

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Sura pt. Udział wariantu histonowego H2A.Z w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów u *Arabidopsis thaliana*

Badania mechanizmów regulacji ekspresji genów z udziałem wariantów histonów są intensywnie prowadzone od wielu lat. Pionierskie badania w tym zakresie u *Arabidopsis* zostały przeprowadzone ponad dziesięć lat temu. Opisano w nich między innymi rolę H2A.Z w odpowiedzi na temperaturę, patogeny i w kontroli kwitnienia. Prace te doprowadziły do opisanego cało genomowego rozmieszczenia H2A.Z w chromatynie *Arabidopsis*, jak i postawienia ciekawych hipotez dotyczących mechanizmu działania wariantu H2A.Z w odniesieniu do metylacji DNA. W przeciwieństwie do tych mechanistycznych aspektów działania H2A.Z badania te nie w pełni wyjaśniły rolę H2A.Z w fizjologii roślin czy regulacji ekspresji genów. W tym kontekście podjęcie przez doktorantkę badań nad rolą wariantu histonu H2A.Z w kolejnej fizjologii roślin – suszy, wiele lat po pionierskich badaniach H2A.Z u *Arabidopsis* było mocno ryzykowne. Tym bardziej cieszy, że doktorantce udało się opisać nowy aspekt działania H2A.Z u *Arabidopsis*. Za najważniejsze osiągnięcie prezentowanej pracy uważam opisanie wewnątrz genowej lokalizacji wariantu H2A.Z i dobrze zbudowaną analizę tej klasy genów. Już pierwsze prace opisujące cało genomową lokalizację H2A.Z u *Arabidopsis* pokazywały, że na niektórych genach H2A.Z nie wykazuje klasycznego profilu wzbogacenia na TSS, na przykład dla genu *FLC*. Na podstawie uzyskanych wyników i przeprowadzonych analiz doktorantka zaproponowała model, w którym, cytując: „H2A.Z może mieć represyjny bądź stymulujący wpływ na transkrypcję w zależności od swojej lokalizacji w genie.” Hipoteza ta została dobrze uzasadniona i przedyskutowana i stanowi istotny wkład do rozumienia działania wariantu histonu H2A.Z. Praca zaczyna się od opisu zaburzeń w odpowiedzi na suszę w mutantach genów kodujących warianty H2A.Z jak i kluczowych podjednostek je deponujących. By następnie przejść do opisu zaburzeń w cało genomowej ekspresji genów w wybranych mutantach traktowanych lub nie suszą. Dalej autorka opisuje zestaw doświadczeń w których wykorzystując metodę ChIP-seq (ChAP-seq w terminologii stosowanej przez autorkę) opisuje cało genomowy wzór wiązania histonu H2A.Z w roślinach kontrolnych jak i traktowanych suszą. W mojej ocenie praca jest napisana starannie i nie dopatrzyłem się poważniejszych błędów formalnych czy merytorycznych. Jedynym moim zarzutem jest zbyt



obszerność pracy, w mojej ocenie doktorantka jako pierwsza autorka publikacji, pisząc doktorat mogła ograniczyć go do połowy lub jednej trzeciej aktualnej objętości. Wstęp jest obszerny, zwraca uwagę dobry dobór literatury, w tym uwzględnienie danych zarówno dotyczących zwierząt czy drożdży jak i roślin. Wyniki przedstawione są w sposób jasny i klarowny wraz z niezbędnymi do interpretacji kontrolami i w większości przypadków analizą statystyczną. Dyskusja w sposób wyczerpujący omawia uzyskane wyniki w świetle wyników innych badaczy.

W mojej ocenie jest to praca starannie wykonana zawierająca szereg ciekawych hipotez i wyników które przyczynią się do rozwoju dziedziny. Pomimo tej jednoznacznie pozytywnej oceny z obowiązku recenzenta chciałbym się odnieść krytycznie i prosić o wyjaśnienie kilku aspektów pracy.

1. Praca rozpoczyna się opisem zaburzeń w odpowiedzi na suszę w mutantach *arp6*, *pie1-5* i *hta9 hta11*. Figura 4 pokazując wyniki tych eksperymentów nie zawiera analizy statystycznej. Ponieważ zawiera ona bardzo dużo punktów czasowych oczywiście nie oczekuję analizy statystycznej wszystkich danych jednak główne wnioski autorki jak: „kiełkowanie linii z upośledzonym wprowadzaniem H2A.Z do chromatyny *pie1-5* i *arp6* (...) jest opóźnione w stosunku do kiełkowania linii WT” powinno w mojej ocenie być podparte analizą istotności statystycznej.

2. Jak słusznie zauważa autorka mutant *hta9 hta11* nie jest mutantem idealnym do analizy funkcji H2AZ, gdyż nada posiada on jeszcze jeden gen kodujący ten wariant. Autorka obszernie uzasadnia wybór mutantu *arp6* do analiz funkcji H2A.Z w regulacji transkrypcji genów. Kluczowym etapem było tu przeprowadzenie kontrolnego eksperymentu, opisanego na figurze 7, którego celem było zbadanie poziomu H2A.Z w chromatynie w mutancie *arp6*. Autorka stwierdziła bardzo znaczne obniżenie poziomu H2A.Z dla praktycznie wszystkich badanych loci – co umożliwiło dalszą pracę z *arp6* jako właściwym tłem genetycznym do analiz funkcji H2A.Z w chromatynie. Co ciekawe jak zauważa autorka jej wyniki pozostają w dużej mierze sprzeczne z wynikami opublikowanymi w pracy Dai i in. (2017). Autorzy ci pokazali tylko nieznaczny spadek poziomu H2A.Z a dla niektórych loci nawet wzrost jego poziomu. Autorka dyskutując tą rozbieżność sugeruje między innymi, że przyczyną może być sposób normalizacji i analizy danych całogenomowych przez Dai i in. (2017). Chciałbym poprosić autorkę o dokładniejsze omówienie potencjalnych przyczyn tej różnicy w trakcie obrony.

3. Praca kończy się ciekawym wnioskiem badawczym „H2A.Z może mieć represyjny bądź stymulujący wpływ na transkrypcję w zależności od swojej lokalizacji w genie”. Znanych jest co najmniej kilka innych modyfikacji o podobnym trybie działania (represyjno/stymulującym w zależności od lokalizacji na genie) jak na przykład metylacja DNA czy H3K36me3, czy H3K4me2. Chciałbym poprosić autorkę o rozwinięcie jej hipotezy o H2A.Z i przedyskutowanie możliwego mechanizmu przeciwstawnego efektu H2A.Z w TSS i „gene body”.

Podsumowując jednoznacznie pozytywnie oceniam pracę Pani Weroniki Sur i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Weroniki Sur do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom prezentowanej pracy, wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Szymon Swiezewski



Warszawa, 3 wrzesień 2018