

dr hab. Aneta Słomka, prof. UJ
Instytut Botaniki
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 50 20
email: aneta.slomka@uj.edu.pl

Kraków, 05.01.2025 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Tomasiak pt.

„Kompleksowa analiza epigenetyczna procesów reprogramowania komórkowego w tkankach hodowanych *in vitro* oraz *in vivo* - badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*”

wykonanej w Uniwersytecie Śląskim, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska pod kierunkiem dr. hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ (promotor pracy doktorskiej) oraz dr Agnieszki Brąszewskiej (promotor pomocniczy pracy doktorskiej).

Rośliny posiadają niezwykłą zdolność do regeneracji w celu naprawy uszkodzonych tkanek. Cecha ta stanowi podstawę w kluczowych procedurach ulepszania roślin, takich choćby jak szczepienie czy transformacja genetyczna. Dzięki tej własności roślin, możliwa jest również, na drodze różnych procesów rozwojowych tj. organogeneza lub somatyczna embriogeneza, ich regeneracja na masową skalę. Na poziomie komórkowym, niezależnie od sposobu regeneracji roślin, wspólną cechą jest nabycie przez komórki pluripotencji, czyli potencjału do przekształcenia się w dowolny typ komórek. Proces ten wiąże się z intensywnym przeprogramowaniem profili ekspresji genów, za to z ograniczonymi, jeśli w ogóle, zmianami w informacji genetycznej zapisanej w DNA.

Głównym celem pracy doktorskiej wpisującej się w badania realizowane w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem jest Promotor pracy doktorskiej mgr Alicji Tomasiak, dr hab. Alexander Betekhtin, prof. UŚ, było przeprowadzenie kompleksowej analizy porównawczej prowadzącej do opisanie na czym polega przeprogramowanie komórek podczas tworzenia różnych rodzajów kalusa: embriogenego (EK), nie-morfogenego (NK), morfogenego (MK), a także podczas rozwoju kwiatów z genetycznie uwarunkowaną heterostylią (różnosłupkowość) w porównaniu z kwiatami charakteryzującymi się homostylią. Badania te są kontynuacją prac prowadzonych wcześniej przez Promotora pracy doktorskiej wraz z zespołem, dzięki którym m.in. opracowany i wstępnie przebadany został model badawczy użyty w pracy doktorskiej - niestabilny genetycznie kalus NK i bardziej stabilny genetycznie kalus MK *Fagopyrum tataricum*.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje cykl czterech artykułów naukowych (jednej przeglądowej – P1 i trzech oryginalnych – P2-P4) opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR (*Journal Citation Reports*) w latach 2022-2024. W trzech pracach (P1-P3) Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej (P4), równorzędnym pierwszym autorem. Współczynniki przebiccia czasopism, w których opublikowane są artykuły naukowe, są wysokie i mieszają się w zakresie 2,1-5,6. Aby móc wyciągnąć wnioski, które przedstawione zostały na stronach 43. i 44. pracy doktorskiej, mgr Alicja Tomasiak musiała być niezwykle zaangażowana w przygotowanie artykułów naukowych składających się na rozprawę doktorską na wszystkich etapach ich powstawania - odniosę się do tego jeszcze w dalszej części recenzji.

Oprócz wydruków i listy artykułów naukowych wchodzący w skład pracy doktorskiej, Autoreferat obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, siedmiostronicowy wstęp, dwustronicowe cele i hipotezy badawcze oraz dwustronicowe materiały i metody. W celach i hipotezach badawczych pracy Doktorantka nieco za bardzo skupiła się na technicznych aspektach badań, przez co nieco rozmyte zostały właściwe cele badawcze. Wyeksponowane jako cele pracy analizy są celami operacyjnymi i stanowią raczej podstawę do rozwiązania problemów badawczych i odpowiedzi na postawione pytania. Może w miejscu: Ocena globalnych zmian w modyfikacjach białek histonowych i metylacji DNA w kalusach *F. esculentum* i *F. tataricum* o zróżnicowanej zdolności do embriogenezy, lepiej byłoby zapytać: Jaki jest wzór oraz różnice/podobieństwa we wzorze modyfikacji białek histonowych i metylacji DNA w kalusach gryki o zróżnicowanych zdolnościach do embriogenezy i jakie są tego konsekwencje rozwojowe? Oczywiście to jedynie kwestia językowego (semantycznego) przeformułowania problemu, podejście do niego, metodyka, sposób wnioskowania pozostają bez zmian. Przed każdym z czterech zamieszczonych artykułów Doktorantka zamieszcza dwu- do czterostronicowe streszczenie wyników danej pracy na tle wyników innych badaczy przeplatając je informacjami o zastosowanych metodach i zamykając podsumowaniami. O ile w przypadku opisu P2, Doktorantka odsyła czytelnika do rycin w oryginalnej publikacji, o tyle w przypadku opisów P3 i P4 już tego nie robi. Biorąc pod uwagę wysoki poziom szczegółowości i złożoność prac, czasem odbiór treści, które nie są udokumentowane wykresami/rycinami/tabelami staje się utrudniony. Powyższa, niepozbawiona subiektywnej oceny, uwaga odnosi się oczywiście do formy pracy, nie jej treści. Na dwóch stronach zatytułowanych Podsumowanie i Wnioski Autorka odnosi się do postawionych wcześniej hipotez i krótko powtarza opisane wcześniej wyniki dzieląc je na dwie, obejmujące doświadczenia *in vitro* i *in vivo*, grupy. Całość kończy rozdział zatytułowany Uzupełnienie, w którym na dwóch stronach standardowego maszynopisu Doktorantka przedstawia treść rozdziału pt. *Immunoassaying for epigenetic modifications in Fagopyrum calli* autorstwa Tomasiak i in. opublikowanego w monografii wydanej przez wydawnictwo Springer w 2024 r. Rozdział ma charakter metodyczny i jest to jak można wnioskować z opracowania oraz z treści rozdziału z którą zapoznałam się sięgając do monografii, doskonały pod względem formy i treści szczegółowy protokół immunobarwień służących lokalizacji, ilościowej i jakościowej ocenie epitopów DNA, białek i polisacharydów w komórkach gryki. Po

rozdziale Uzupelnienie znajdziemy jeszcze spis literatury oraz oświadczenia wszystkich współautorów dotyczące ich wkładu w cztery manuskrypty wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Zatem pod względem formalnym całość pracy w pełni spełnia wymogi ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 pkt. 3, który mówi, że: Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej.

Przedstawiona do oceny praca spełnia również wymóg zapisany w pkt. 1. art. 187 tejże ustawy tj.: Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej. Niewątpliwie Doktorantka posiada teoretyczną wiedzę. Zagadnienia, które wnikliwie opisuje w oryginalnych artykułach tj. różne aspekty regulacji epigenetycznej, w tym metylacje DNA, metylacje i acetylacje histonów, świadczą o bardzo dobrym rozeznanii w tematyce badawczej. W pracy przeglądowej, która jest niekwestionowanym dowodem na posiadanie przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki biologicznej, Doktorantka podsumowuje sposoby uzyskiwania kalusa, korzeni włóśniowatych, drogi regeneracji, a także modyfikacje genetyczne u gatunków z rodzaju *Fagopyrum*. Wszystkie artykuły są napisane naukowym językiem, bogate w szczegóły, terminologię naukową i przez to momentami trudne do odbioru dla osoby nie będącej specjalistą w zakresie epi(genetyki), ale bynajmniej nie wynika to ze sposobu prezentacji wyników, który jest typowy dla prac eksperymentalnych oraz pracy przeglądowej z tego zakresu, ale z zaawansowanego poziomu badań. Nieco brakuje mi, zarówno w opracowaniu jak i manuskryptach eksperymentalnych holistycznego ujęcia problemu, wniosków o charakterze ogólnym i ich implikacji, choćby na potrzeby zastosowania ich w ulepszeniu hodowli gryki i szerzej roślin, biorąc pod uwagę, że mechanizmy epigenetyczne, mimo że regulowane czynnikami takimi jak genotyp, rodzaj użytych tkanek, czas i sposób hodowli, są prawdopodobnie konserwatywne u roślin. Milczeniem w pracach eksperymentalnych traktuje Doktorantka zagadnienie, o niebagatelnym znaczeniu dla regulacji transkrypcji, tj. sygnalizacji hormonalnej. W tym kontekście, nabiera znaczenia to co napisano w Materiałach i Metodach, że EK, (tj. embriogenny kalus) *F. esculentum* oraz MK (tj. morfogeny kalus) *F. tataricum* pasażowano na świeżą pożywkę co cztery tygodnie, podczas gdy NK (tj. niemorfogeny kalus *F. tataricum*) pasażowano co dwa tygodnie. Dlaczego odstępy między pasażami były różne? Taki zabieg wprowadza dodatkową zmienną do eksperymentów. Czy nie uważa Pani, że mógł on mieć wpływ na uzyskane wyniki? Czy zróżnicowana częstość pasażu mogła wpłynąć na poziom metylacji histonów oraz ekspresji genów, a przede wszystkim na różnice związane z acetylacją histonów jakie stwierdzono pomiędzy kalusem MK a NK? Wskazana w ustawie ocena samodzielności kandydata to najszerszy i zarazem najtrudniejszy do oceny aspekt kryteriów oceny rozprawy. Biorąc jednak pod uwagę, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła w powstaniu wszystkich trzech artykułów oryginalnych (prowadzenie hodowli, przeprowadzanie eksperymentów, badań laboratoryjnych oraz opracowywanie polegające na

zestawieniu oraz obróbce statystycznej i interpretacji wyników, a także przygotowywanie manuskryptów do druku) oraz napisała ich opracowanie (Autoreferat) oraz pracę przeglądową - nie mam wątpliwości co do samodzielności Doktorantki właściwej dla tego etapu kariery naukowej. O wkładzie pracy Doktorantki dowiadujemy się na podstawie przedstawionych na końcu opracowania oświadczeń Kandydatki do stopnia doktora, współautorów oraz na podstawie sekcji Udziały Autorów (*ang.* Author Contribution) znajdujących się we wszystkich pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Do rozpatrzenia pozostaje zatem pkt. 2 wspomnianego artykułu ustawy, tj.: *Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.* Praca Pani mgr Alicji Tomasiak ma niewątpliwie oryginalny charakter, prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, wiele wnosi w rozwój dyscypliny nauki biologicznej, w szczególności w zakresie regulacji epigenetycznej u roślin. Ponieważ jednak, w mojej ocenie, Doktorantka nie uchroniła się przed nieco lakoniczną formą prezentacji wyników – tu znowu zarzut do formy, nie do treści, która według wiedzy recenzentki oraz recenzentów, którzy wcześniej zaakceptowali przedłożone do druku manuskrypty, jest bezbłędna, proszę Doktorantkę aby podczas publicznej obrony odpowiedziała: Jak wytłumaczyć różnice (podać możliwe scenariusze) między poziomami H3K4me3, ekspresją genów kodujących badane białka i polisacharydy ściany komórkowej a lokalizacją i ilością epitopów pektynowych i ekstensynowych? Proszę o przedstawienie zależności i toku rozumowania na wybranej grupie związków. Mimo tego, że subiektywnie patrząc pewne zagadnienia mogły być przedstawione w nieco bardziej analityczny, dedukcyjny, a nie w typowo opisowy sposób, to merytorycznie praca jest na bardzo wysokim poziomie naukowym. Autorka wykazała się umiejętnością interpretacji wielu szczegółowych, cennych dla nauki wyników. Rozdziały Dyskusja w artykułach są bardzo dojrzałe naukowo, uwzględniają syntezę najważniejszych wyników w przedmiotowej kwestii. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Panią mgr Alicję Tomasiak najnowocześniejszych technik badawczych, takich jak CHIP (P3), czyli immunoprecypitacja chromatyny (a nie tkanki usieciowionej – najprawdopodobniej błędne tłumaczenie z angielskiego na stronie 32.), projektowanie starterów do CHIP-qPCR (P3), czy opracowanie metodyki pomiarów intensywności fluorescencji jąder w analizie globalnej metylacji DNA (P4). Na podstawie dostarczonych materiałów można również stwierdzić, że Doktorantka wyspecjalizowała się jednako w technikach z zakresu roślinnych hodowli kultur *in vitro* oraz immuno-cyto-histochemicznych. Kończąc, chciałam zapytać Doktorantkę, jaka była zmienność w poziomie metylacji DNA w obrębie każdej z dwóch grup badawczych (kwiaty otwarte oraz pąki) na tle całkowitej zmienności we fluorescencji jąder (P4). Czy upoważniła ona do rozdziału roślin na dwie grupy badawcze? Czy nie było zmienności w poziomie metylacji w obrębie grupy „pąki” oraz grupy „kwiaty otwarte”?

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Tomasiak z nawiązką spełnia wymagania zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571), dlatego wnoszę do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii

i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Alicji Tomasiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Mimo subiektywnych, drobnych uwag, wnoszonych z racji przywileju recenzenta, uważam pracę Pani mgr Alicji Tomasiak za wybitną i szczególnie ważną w aspekcie rozwoju i postępu wiedzy z zakresu epigenetycznej kontroli rozwoju roślin i tym samym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o jej wyróżnienie. Uzasadnienie: Praca prezentuje wysoki, bardzo zaawansowany poziom badań naukowych, wykorzystuje najnowocześniejsze metody badawcze, przedstawia nowatorskie, kompleksowe odkrycia z zakresu regulacji epigenetycznych u roślin, tj. na przykładzie modelowych gatunków, gryki zwyczajnej oraz tataraki udowadnia, że (1) modyfikacja H3K4me3 odgrywa kluczową rolę w aktywacji genów zaangażowanych w biosyntezę i reorganizację ściany komórkowej oraz że (2) podwyższona globalna metylacja DNA oraz ekspresja genów kodujących metylotransferazy i demetylazy w pąkach (w stosunku do kwiatów otwartych) związana jest z procesami rozwojowymi kwiatów. Dodatkowo stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Alicji Tomasiak jest manifestem Jej dojrzałości i samodzielności naukowej, ponadprzeciętnej jak na tak wczesny etap kariery naukowej.

