

Kraków, 16.12.2024

dr hab. inż. Agnieszka Kielkowska, prof. URK
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Alicji Tomasiak pt. „Kompleksowa analiza epigenetyczna procesów reprogramowania komórkowego w tkankach hodowanych *in vitro* oraz *in vivo*- badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*.”.

Przedmiot rozprawy

Obiektem badań były dwa gatunki gryki (*Fragopyrum*) tj. gryka tatarska (*F. tataricum*) i gryka zwyczajna (*F. esculentum*). Przeprowadzone badania dotyczyły z jednej strony analizy procesów różnicowania komórek kalusa embriogenego *F. esculentum* oraz kalusa morfogenego i niemorfogenego *F. tataricum* pod kątem jego morfologii, jak również określenia zmian w poziomie występowania wybranych markerów epigenetycznych (metylacja, acetylacja) w określonych przedziałach kultury. Ponadto przeprowadzono analizy poziomu metylacji DNA podczas rozwoju kwiatów obu gatunków gryki różniących się sposobem zapylania (obcopolna *F. esculentum* i samopolna *F. tataricum*). Poziom metylacji badano w wybranych elementach kwiatów zamkniętych i otwartych (płatki, nektarniki, załącznik, znamiona słupka). Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki i zostały wykonane w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. Alexandra Betekhtina prof. UŚ oraz promotora pomocniczego, dr Agnieszki Brąszewskiej.

Struktura pracy

Dysertacja obejmuje 52 strony maszynopisu zawierające wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i hipotezy badawcze, metodykę i omówienie wyników wraz z dołączonymi publikacjami. Na końcu pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów publikacji. Zasadniczą część dysertacji stanowią cztery powiązane tematycznie publikacje (P1-P4), które

ukazały się w latach 2022-2024 w renomowanych czasopismach z dziedziny nauk biologicznych tj. International Journal of Molecular Sciences (P1), Plant Cell, Tissue and Organ Culture (P2), Frontiers in Plant Science (P3) oraz BMC Plant Biology (P4). Publikacje zostały poprzedzone ogólnymi streszczeniami w języku polskim, które podsumowują zakres prac i najważniejsze wnioski. Parametry bibliograficzne dysertacji to sumaryczny IF 16,3; sumaryczne punkty MNiSW 480.

Hipotezy, cele oraz zastosowane metody

Autorka sformułowała trzy hipotezy badawcze. Pierwsza z nich, dotycząca roli epigenetyki w procesach rozwojowych komórek roślinnych oraz przeprogramowania komórkowego jest raczej ogólna i można ją zasadniczo uznać za już wcześniej zweryfikowaną przez inne zespoły badawcze, natomiast nie była testowana specyficznie u gryki. Dwie pozostałe hipotezy, dotyczące korelacji między zmianami epigenetycznymi a ekspresją genów kodujących białka i polisacharydy zaangażowane w przebudowę ściany komórkowej w komórkach kalusa podczas kultury *in vitro* oraz różnic w poziomie metylacji DNA w kwiatach gryki są oryginalne, co spełnia wymóg nowości naukowej przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Cel pracy został zdefiniowany w postaci 4 punktów i obejmował kolejno: (1) przegląd dostępnej literatury podsumowujący dotychczasowe badania na gatunkach *Fagopyrum* w kulturach *in vitro*; (2) ocenę globalnych zmian w modyfikacjach białek histonowych i metylacji DNA w kalusach *F. esculentum* i *F. tataricum* o zróżnicowanej zdolności do embriogenezy; (3) zbadanie korelacji między poziomem modyfikacji epigenetycznych w genach kodujących białka i polisacharydy ściany komórkowej a procesami odróżnicowania i różnicowania w kalusach *F. tataricum* o różnym potencjale do regeneracji; (4) ocenę poziomu zmian metylacji DNA oraz ekspresji genów kodujących metylazy i demetylazy DNA w kwiatach gryki na różnym etapie rozwoju.

W dysertacji zastosowano szeroki wachlarz technik obejmujący kultury *in vitro*, utrwalanie materiałów roślinnych i ich preparatykę, barwienia cytologiczne (błękit toluidyny) oraz immunocytochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał, obserwacje mikroskopowe (światło przechodzące i fluorescencja), reakcję immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-qPCR) i techniki molekularne (elektroforeza, łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), ilościowy PCR (qPCR)), a także analizy bioinformatyczne oraz statystyczne.

Najważniejsze wyniki

Publikacja **P1** (Tomasiak i in. 2022) ma charakter przeglądowny. Opisuje badania i postępy w kulturach *in vitro* rodzaju *Fagopyrum*. Praca zawiera podrozdziały dotyczące indukcji kalusa, regeneracji roślin, kultur korzeni włóśnikowatych, syntezy metabolitów wtórnych i otrzymywania roślin transgenicznych. Zamieszczono również oddzielny rozdział skupiający się na perspektywach ulepszania gryki z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Publikacja ta niewątpliwie stanowiła dobrą bazę do podjęcia dalszych zaplanowanych badań.

Publikacja **P2** (Tomasiak i in. 2023) dotyczy oceny globalnych zmian w modyfikacjach białek histonowych i metylacji DNA w kalusach o zróżnicowanym potencjale embriogennym. Badania prowadzono na unikatowym materiale tj. długoterminowych kulturach kalusów *F. esculentum* i *F. tataricum*. W publikacji opisano szczegółowo budowę morfologiczną i histologiczną poszczególnych typów kalusa ukazując cechy charakterystyczne dla każdego typu. Następnie opisano wyniki analiz globalnych zmian w poziomach modyfikacji epigenetycznych (metylacja DNA, metylacja i acetylacja histonów) podczas odróżnicowania i ponownego różnicowania komórek kalusów gatunków *Fagopyrum*. Wykazano, że obniżony poziom metylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me2) jest skorelowany z odróżnicowaniem komórek kalusie embriogennym *F. esculentum* i kalusie morfogennym *F. tataricum*; natomiast obniżony poziom metylacji DNA jest najprawdopodobniej powiązany z nabyciem potencjału embriogennego i ponowną inicjacją proembriogennych kompleksów komórkowych w kalusie morfogennym *F. tataricum*. W kalusie niemorfogennym *F. tataricum* spośród wszystkich badanych modyfikacji acetylacja histonów wykazała największą zmienność, uzyskując najwyższe poziomy w momencie występowania procesów różnicowania komórek i szybkiego tempa przyrostu komórek kalusa.

W publikacji **P3** (Tomasiak i in. 2024) analizowano i porównywano poziom ekspresji wybranych genów kodujących enzymy odpowiadające za reorganizację składników ściany komórkowej oraz poziom trimetylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me3) pomiędzy morfogennym i niemorfogennym kalusem *F. tataricum*. Wykazano, że w kalusie morfogennym *F. tataricum* w badanych genach białek oraz polisacharydów ściany komórkowej (*PMEI*, *PME*, *PX*, *EXT1* i *PG2*) poziom metylacji histonu H3 wzrastał wraz z kolejnymi pasażami, co wskazuje na ich wzmożoną aktywność podczas procesów odróżnicowania komórkowego. W badaniach zastosowano nowoczesną metodę immunoprecypitacji chromatyny ChIP. Analiza sekwencjonowania ChIP wykazała wyższy poziom metylacji histonu H3 na lizynie 4 w kalusie niemorfogennym w porównaniu z kalusem morfogennym. Kolejna analiza ChIP-qPCR przeprowadzona dla konkretnych genów zaangażowanych w biosyntezę i modyfikację ściany

komórkowej (np. *PG1* oraz *EXT1*) wykazała, że modyfikacja H3K4me3 odgrywa kluczową rolę w aktywacji genów zaangażowanych w biosyntezę i reorganizację ściany komórkowej u gryki tatarskiej.

Procesy związane z metylacją DNA w tkankach wegetatywnych roślin zostały szeroko zbadane, natomiast danych na temat metylacji DNA podczas rozwoju kwiatów jest niewiele. Publikacja **P4** (Sala-Cholewa i in. 2024) opisuje wyniki analiz poziomu metylacji DNA podczas rozwoju kwiatów u obco i samopylnych form gryki. Poziom metylacji badano w elementach (płatki, nektarniki, zalążnie, znamiona słupka) kwiatów zamkniętych i otwartych obcopolnej *F. esculentum* i samopylnej *F. tataricum*. U *F. esculentum*, która jest rośliną samoniezgodną, występuje distylia, objawiająca się różnicami w długości słupków i pylników w kwiatach (Pin i Thrum). Zaobserwowano różnice w poziomach metylacji DNA między kwiatami typu Pin i Thrum u *F. esculentum*, jak i w kwiatach *F. tataricum*. Wykazano również, że spadek metylacji DNA korelował z obniżoną ekspresją genów kodujących metylotransferazy DNA. W otwartych kwiatach Thrum ekspresja *MET1* była znacznie niższa niż w kwiatach zamkniętych, natomiast w zamkniętych i otwartych kwiatach Pin zmiana w poziomie ekspresji *MET1* była podobna. Obserwowano również obniżoną transkrypcję innych analizowanych genów (*CMET3*, *DME1*, *DME3*, *ROS1*) w otwartych kwiatach Pin. Badania ujawniły różnice we wzorach metylacji DNA w wybranych elementach kwiatów typu Pin i Thrum u *F. esculentum*, oraz *F. tataricum*, co wskazuje na ważną rolę modyfikacji epigenetycznej podczas rozwoju kwiatów u gryki.

Oświadczenia autorów oraz pozycja na liście autorów w/w publikacji pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że udział Pani mgr A. Tomasiak w realizacji prac przedstawionych w rozprawie był znaczący i w pełnym zakresie wypełnia wymagania sformułowane przez ustawodawcę w odniesieniu do prac zbiorowych, w tym kryterium indywidualnego wkładu kandydata.

Najważniejsze osiągnięcia

Na podstawie przedstawionej do ewaluacji dokumentacji publikacyjnej do najważniejszych osiągnięć Pani mgr Alicji Tomasiak należy zaliczyć:

1. Kompleksową charakterystykę kalusów w długoterminowych kulturach dwóch gatunków *Fagopyrum* o zróżnicowanej zdolności do embriogenezy oraz udokumentowanie różnic w poziomie modyfikacji epigenetycznych między badanymi kalusami (**P2** (Tomasiak i in. 2023)).
2. Wykazanie różnic w poziomie trimetylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me3) pomiędzy kalusami morfogennym i niemorfogennym w *F. tataricum* (**P3** (Tomasiak i in. 2024)).

3. Wykazanie różnic w metylacji DNA oraz poziomie ekspresji genów kodujących metylazy i demetylazy DNA w kwiatach *F. esculentum* (Pin i Thrum) oraz *F. tataricum* podczas ich rozwoju (P4 (Sala-Cholewa i in. 2024)), co wskazuje na ważną rolę metylacji w procesach rozwoju kwiatów u obu gatunków *Fagopyrum*.

Ponadto Pani mgr Alicja Tomasiak wykazała swój udział w przygotowaniu dwóch rozdziałów w monografiach wydawnictwa Springer z serii '*Methods in Molecular Biology*'. W obydwu monografiach Autorka prezentuje opisy metodyk wykorzystanych podczas badań do doktoratu i występuje w tych publikacjach jako pierwszy autor. Wyniki badań zostały również prezentowane ustnie na trzech konferencjach naukowych (1 zagraniczna i 2 krajowe). Doktorantka w trakcie trwania studiów doktoranckich odbyła także dwumiesięczny staż zagraniczny w na Uniwersytecie Autonomicznym w Barcelonie. Powyższe aktywności wskazują na bardzo duże zaangażowanie Doktorantki w prowadzone badania jak i umiejętność ich prezentacji i nawiązywania współpracy.

Komentarze, uwagi krytyczne oraz kwestie do wyjaśnienia

1. Punktacja MNiSW błędnie przypisana do czasopisma. Publikacja P4 (Sala-Cholewa i in. 2024) wydana w BMC Plant Biology ma zaniżoną punktację. Według komunikatu Ministra Nauki z dnia 5.01.2024 w sprawie wykazu czasopism naukowych, punkty MNiSW dla tego czasopisma wynosiły 140 a nie 100. Pomyłka ta wpływa na sumaryczną punktację publikacji stanowiących dysertację i powinna ona wynosić 480, a nie 440.
2. Na stronie 13 w rozdziale 'Wstęp' umieszczono schemat, lecz opis jego jest nie jasny. Nie opisano co oznaczają poszczególne kolory komórek, co oznaczają bordowe strzałki oraz jakie modyfikacje zastosowano w stosunku do schematu Feher (2019).
3. Str. 16 akapit 2. Ryciny o których mowa w tym akapicie są zamieszczone na stronie 18, a nie jak podano na 16.
4. Na stronie 20 w rozdziale 'Hipotezy' nie jest jasne sformułowanie zawarte w hipotezie 1 brzmiące 'Procesom cyklicznego rozwoju kalusa gryki zwyczajnej i gryki tatarskiej w warunkach kultur *in vitro* towarzyszą zmiany ...'. Co w kontekście przeprowadzonych badań można uznać za 'cykliczne procesy rozwoju kalusa'?
5. W związku z postawionymi hipotezami, proszę zdefiniować i wskazać różnice między różnicowaniem i odróżnicowaniem komórek w tkance kalusowej oraz np. tkance w merystemycznej.
6. Nie jest jasne, dlaczego pozostawiono puste wiersze na stronach np.23, 37.

7. W skróconym opisie wyników z publikacji P2 (str. 29) oraz w treści publikacji P2 Autorzy sugerują, że podwyższone poziomy acetylacji w kalusie nieembriogennym w poszczególnych dniach obserwacji (np. Fig. 4k-l w P2) mogą być skorelowane z endoreplikacją. Jednakże w omawianej publikacji nie wykonywano żadnych analiz mogących wskazać jednoznacznie, że endoreduplikacja faktycznie zaszła we wskazanym przedziale czasu. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie wysnuto takie wnioski.
8. W skróconym opisie wyników z publikacji P4 (str. 40) Autorka pisze 'Porównanie globalnej metylacji DNA i ekspresji genów w obu typach kwiatów *F. esculentum* ... i *F. tataricum*, wskazało na różnice między nimi, co może być zarówno przyczyną bądź skutkiem samo-niezgodności.' Proszę o rozwinięcie tej myśli i uzasadnienie w jaki sposób wykryte różnice mogą stanowić przyczynę lub skutek samoniezgodności.

Podsumowanie

Stwierdzam, że rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki oraz spełnia wymagania zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o **dopuszczenie** Pani mgr Alicji Tomasiak **do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Wniosek o wyróżnienie

Przedstawiona do oceny dysertacja ma wysoką wartość merytoryczną, czego potwierdzeniem jest publikacja wyników stanowiących treść dysertacji w uznanych czasopismach naukowych o wysokim sumarycznym współczynniku wpływu (IF=16,3). Wyniki zbogacają istniejący stan wiedzy na temat roli modyfikacji epigenetycznych w kulturze kalusa *in vitro* jak i w rozwoju kwiatów *in vivo*. Merytoryczny wkład Doktorantki w powstanie tych prac jest znaczący oraz bezsprzecznie udokumentowany. Pani mgr Alicja Tomasiak opanowała i biegle posługiwała się bardzo zróżnicowanym i szerokim warsztatem eksperymentalnym. Jej wiedza w temacie umożliwiła przeprowadzenie wnikliwej analizy, interpretacji i dyskusji wyników. Na podstawie powyższego **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej** Pani mgr Alicji Tomasiak.

Dr hab. inż. Agnieszka Kielkowska, prof. URK

