywacja genów. Pomimo, że wiele już wiadomo na temat H2A.Z jego rola w regulacji transkrypcji jest nadal nie w pełni zdefiniowana. Do ustalenia funkcji H2A.Z w regulacji aktywności transkrypcyjnej Pani Weronika Sura wybrała roślinę modelową *Arabidopsis thaliana*, w której badała wpływ wariantu H2A.Z na transkrypcję genów regulowanych w odpowiedzi na stres suszy. Wybór *Arabidopsis* pozwolił na wykorzystanie

dostępnych mutantów insercyjnych Arabidopsis oraz narzędzi badawczych wcześniej stworzonych dla tej rośliny w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii. Do badań Doktorantka wykorzystwała między innymi zoptymalizowaną przez siebie dla Arabidopsis metodę precypitacji chromatyny (ChAP od ang. chromatin affinity purification) oraz metody wielkoskalowe pozwalające na globalną analizę transkryptyczną i analizę lokalizacji H2A.Z w chromatynie.

Formalny opis rozprawy doktorskiej

Praca doktorska Pani Weroniki Sura ma układ klasyczny i liczy 160 stron. Rozpoczyna się spisem treści i wykorzystanych w pracy skrótów. Zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim, zawiera dokładnie zdefiniowany cel, zarysowane metody badawcze oraz opis najważniejszych wyników i ostateczny wniosek płynący z uzyskanych przez Doktorantkę danych. Szczegółowy wstęp liczący 60 stron oraz część obejmująca założenia i szczegółowe cele badawcze poprzedzają podrozdziały opisujące wykorzystane w pracy materiały i metody oraz uzyskane wyniki. Po wnikliwej dyskusji zamieszczony jest rozdział zawierający najważniejsze wnioski z pracy. Na końcu znajduje się bardzo bogaty spis literatury. Obszerniejsze części pracy podzielone są na mniejsze podrozdziały, a niektóre jak część dotycząca wyników oraz dyskusja zawierają zrozumiałe i dobrze opisane ryciny. Mimo obszerności niektórych podrozdziałów praca jest klarownie i przejrzysto napisana.

Ocena merytoryczna

Na początku swojej oceny pragnę zaznaczyć, że wyniki otrzymane przez Doktorantkę i przedstawione mi w formie pracy dyplomowej do recenzji zostały już opublikowane w prestiżowym czasopiśmie naukowym o międzynarodowym zasięgu - Plant Cell, a Pani Weronika Sura jest pierwszą autorką tej pracy. To wyróżniające osiągnięcie naukowe świadczy o jakości wyników i wysokiej wartości naukowej wniosków zaprezentowanych w rozprawie.

Pierwszą część Wstępu swojej rozprawy Doktorantka poświęca przedstawieniu elementów i zjawisk komórkowych regulujących u organizmów eukariotycznych proces transkrypcji. Najwięcej miejsca w tej części dedykuje omówieniu znaczenia struktury chromatyny dla transkrypcji i funkcjonowania genów. Ten fragment wstępu doskonale prezentuje rolę takich elementów jak metylacja DNA, budowa nukleosomu czy modyfikacje histonowe w regulacji transkrypcyjnej i dostarcza czytelnikowi niezbędnych wiadomości o zjawiskach związanych z chromatyną ważnych dla pierwszego etapu ekspresji genów. Druga zdecydowanie obszerniejsza część wstępu drobiazgowo prezentuje wiedzę na temat poznanej roli wariantu H2A.Z u różnych organizmów, genów kodujących ten szczególnie wariant histonowy, charakterystycznej lokalizacji H2A.Z w genomach eukariotycznych. Bardzo ważny fragment wstępu został poświęcony omówieniu kompleksów remodelujących chromatynę odpowiedzialnych za wprowadzanie i usuwanie wariantu H2A.Z z chromatyny. Pozwala to na właściwe zrozumienie doboru mutantów wykorzystanych w pracy. Należy podkreślić, że Doktorantka zastanawia się nad przyjętymi "prawdami" naukowymi, zestawia wyniki różnych grup badawczych, które często nie w pełni są ze sobą zgodne. To wskazuje na wyjątkowo głęboką znajomość tematu oraz ogromne zaangażowanie naukowe.

Wstęp został napisany bardzo szczegółowo jednak klarownie, zawiera wszystkie niezbędne informacje i doskonale wprowadza czytelnika w podjętą przez Doktorantkę tematykę badawczą.

Założenia i cele pracy są jednoznacznie i precyzyjnie wyznaczone, obejmują zbadanie odpowiedzi na stres na poziomie transkryptomycznym mutantów *Arabidopsis* o obniżonym poziomie H2A.Z w chromatynie, wyjaśnienie losów H2A.Z w obszarze zidentyfikowanych genów o zaburzonej ekspresji, ustalenie czy istnieje zależność pomiędzy lokalizacją H2A.Z na genie, a jego ekspresją i ostatecznie próbę przedstawienia uniwersalnego modelu podsumowującego rolę wariantu H2A.Z w regulacji transkrypcji genów u *Arabidopsis thaliana*. Do zrealizowania wytyczonych celów Doktorantka użyła różnorodnych metod badawczych. Zastosowała wiele podstawowych technik biologii molekularnej, genetyki, a także doskonale przeprowadziła analizy wielkoskalowe obejmujące badania transkryptomiczne oraz struktury chromatyny. Kluczowym elementem była integracja otrzymanych wyników z analiz wielkoskalowych, która ostatecznie pozwoliła na uzyskanie odpowiedzi na część postawionych pytań badawczych. Użyte materiały i metody są należycie opisane przez Doktorantkę. Zastosowanie wielorakich technik oraz wykonanie różnorodnych i skomplikowanych analiz bioinformatycznych wymagało pracy zespołowej, która jest nieodzowna w nowoczesnych naukach eksperymentalnych. W podrozdziale prezentującym materiały i metody zastosowane do realizacji celów badawczych Pani Weronika Sura dokładnie wyjaśnia kto ze współpracujących naukowców jest autorem poszczególnych analiz. W mojej ocenie wybrane i zastosowane techniki badawcze pozwoliły na zrealizowanie wszystkich wytyczonych przez Doktorantkę celów.

Uważam, że opisane w pracy doświadczenia zostały bardzo starannie wykonane i właściwie skontrolowane oraz opatrzone przejrzystymi Rycinami. Chcę podkreślić jeszcze raz, że wyniki przedstawione w pracy są opublikowane w wysoko cenionym czasopiśmie naukowym, przeszły więc skrupulatną i wnikliwą ocenę najlepszych specjalistów z dziedziny co jest świetnym wyznacznikiem jakości i wartości otrzymanych przez Doktorantkę danych.

W obszernej dyskusji Doktorantka szczegółowo omawia wnioski oparte o własne wyniki oraz obserwacje innych naukowców. Dyskusja i Wstęp rozprawy nie pozostawiają wątpliwości, że Pani Weronika Sura dysponuje szeroką wiedzą i doskonałą znajomością literatury w obszarze związanym z rolą chromatyny i wariantu H2A.Z w regulacji genów. Dyskusja kończy się zaproponowanym modelem, który przedstawia możliwy wpływ histonu H2A.Z na transkrypcję u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*.

Ważną część pracy stanowi podrozdział Wnioski, w którym Doktorantka prezentuje płynące z pracy wnioski i wskazuje na podwójną funkcję wariantu H2A.Z w transkrypcji u rzodkiewnika. W jej ocenie wariant H2A.Z pełni dwojaką rolę w regulacji transkrypcji, jest represorem lub może pozytywnie wpływać na transkrypcję zależnie od swojej lokalizacji na chromatynie regulowanych genów.

Taki wynik wskazuje na istnienie różnych mechanizmów molekularnych, które będą zaangażowane w we wbudowywanie wariantu H2A.Z w nukleosomy odkładane na chromatynie, a ich skutkiem będzie różny sposób regulacji genów. Zastanawia mnie jak to jest możliwe, że wariant H2A.Z może być ważny zarówno dla ogólnej regulacji transkrypcyjnej oraz może pełnić funkcje w specyficznej regulacji genów odpowiadających na stres. Proszę Doktorantkę o przedstawienie swojej opinii na ten temat w ramach obrony.

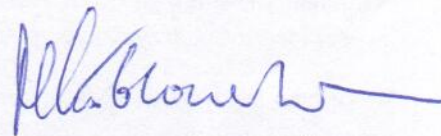
Pod koniec Wstępu w oparciu o wyniki innych grup badawczych Doktorantka wskazała na prawdopodobną rolę badanego wariantu H2A.Z w procesie składania genów. Czy wyniki uzyskane z wielkoskalowych analiz sugerują zaangażowanie tego histonu w splicing u *Arabidopsis thaliana*?

Podsumowanie

Przedem wszystkim chcę wyrazić uznanie dla doktorantki oraz promotora rozprawy, Pana dr hab. Piotra Ziółkowskiego. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Weroniki Sury wniosła wiele nowych i cennych informacji na temat wariantu histonowego H2A.Z i poszerzyła wiedzę na temat roli chromatyny w regulacji transkrypcji u *Arabidopsis*.

Doktorantka przeprowadziła szereg świetnie zaplanowanych i skomplikowanych doświadczeń, a jakość otrzymanych wyników świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu naukowego. Pani Weronika Sura jest nie tylko pierwszą autorką artykułu podsumowującego wyniki pracy doktorskiej, ale także autorką opublikowanej metody zoptymalizowanej dla *Arabidopsis* - Chromatin Affinity Purification (ChAP), która była kluczowa dla ustalenia lokalizacji H2A.Z w chromatynie *Arabidopsis*.

Stwierdzam, że oceniane badania reprezentują doskonały poziom naukowy, a praca doktorska Pani Weroniki Sury spełnia wszystkie wymogi formalne, zawarte w art. 13 *Ustawy z dnia 14 marca 2003r. "O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki"* (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Weroniki Sury do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej ocenie osiągnięcia naukowe Doktorantki nie tylko uzasadniają nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych, ale także zasługują na dodatkowe uznanie. W związku z tym wnioskuję o wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.



Marta Kobłowska