

Szczecin, 1.09.2022

Prof. dr hab. Ewa Kępczyńska  
Zespół Biotechnologii Roślin  
Instytut Biologii  
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych US  
71-415 Szczecin, ul. Wąska 13

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Morończyk pt. Rola acetylacji histonów w epigenetycznej regulacji somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana***

Przedstawiona do oceny rozprawy doktorskiej obejmuje :

1. autoreferat rozprawy,
2. publikacje wchodzące w skład rozprawy,
3. oświadczenia współautorów o współudziale w tworzeniu publikacji.

Autoreferat przygotowany został na podstawie 4 publikacji opisujących badania zrealizowane pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Małgorzaty Gaj na Wydziale Nauk Przyrodniczych w Katowicach, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Zespole Genetyki i Biotechnologii Somatycznych Komórek Roślin.

W skład tego opracowania wchodzi: Wprowadzenie, Cel pracy doktorskiej, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie i perspektywy, Literatura, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim.

**Poniżej wykaz 4 spójnych publikacji wchodzących w skład rozprawy opublikowanych w języku angielskim w renomowanych czasopismach międzynarodowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) i punktacji MEiN:**

1. **Morończyk J.**, Brąszewska A., Wójcikowska B., Chwiałkowska K., Nowak K., Wójcik A.M., Kwaśniewski M., Gaj M.D. 2022. Insights into the histone acetylation-mediated regulation of the transcription factor genes that control the embryogenic transition in the somatic cells of *Arabidopsis*. *Cells* 11: 863 (**IF<sub>2020</sub>- 6,600; MEiN-140**)
2. Wójcikowska B., Botor M., **Morończyk J.**, Wójcik A.M., Nodzyński T., Karcz J., Gaj M.D. 2018. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in *Arabidopsis* explants via an auxin-related pathway. *Frontiers in Plant Science* 9:1353 (**IF<sub>2021</sub>-5,753; MEiN-100**)
3. Nowak K., **Morończyk J.**, Wójcik A.M., Gaj M.D. 2020. AGL15 controls the embryogenic reprogramming of somatic cells in *Arabidopsis* through the histone acetylation-mediated repression of the miRNA biogenesis genes. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 6733 (**IF<sub>2020</sub>-5,924; MEiN-140**)

4. Nowak K., **Morończyk J.**, Grzyb M., Szczygieł-Sommer A., Gaj M.D. 2022. miR172 regulates WUS during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* via AP2. *Cells* 11: 718 (**IF**<sub>2020</sub> -6,600; **MEiN-140**).

### **Znaczenie naukowe rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr Jolanty Morończyk to kolejne, niezwykle ważne osiągnięcie zdobyte pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Małgorzaty Gaj od wielu lat zgłębiającej tajniki molekularnych mechanizmów warunkujących tranzycję komórek somatycznych w komórki embriogenne. Identyfikacja genów leżących u podstaw zdolności komórek somatycznych eksplantów do zmiany ich programu rozwojowego i tworzenia zarodków ma nie tylko znaczenie poznawcze, ale również stanowi podstawę do wykorzystania tej wiedzy w praktyce w celu optymalizacji metod produkcji sztucznych nasion wielu gatunków roślin o znaczeniu gospodarczym. Jest to kolejna praca, która dostarcza nowej wiedzy o regulacji wspomnianego procesu na poziomie epigenetycznym. Do tej pory poznane są 3 tzw. „filary epigenetyczne” kontrolujące indukcję SE - metylacja DNA, działanie miRNA oraz potranslacyjna modyfikacja histonów. Rozprawa mgr Joanny Morończyk poświęcona jest wyjaśnieniu roli acetylacji histonów (Hac) w procesie indukcji SE u *Arabidopsis thaliana*. Układem badawczym zastosowanym w recenzowanej pracy doktorskiej jest kultura embriogenna *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotypy Col-0 i Ws-2 oraz mutanty insercyjne i linie transgeniczne z nadekspresją lub interferencyjnym wyciszeniem ekspresji genów. Badania związane z acetylacją histonów Doktorantka przeprowadziła na poziomie globalnej i genowo-specyficznej chromatyny. Analizowała podczas indukcji SE globalne zmiany w poziomie Hac (metoda ELISA) oraz wykonała analizy czasowo-przestrzennego wzoru Hac (analiza immunohistochemiczna). Podjęła się również oceny zaangażowania acetylotransferaz (HAT) i deacetylaz (HDAC) histonów podczas indukcji SE poprzez (a) zbadanie ekspresji genów *HAT* i *HDAC* kodujących te enzymy jak i (b) aktywności tych enzymów (metoda Elisa), (c) ocenę zdolności do embriogenezy u mutantów (*hat/hdac* i linii transgenicznych dla wybranych genów *HAT/HDAC* (13 mutantów insercyjnych w genach *HAT* oraz 14 mutantów w genach *HDAC*, 2 linie z wyciszeniem genów *HDA6* i *HDA19* czyli *HDA6:RNAi*, *HDA19:RNAi*) oraz (d) określenie roli wytypowanych spośród genów *HAT* (*HAG1/GCN5*) i genów *HDAC* (*HDA19*) w regulacji SE-TFs (*LEC1*, *LEC2*, *BBM*) podczas indukcji SE. Doktorantka podjęła się również genowo-specyficznej analizy acetylacji dotyczącej wybranych rejonów chromatyny powiązanych z genami kodującymi TF o

kluczowej roli w indukcji SE (SE-TFs tj. *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *BBM*, *AGL15*, *WUS*, *MYB118*) oraz genów docelowych dla TFs .tj. *AGAMOUS-LIKE15 (AGL15)*- geny zaangażowane w biosyntezę miRNA : *DICER-LIKE1 (DCL1)*, *SERRATE* i *HUAENHANCER1 (HEN1)* oraz *APETALA2 (AP2)* kontrolującego *WUS (TF)*.

Reasumując, badania wykonane przez doktorantkę dostarczyły nowych, interesujących wyników, które zostały opublikowane we współautorstwie w renomowanych międzynarodowych czasopismach co świadczy o wysokiej wartości tych wyników. Są to prace współautorskie, i pomimo, że doktorantka jak i współautorzy nie podali procentowego udziału w powstaniu tych prac to biorąc pod uwagę pozycję Doktorantki w 4 publikacjach ( pierwsza w pub.1 , druga w pub.3 i 4 oraz trzecia w pub.2) oraz oświadczeń Doktorantki i współautorów uważam, że jej udział w powstaniu tych prac jest bardzo duży. Pani mgr Joanna Morończyk uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań ( publikacja 3 i 1), zbierała materiał do badań i wykonała te badania ( analiza aktywności enzymów HAT, HDAC metodą ELISA; badania molekularne CHIP-qPCR (wdrożyła tą metodę); RNA-seq; analizy ekspresji wielu genów kodujących acetylotransferazy i deacylazy, a także czynniki transkrypcyjne związane z indukcją SE; analizy odpowiedzi embriogennej eksplantów na obecność TSA, NAA,IAA; barwienie kultur eksplantów barwnikami Sudan Red 7B i NBT). Uzyskane wyniki analizowała i opracowywała. Współuczestniczyła w przygotowaniu manuskryptu publikacji nr 1 i 3.

Najważniejsze osiągnięcie, które można przypisać Doktorantce to:

- wykazanie w komórkach somatycznych eksplantów *Arabidopsis thaliana* podczas ich tranzykcji do komórek embriogennych globalnych i genowo- specyficznych zmian w acetylacji H3; obecność 2,4-D jak i trichostatyny A (inhibitor HDAC) podczas indukcji SE i wyższy poziom H3ac w porównaniu do kultury kontrolnej, nieembriogennej, sugeruje ich rolę w przeciwdziałaniu deacetylacji histonów; spadek H3ac pod nieobecność wymienionych związków w kulturze nieembriogennej (kontrola) Autorka tłumaczy reakcją komórek na stres związany z kulturą *in vitro*. Reasumując acetylacja H3 jest niezbędna dla indukcji SE.
- Zlokalizowanie, dzięki zastosowaniu metody immunohistochemicznej, w niedojrzałych zarodkach zygotycznych służących do indukcji SE, , sygnałów fluorescencji związanych z Hac; sygnały te były skumulowane w merystematy apikalnych SAM i RAM oraz w wiązkach przewodzących, natomiast w liścieniach w

- których głównie ma miejsce indukcja SE sygnały te były rozproszone co może sugerować, że tylko te komórki przechodzą tranzycję do komórek embriogennych;
- wykazanie, że w kulturze embriogennej zaindukowanej obecnością TSA ma miejsce podwyższona ekspresja genów *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* i *MYB118*, której towarzyszy podwyższony poziom acetylacji histonów H3 (H3K9/K14ac) oraz H4 (H4K5/K8/K12/K16ac), co świadczy o udziale Hac w epigenetycznej kontroli wyżej wymienionych genów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z indukcją SE. Brak zmian w poziomie H3ac/H4ac podczas SE indukowanej auksyną, pomimo podwyższonego poziomu ekspresji tych genów nie wyklucza udziału Hac w regulacji transkrypcji SE-TFs, ponieważ zmiany w Hac mogły występować w innych, niż badane, rejonach chromatyny.
  - wykazanie, że Hac uczestniczy w regulacji ekspresji genów docelowych dla SE-TFs, w tym dla kontrolowanych przez AGL15 i zaangażowanych w biogenezę miRNA genów *DCL* i *SERRATE* oraz kontrolowanego przez AP2 genu *WUS*.

### Ocena opracowania autoreferatu

Konstrukcja opracowania (autoreferatu) przygotowanego na podstawie wymienionych publikacji jest właściwa i ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z osiągnięciami Doktorantki. W podrozdziale **Wprowadzenie** w sposób przejrzysty przedstawiła na podstawie prawidłowo zgromadzonej, obszernej, literatury rolę czynników transkrypcyjnych biorących udział w procesie indukcji SE u roślin oraz ich regulację przez czynniki epigenetyczne. Najwięcej uwagi poświęciła i słusznie procesom epigenetycznym związanych z modyfikacją histonów w wyniku acetylacji tych białek; acetylacja histonów do przedmiot tej rozprawy. Analizując zawartość rozdziału **Materiał i Metody** stwierdzam, że Doktorantka włożyła ogromny wkład w celu zrealizowania postawionych celów, opanowała nie tylko żmudne techniki stosowane w kulturach *in vitro* (szczególnie u *Arabidopsis*), ale doskonale posługuje się technikami immunohistochemicznymi, ELISA i molekularnymi w tym jak pisała w oświadczeniu wdrożyła metodę i przeprowadziła analizy ChIP-qPCR.

Rozdział **Wyniki i dyskusja** w sposób zwięzły i rzeczowy obrazuje nam dokonania Doktorantki na tle wyników badań uzyskanych w innych ośrodkach. Znajduje się w tym rozdziale sporo usterek stylistycznych [niektóre z nich -np. str.19. podniesiona ekspresja genów; str. 22. podniesiona odpowiedź embriogeniczna ( podnosić można ciężary), str.24-



wyniki badań dostarczyły eksperymentalnych dowodów, a czy mogły być nieeksperymentalne w tego typu badaniach); itp.]

Bardzo cenny jest rozdział **Podsumowanie i perspektywy**- podsumowanie zawiera model ilustrujący uzyskane wyniki badań oraz co uważam za godne pochwały perspektywy. Ten podrozdział świadczy o tym, że Doktorantka jest świadoma swoich dokonań i jednocześnie ma wizję dalszych badań, a więc predyspozycje do dalszej pracy naukowej.

W podrozdziale **Wnioski** razi sformułowanie wniosku 1.1. Jak indukcja może skutkować ?

Wniosek 2.1- powinna być silna akumulacja sygnału.

Te uwagi nie mają oczywiście wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej rozprawy, mogą jedynie być przydatne w przyszłości przy redagowaniu tekstu naukowego w języku polskim.

### **Wniosek końcowy**

**Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Morończyk obejmującą autoreferat i cykl publikacji wchodzących w jej skład oceniam bardzo wysoko. Wnosi ona nowe informacje dotyczące procesów indukcji embriogenezy somatycznej u *Arabidopsis thaliana* na poziomie epigenetycznym związanych z acetylacją histonów.**

**Rozprawa spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity: Dz. U. 2017, poz. 1789), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku: Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1669), a zatem wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska o dopuszczenie mgr Joanny Morończyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Ponadto, biorąc pod uwagę wartość naukową otrzymanych wyników, fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach międzynarodowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.**

