

Dr hab. Krystyna Winiarczyk prof. nadzw.
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
20-033 Lublin
ul. Akademicka 19

Lublin, dnia 22-08-2017r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marleny Kozłowskiej
pt: „ Epigenetyczna modyfikacja chromatyny w komórkach męskiego gametofitu
Hyacinthus orientalis L. w okresie od dojrzałości pyłku do powstania komórek
plemnikowych” wykonanej w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biologii i Ochrony
Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz oraz
przy udziale promotora pomocniczego dr Katarzyny Niedojadło.**

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie naukowe

Rozwój ziarna pyłku u roślin kwiatowych jest uniwersalnym modelem do obserwacji długiej serii metabolicznych i strukturalnych zmian w obrębie dwóch różnych komórek otoczonych wspólną ścianą sporodermalną. U Angiospermae, w procesie rozmnażania płciowego, ziarno pyłku kiełkuje w łagiewkę pyłkową, która jest odpowiedzialna za transport komórek plemnikowych do woreczka zalążkowego. Tworzenie męskich komórek rozrodczych poprzedza asymetryczny mitotyczny podział haploidalnych mikrospor. Podział ten różnicuje komórki potomne na większą wegetatywną oraz mniejszą generatywną. W zależności od gatunku komórka generatywna dzieli się na dwie komórki plemnikowe wewnątrz lokulus pylnika lub w kiełkującej łagiewce pyłkowej. Komórka wegetatywna i generatywna różnią się nie tylko strukturą chromatyny w jądrze, ale również aktywnością transkrypcyjną w trakcie dojrzewania ziarna pyłku i jego kiełkowania w łagiewkę pyłkową. Komórka wegetatywna przez cały okres gametogenezy spełnia funkcje somatyczne i jej cykl życiowy zazwyczaj zatrzymuje się na fazie G₂. Natomiast komórka generatywna przechodzi pełny cykl życiowy i po podziale mitotycznym daje 2 komórki plemnikowe. U niektórych gatunków

roślin kwiatowych te dwie komórki mogą utworzyć tzw. „męską jednostkę rozrodczą”. Tworzy się ona poprzez fizyczne połączenie jądra wegetatywnego z jedną komórką plemnikową. Taka struktura nie tylko przemieszcza się w łagiewce pyłkowej do woreczka zalążkowego, ale najprawdopodobniej zapewnia również komunikację pomiędzy komórką wegetatywną a komórką plemnikową. W procesie gametogenezy ważną rolę odgrywają epigenetyczne mechanizmy kontroli aktywności genów, które zmieniają ich ekspresję bez naruszenia struktury pierwszorzędowej. Skutkiem tych modyfikacji jest zmiana wzajemnego powinowactwa histonów i DNA lub destabilizacja nukleosomów. Na poziomie DNA dotyczy to metylacji cytozyny, co może prowadzić do kondensacji chromatyny i utrudniać dostęp do czynników transkrypcyjnych. Natomiast wpływ białek histonowych na ekspresję genów jest uzależniony od rodzaju zmian potranslacyjnych takich jak metylacja, acetylacja i fosforylacja. Ponieważ zmetylowane formy DNA oraz zmodyfikowane potranslacyjnie białka histonowe mogą być dziedziczone przez następne pokolenia, celowe jest sprawdzenie w jaki sposób takie dziedziczenie zachodzi. Zatem można stwierdzić, że badania prezentowane przez mgr Marlenę Kozłowską odpowiadają najnowszym trendom badawczym w naukach biologicznych.

Recenzja szczegółowa

Przedstawiona do recenzji praca składa się z 2 części; część pierwsza liczy 151 stron tekstu, część druga to 132 tablice dokumentacji fotograficznej wraz z podpisami.

Układ rozprawy jest typowy dla prac doktorskich, z wydzielonymi rozdziałami: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, spis literatury oraz indeks stosowanych skrótów i oznaczeń. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe.

W rozdziale pierwszym, na 37 stronach Wstępu Doktorantka zawarła informacje dotyczące rozwoju i organizacji męskiego gametofitu, opisuje tworzenie się kompleksu męskiej jednostki rozrodczej u roślin kwiatowych oraz jego rolę w procesie zapłodnienia. W oparciu o najnowsze pozycje piśmiennictwa Doktorantka przedstawia stan wiedzy z zakresu alternatywnego sposobu dziedziczenia, jakim jest dziedziczenie epigenetyczne. Jest to mechanizm umożliwiający przekazywanie cech nie poprzez zmiany w sekwencji DNA, ale poprzez modyfikacje chromatyny jako nośnika pamięci epigenetycznej. Ponieważ głównym celem badań prowadzonych przez mgr Kozłowską są modyfikacje epigenetyczne w ziarnie pyłku hiacynta, ta część stanowi najobszerniejszą część wstępu, i co ważne opiera się na

najnowszych pracach, z 2017 roku. Dane literaturowe, które są cytowane przez Doktorantkę wskazują, że rola architektury jądra komórkowego w posttranskrypcyjnych etapach dojrzewania RNA w komórkach roślin jest słabo poznana. Rozdział Wstęp napisany jest w sposób wyczerpujący, wskazujący na dużą wiedzę Doktorantki z tego zakresu. Jego treść świadczy, o tym że mgr Marlena Kozłowska opanowała bardzo dobrze teoretyczne podstawy i doskonale przygotowała się do wykonania powierzonych Jej zadań badawczych.

Cel pracy został precyzyjnie i jasno sformułowany. Mgr Kozłowska zaplanowała poznanie i udokumentowanie przebiegu modyfikacji epigenetycznych w męskich komórkach linii generatywnej *Hyacinthus orientalis*. W rozdziale tym przedstawiono hipotezę badawczą, która postuluje, że „w regulację struktury oraz aktywności transkrypcyjnej chromatyny komórek męskiego gametofitu zaangażowane są mechanizmy epigenetyczne, w tym metylacja DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych.” Wyodrębniono dwa cele badawcze i opisano sposób ich realizacji poprzez zbadanie organizacji chromatyny w badanych komórkach, określenie dystrybucji markera metylacji DNA, enzymów deacetylujących chromatynę oraz markerów eu- i heterochromatyny. Ponadto zaplanowano przebadanie procesu kiełkowania ziaren pyłkowych hiacynta oraz pomiar tempa wzrostu łagiewek pyłkowych.

W rozdziale Materiał i Metody zostały przedstawione warunki w jakich były przeprowadzone doświadczenia, spis użytych odczynników oraz wykorzystywana aparatura badawcza. Materiałem badawczym były pylniki *Hyacinthus orientalis* odmiana komercyjna Pink Pearl. W planowaniu swoich eksperymentów, Doktorantka oparła się na wcześniejszych badaniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki UMK w Toruniu. Dzięki temu prezentowane prace badawcze mgr Kozłowskiej stanowią ich logiczną i spójną kontynuację. Do realizacji postawionych celów badawczych Doktorantka posłużyła się licznymi klasycznymi oraz nowoczesnymi metodami immunocytochemicznymi z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego i konfokalnego.

Rozdział Wyniki został podzielony na podrozdziały i każdy z nich zakończony jest krótkim podsumowaniem. Tak skonstruowany tekst znacznie ułatwia śledzenie kolejnych etapów zaplanowanych doświadczeń. Dodatkowym ułatwieniem są bardzo pomocne graficzne zestawienia uzyskanych wyników w postaci 13 wykresów i 15 rysunków. Prezentację wyników swoich prac badawczych mgr Kozłowska rozpoczyna charakterystyką badanego materiału. W oparciu o zebraną dokumentację fotograficzną Doktorantka przedstawia ultrastrukturę łagiewki pyłkowej, organizację męskiej jednostki rozrodczej oraz zmiany w jądrach badanych komórek w okresie od dojrzałego, odwodnionego ziarna pyłku aż do

wytworzenia komórek plemnikowych w łagiewce pyłkowej. W stadium dwukomórkowych ziaren pyłku, w jądrze komórki generatywnej, następuje reorganizacja chromatyny jako etap przygotowanie do mitozy. Epigenetyczne modyfikacje DNA w komórkach męskiego gametofitu hiacynta mgr Kozłowska przeprowadziła przy użyciu zmodyfikowanej formy cytozyny (5mC), którą zastosowała jako wyznacznik metylacji DNA. Kolejne etapy rozwoju męskiego gametofitu ujawniły zmiany w dystrybucji zmodyfikowanej cytozyny oraz różne jej poziomy w komórkach plemnikowych. Wykazano, że u hiacynta poziom metylacji DNA jest pozytywnie skorelowany ze stopniem kondensacji chromatyny w komórkach męskiego gametofitu. W początkowym etapie wzrostu łagiewek pyłkowych w jądrze wegetatywnym zanotowano obniżony poziom metylacji DNA, natomiast wzrost metylacji obserwowano w czasie dojrzewania komórek plemnikowych. Próbę kontrolną w tej części eksperymentu stanowiły komórki, na których reakcję cytochemiczną przeprowadzono z pominięciem przeciwciała pierwotnego.

Badania dotyczące obecności enzymów modyfikujących białka histonowe w komórkach męskiego gametofitu hiacynta wykazały, że wzorzec znaczników epigenetycznych w rejonie bliskiego sąsiedztwa jądra wegetatywnego oraz jądra komórki generatywnej wskazuje na podwyższony poziom aktywności transkrypcyjnej w tym obszarze.

Wpływ inhibitorów metylacji DNA i deacetylaz histonowych na kiełkowanie ziaren pyłkowych i wzrost łagiewek pyłkowych Doktorantka przeprowadziła przy użyciu różnych stężeń odpowiednich związków hamujących. Do pożywek hodowlanych dodawany był inhibitor metylacji DNA (5-azacytydyna) oraz inhibitor deacetylaz (maślan sodu). Uzyskane wyniki pokazały, że inhibitor metylacji DNA nie wpływa w sposób znaczący na kiełkowanie ziaren pyłku oraz na tempo wzrostu i ich długość. Natomiast inhibitor deacetylaz histonowych zastosowany w odpowiednim stężeniu może hamować kiełkowanie ziaren pyłkowych hiacynta oraz zmniejszyć tempo wzrostu łagiewek.

Z punktu widzenia recenzenta-embriologa szczególnie interesujące są fragmenty dotyczące organizacji ultrastrukturalnej męskiej jednostki rozrodczej. U hiacynta ta wyjątkowa jednostka ulega dynamicznym zmianom strukturalnym. W czasie przemieszczania w łagiewce pyłkowej jądra wegetatywne i generatywne zmieniają kształt, dochodzi do ich stopniowego zbliżania, a w końcowym okresie wzrostu łagiewki pyłkowej do ich oddalenia. Doktorantka odnotowała, że u hiacynta w obszarze bezpośredniego sąsiedztwa jądra wegetatywnego i generatywnego obserwowwała nie tylko zmiany w organizacji chromatyny, ale także odmienny poziom i wzorzec rozmieszczenia znaczników epigenetycznych. Dlatego czuję pewien niedosyt, że mgr Kozłowska nie wzbogaciła swojej rozprawy o elektronogramy z tego

obszaru, które pokazałyby jego ultrastrukturę. Tym bardziej, że jak pisze w dyskusji str. 132, w obszarze sąsiadujących jąder MGU może dochodzić do komunikacji jądra wegetatywnego z komórkami plemnikowymi.

W rozdziale Dyskusja mgr Marlena Kozłowska interpretuje uzyskane wyniki badań na tle innych prac z tego zakresu. Ten rozdział jest napisany w sposób bardzo dojrzały, świadczy o naukowej dociekliwości i dużej znajomości podjętego tematu. Uzyskane wyniki doświadczeń potwierdzają hipotezę badawczą, którą postawiła mgr Kozłowska na początku rozprawy. Udowodniła, że u hiacynta proces metylacji DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych odpowiedzialne są za prawidłową interakcję pomiędzy jądrem wegetatywnym i generatywnym w ziarnach pyłkowych po wypyleniu. Czasowo-przestrzenne zmiany w rozmieszczeniu odpowiednich markerów wskazują na różny epigenetyczny status komórki wegetatywnej i generatywnej, co wypływa z ich odmiennych funkcji, jakie pełnią w męskim gametoficie. Należy podkreślić, że badania zmian epigenetycznych w jądrze wegetatywnym i generatywnym podczas tworzenia łagiewki pyłkowej są pionierskie i z pewnością wyniki uzyskane przez mgr Kozłowską będą w przyszłości licznie cytowane.

Dokumentacja fotograficzna rozprawy mgr Marleny Kozłowskiej jest bardzo dobrej jakości, przygotowana z dużą starannością, a jej analiza nie pozostawia czytelnikowi żadnych wątpliwości. Niektóre z fotografii zasługują na szczerze uznanie, np. Tablice 7- 10. Jedyne zastrzeżenie budzą mikrofotografie prezentujące ultrastrukturę łagiewki pyłkowej (Tablica 2 Fot. A-G). Jakość elektrtonogramów oraz zastosowane powiększenie uniemożliwia identyfikację organelli w komórce. Dlatego nie mogę się odnieść do merytorycznego opisu tej tablicy. Chciałabym uzyskać odpowiedź na pytanie czy w trakcie obserwacji prowadzonych w TEM mgr Kozłowska zauważyła jakiegokolwiek zróżnicowanie komórek plemnikowych u hiacynta. Wprawdzie w pracy Zienkiewicza i współautorów (2011) opisano, że są one izomorficzne, ale chciałabym poznać opinię Doktorantki, szczególnie w kontekście ujawnienia różnic epigenetycznych w komórkach plemnikowych hiacynta.

Chciałam podkreślić, że recenzowana praca jest wykonana niezwykle starannie pod względem edytorskim. Bardzo pozytywne wrażenia dostarcza dokumentacja fotograficzna. Jedyne drobna uwaga dotyczy używania przez Doktorantkę angielskiego terminu „spot” zamiast polskiego wyrazu „plamka”.

Wniosek końcowy

Badania prezentowana w pracy doktorskiej mgr Marleny Kozłowskiej uzupełniają skromną wiedzę z zakresu dziedziczenia epigenetycznego u roślin kwiatowych. Problemem badawczy,

którego rozwiązania podjęła się mgr Marlena Kozłowska jest nie tylko nowy poznawczo, ale również o dużej wadze naukowej. Potwierdzeniem wartości naukowej recenzowanej pracy jest niewątpliwie opublikowanie części wyników w czasopiśmie Plant Reproduction.

Uważam zatem, że praca przygotowana przez Panią mgr Marlenę Kozłowską w oparciu o oryginalny materiał badawczy spełnia wymagania określone w art. ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy recenzowanej pracy wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Krzysztof Wiśniewski