

9 Stycznia, 2017

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

Praca doktorska mgr Tomasza Bieluszewskiego została wykonana w Zakładzie Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Sadowskiego i dr hab. Piotra Ziółkowskiego jako promotora pomocniczego. W pracy tej mgr Bieluszewski bada mechanizmy posttranslacyjnych modyfikacji histonów. Jest to ważne i intensywnie badane zagadnienie, dlatego temat pracy należy uznać za ambitny, ważny i aktualny.

Rozprawa jest poświęcona kompleksowi białkowemu NuA4, który jest odpowiedzialny za acetylację histonu H4. Budowa i funkcja kompleksu NuA4 jest dość dobrze poznana w drożdżach i niektórych organizmach zwierzęcych. Natomiast w roślinach kompleks ten pozostaje praktycznie wcale nieznany. Mgr Bieluszewski zidentyfikował niektóre podjednostki NuA4 w *Arabidopsis* i zastosował podejścia genetyczne do ich charakteryzacji.

Rozprawa zawiera wstęp, założenia i cele, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz podsumowanie i wnioski. Praca jest napisana bardzo starannie. Dotyczy to przede wszystkim języka – autor płynnie operuje terminami naukowymi w języku polskim i ustrzeża się żargonu. Równie dobra jest szata graficzna pracy.

Wstęp doskonale wprowadza w skomplikowane mechanizmy regulacji ekspresji genów na poziomie modyfikacji i struktury chromatyny. Zaczyna od objaśnienia szeregu znanych mechanizmów wyciszenia transkrypcji, następnie przechodzi na wyższy poziom szczegółowości opisując mechanizmy i znaczenie acetylacji histonów i w końcu bardzo dokładnie i trafnie przedstawia literaturę poświęconą kompleksowi NuA4 w różnych organizmach. Jeśli wstęp będzie bezpośrednio wykorzystany w publikacji sugeruję



większą konsekwencję w wyborze literatury, zwłaszcza gdy istniejąca literatura jest obszerna i należy wybrać tylko jedną lub dwie pozycje. Proszę, aby w czasie obrony doktorant bardziej jednoznacznie odniósł się do kwestii czy acetylacja histonów wpływa na transkrypcję przez zmianę fizycznych właściwości chromatyny, czy też przez kontrolę wiązania białek odczytujących modyfikacje histonów (reader proteins).

Z uznaniem trzeba przyjąć jednoznaczne wyodrębnienie założeń i celów pracy i późniejsze przedstawienie wniosków. Jednocześnie warto się zastanowić, czy ogólnikowe pojęcia takie jak „potwierdzenie”, „sprawdzenie wpływu na fenotyp” i „porównanie” da się zredefiniować w kontekście konkretnych hipotez.

Metody są opisane szczegółowo i precyzyjnie. Rozdział ten będzie stanowił doskonale źródło informacji dla osób zainteresowanych wykorzystaniem zaprezentowanych podejść. Dotyczy to zwłaszcza mutagenazy z zastosowaniem systemu CRISPR/Cas9.

Najważniejszą część rozprawy, czyli wyniki rozpoczyna się od identyfikacji podjednostek kompleksu NuA4 w *Arabidopsis*. Trafnie wybrane dwie podjednostki zostały użyte do immunoprecypitacji oddziałujących białek, które następnie zidentyfikowano spektrometrią masową. Uzyskana lista oddziałujących białek stanowi fundament całej rozprawy i po potwierdzeniu oddziaływań innymi metodami będzie kluczowym źródłem informacji dla badających kompleks NuA4. Doktorant skupia się następnie na dwóch wcześniej nieznanach podjednostkach NuA4 (AtEAF1A i AtEAF1B) i dokonuje ich szczegółowej charakteryzacji. Skupienie się na tych dwóch białkach jest niewątpliwie trafną decyzją, gdyż dzięki temu autor może odkryć nowe i niezbrane aspekty działania NuA4. Analiza sekwencji białek AtEAF1 i oddziaływań między nimi a wybranymi podjednostkami kompleksu NuA4 prowadzi do wniosku, że AtEAF1 stanowią platformę kompleksu NuA4. W czasie obrony proszę, aby doktorant przedyskutował co rozumie pod pojęciem platformy kompleksu białkowego i jakie kryteria eksperymentalne powinny zostać spełnione, żeby móc uznać białko za platformę kompleksu.

Następna część wyników poświęcona jest uzyskaniu kluczowego narzędzia genetycznego do zbadania funkcji białek AtEAF1, czyli podwójnego mutantu w AtEAF1A i AtEAF1B. Ze względu na tandemowe ułożenie genów na chromosomie, cel ten jest bardzo trudny do osiągnięcia przy użyciu tradycyjnej mutagenazy insercyjnej. To

uzasadnia niezwykle ambitne podejście do zmutowania obydwu genów przy użyciu CRISPR/Cas9. Ponieważ ta metoda jest dostępna od bardzo niedawna, uzyskanie podwójnego mutantu wymagało długiej i dość skomplikowanej optymalizacji i selekcji. Jest to szczegółowo opisane w tekście rozprawy. Uzyskanie podwójnego mutantu należy uznać za jedno z głównych osiągnięć tej pracy. Duży nakład pracy związany z uzyskaniem tego mutantu może prowadzić do refleksji na temat podejmowania ambitnych technicznych wyzwań oraz wad i zalet prostszych acz mniej doskonałych podejść jak wyciszenie przez amiRNA.

Trzecia część wyników przedstawia analizę fenotypów mutantów szeregu podjednostek kompleksu NuA4. Przy użyciu CRISPR/Cas9 i mutagenazy insercyjnej doktorant zmutował cztery dodatkowe podjednostki NuA4 (dla części istnieją po dwa paralogi) i opisał ich fenotypy morfologiczne. Co ciekawe, wśród fenotypów pojawił się wspólny motyw – zaburzenia rozwoju chloroplastów. Doktorant zaproponował, że jest to spowodowane przez wpływ NuA4 na kodowane w jądrowym genomie białka chloroplastowe. Hipoteza ta jest wstępnie przetestowana przez testy akumulacji RNA kodujących szereg takich białek. To prowadzi do kluczowego dla całej rozprawy pytania – jaka jest funkcja roślinnego NuA4? Uzyskanie pełnej odpowiedzi na to pytanie wykracza znacząco poza zakres pojedynczej rozprawy doktorskiej, jednak proszę, aby w czasie obrony doktorant poświęcił temu zagadnieniu sporo uwagi. Proszę również aby doktorant przedyskutował znaczenie technik genetycznych pozwalających z całą pewnością przypisać fenotyp do zamierzonej mutacji.

Ustalenie funkcji NuA4 w *Arabidopsis* będzie wymagało znalezienia *loci* na których kompleks ten acetyluje histon H4 i bezpośrednio wpływa na ekspresję genów. Będzie to wymagało metodologii nie przedstawionej w tej pracy, przede wszystkim immunoprecypitacji chromatyny (ChIP). Warto zaznaczyć, że podejście to zostało z powodzeniem zastosowane przez współpracowników doktoranta i jest przedstawione w doskonałej publikacji w *BMC Plant Biology*, której pierwszym autorem jest doktorant. Publikacja ta obejmuje część wyników z tej rozprawy i pokazuje, że wyniki te zostały poddane weryfikacji przez środowisko naukowe. Reszta wyników zawartych w rozprawie nie została jeszcze opublikowana, jednak nie ma wątpliwości, że wyniki te, zwłaszcza uzyskane z wykorzystaniem nowych mutantów, zostaną dobrze opublikowane.

Dyskusja obszernie przedstawia kontekst literaturowy dla uzyskanych wyników i zawiera szereg istotnych elementów, w tym kwestię specyficzności CRISPR/Cas9 i możliwych efektów pośrednich NuA4. W kończącej rozprawę podsumowaniu i wnioskach autor przedstawia dość odważną interpretację swoich wyników. Zachęcam, aby w czasie obrony doktorant wyraźnie oddzielił mocne konkluzje od luźnych spekulacji (które są jak najbardziej uprawnione i ważne). Praca kończy się trafną puentą o znaczeniu zależności między czynnikami transkrypcyjnymi, różnymi modyfikacjami histonów i kompleksami modyfikującymi chromatynę.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania naukowe na wysokim poziomie i stanowi ważny wkład w zrozumienie biologii chromatyny w roślinach. Przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę pracy. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie pana mgr Tomasza Bieluszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Andrzej Wierzbicki