

Prof. dr hab. Jerzy Bohdanowicz
Katedra Cytologii i Embriologii Roślin
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marleny Kozłowskiej pt. „Epigenetyczne modyfikacje chromatyny w komórkach męskiego gametofitu *Hyacinthus orientalis* L. w okresie od dojrzałości pyłku do powstania komórek plemnikowych” wykonanej w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz

Wielokierunkowe badania nad rozwojem męskiego gametofitu hiacynta wschodniego prowadzone są w Zakładzie Biologii Komórki UMK od szeregu lat. W ostatnich latach doprowadziły one do odkrycia dynamicznych zmian w aktywności transkrypcyjnej komórek gametofitu zarówno w okresie jego dojrzewania, jak i podczas rozwoju powypyleniowego, czyli w kielkującym pyłku i rosnącej łagiewce pyłkowej. Praca doktorska mgr Marleny Kozłowskiej jest logiczną kontynuacją tych badań. Wybór zarówno jej tematu, jak i dróg prowadzących do końcowych wyników uważam za w pełni uzasadniony.

Głównym zadaniem Doktorantki było zweryfikowanie postawionej w rozprawie hipotezy badawczej, zgodnie z którą: „W regulację struktury oraz aktywności transkrypcyjnej chromatyny komórek męskiego gametofitu hiacynta zaangażowane są mechanizmy epigenetyczne, w tym metylacja DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych. Podczas jego powypyleniowego rozwoju mechanizmy te koordynują prawidłową interakcję między jądrem wegetatywnym a komórką generatywną/gametami.” Realizacji tego zadania służyć miały dwa podstawowe cele badawcze. Pierwszy to poznanie modyfikacji epigenetycznych w komórkach męskiego gametofitu *Hyacinthus orientalis* w okresie od dojrzałości ziaren pyłkowych do wytworzenia komórek plemnikowych w łagiewce pyłkowej, drugi to poznanie wpływu metylacji DNA i acetylacji histonów na kielkowanie pyłku i wzrost łagiewki pyłkowej.

Rozprawa doktorska mgr Marleny Kozłowskiej składa się z dwu części: opisowej oraz dokumentacji. Część opisowa, przedstawiona na 151 stronach wydruku komputerowego, zawiera: spis treści, streszczenie, anglojęzyczny abstrakt, wykaz stosowanych skrótów oraz 7 głównych rozdziałów, podzielonych na szereg kolejno ponumerowanych podrozdziałów. W części tej znajduje się również 15 rysunków, 13 wykresów i 5 tabel. Drugi z wydruków, opatrzony podtytułem DOKUMENTACJA, składa się z 32 opatrzonych legendą tablic, zawierających 7 mikrografii elektronowych i ponad 200 mikrofotografii. Elektroniczna wersja tej części pracy znajduje się na płycie CD, dołączonej do wydruku.

Struktura rozprawy, podział jej treści, kolejność rozdziałów są typowe dla prac doktorskich z biologii.

Rozdział WSTĘP, liczący 36 stron, Doktorantka rozpoczęła od krótkiego przypomnienia podstawowych informacji dotyczących powstawania ziarna pyłkowego i wzrostu łagiewki pyłkowej a następnie dokonała przeglądu literatury opisującej organizację męskiej jednostki rozrodczej oraz aktywności transkrypcyjnej komórek gametofitu męskiego. W dalszych podrozdziałach omówiła strukturalną organizację chromatyny i jej modyfikacje o charakterze epigenetycznym ze szczególnym uwzględnieniem tych modyfikacji, które dotąd obserwowano w komórkach gametofitu męskiego roślin kwiatowych. Zagadnienia te mgr Kozłowska przedstawiła w sposób świadczący o bardzo dobrej znajomości danych literaturowych i odpowiednim przygotowaniu do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

CEL PRACY to krótki, dwustronicowy rozdział, w którym została postawiona ww. hipoteza badawcza i sformułowano dwa podstawowe cele badawcze oraz drogi ich realizacji.

Na jedenastu stronach rozdziału MATERIAŁ I METODY, opisane zostały rośliny *Hyacinthus orientalis* używane w badaniach, sposób ich hodowli i pobierania materiału. Przedstawiono, w większości przypadków kompletne i przejrzyste procedury stosowane przy przygotowywaniu preparatów mikroskopowych, skład wykorzystywanych roztworów oraz charakterystyki przeciwciał używanych do immunofluorescencyjnej lokalizacji markerów epigenetycznych. Ponadto wymieniona została aparatura badawcza i programy jakich używano do rejestracji, obróbki i/lub analizy obrazów mikroskopowych oraz opisano podstawowe parametry i ustawienia mikroskopu fluorescencyjnego szerokiego pola oraz m. konfokalnego.

Rozdział WYNIKI, stanowiący najobszerniejszą, czterdziestosiedmiostronicową część rozprawy, rozpoczyna charakterystyka badanego materiału i zdefiniowanie 6 stadiów powypyleniowego rozwoju gametofitu męskiego u hiacynta: I – dojrzałe, odwodnione ziarno

pyłku (ZP), II – uwodnione ZP, III – kiełkujące ZP, IV – łagiewka pyłkowa (ŁP) we wczesnym etapie wzrostu, V – ŁP w późnym etapie wzrostu oraz VI – ŁP z komórkami plemnikowymi. Kolejno przedstawione zostały obserwacje nad zmianami w kondensacji chromatyny komórek gametofitu zachodzącymi w trakcie ww. stadiów. Dalsze podrozdziały zawierają szczegółowe rezultaty badań immunolokalizacyjnych nad rozmieszczeniem i poziomem:

- 5-metylocytozyny – znacznika metylacji DNA i heterochromatyny (5.3.1.),
- deacetylazy 1 histonów (5.4.1.) i deacetylazy 3 histonów (5.4.2.) – enzymów uczestniczących w regulacji acetylacji histonów,
- acetylowanego histonu H4 (5.5.1.), trimetylowanego histonu H3 w pozycji lizyny 4 (5.5.2.) oraz monometylowanego histonu H3 w pozycji lizyny 36 (5.5.3.) – znaczników euchromatyny,
- trimetylowanego histonu H3 w pozycji lizyny 27 (5.5.4.) – znacznika heterochromatyny (fakultatywnej).

Końcowe podrozdziały WYNIKÓW zawierają rezultaty badań nad wpływem poniższych inhibitorów na powypyleniowy rozwój gametofitu męskiego:

- 5-azacytydyny – inhibitora metylacji DNA (5.6.1.) oraz
- maślanu sodu – inhibitora deacylaz histonowych (5.6.2.).

Większość podrozdziałów tej części rozprawy Autorka zamyka graficznym i/lub kilkupunktowym podsumowaniem.

Na dwudziestu czterech stronach rozdziału DYSKUSJA Doktorantka zwięźle oraz rzeczowo interpretuje i porównuje wyniki własnych badań i obserwacji z danymi uzyskanymi przez innych autorów, umiejętnie wykorzystując dostępną literaturę. W pięciu podrozdziałach omawia kolejno:

- wzory modyfikacji epigenetycznych obserwowanych w komórkach gametofitu męskiego na tle aktywności transkrypcyjnej tych komórek,
- mechanizmy aktywowania i hamowania aktywności transkrypcyjnej w jądrach komórek generatywnych i plemnikowych,
- mechanizmy metylacji DNA w komórkach gametofitu męskiego,
- hipotezy dotyczące strukturalnych i funkcjonalnych aspektów tworzenia męskiej jednostki rozrodczej oraz
- wpływ wybranych inhibitorów metylacji DNA i deacylaz histonowych na kiełkowanie i wzrost łagiewki pyłkowej.

Rozdział WNIOSKI jest składającą się z 10 punktów listą wniosków, sformułowanych w oparciu o analizę wyników przeprowadzonych badań i danych literaturowych.

Rozdział SPIS LITERATURY zawiera wykaz 245 pozycji bibliograficznych, cytowanych w pracy.

W mojej ocenie Pani mgr Marlena Kozłowska bardzo dobrze wywiązała się z podjętych zadań i zrealizowała założone cele pracy. Do wykonania zaplanowanych eksperymentów badawczych posłużyła się nowoczesnymi metodami i technikami laboratoryjnymi, które w pełni opanowała i potrafiła odpowiednio wykorzystać, o czym świadczą uzyskane dzięki temu wyniki. Na docenienie zasługuje także duży wkład pracy, włożonej przez Doktorantkę w przeprowadzenie tych badań, na których złożoność wskazuje choćby wykorzystanie 7 przeciwciał do procedury immunofluorescencyjnej lokalizacji znaczników modyfikacji epigenetycznych wykonywanej na 2 typach preparatów (skrawkach półcienkich i protoplastach z zachowaną trójwymiarową strukturą chromatyny) i 6 stadiach rozwoju gametofitu męskiego.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w recenzowanej rozprawie zaliczam:

- określenie zmian jakie zachodzą w czasowym i przestrzennym rozmieszczeniu znaczników modyfikacji epigenetycznych w komórkach gametofitu męskiego *Hyacinthus orientalis* w kolejnych stadiach jego rozwoju: od dojrzałego ziarna pyłku, do łagiewki pyłkowej z komórkami plemnikowymi;
- wykazanie, że w chromatynie komórek generatywnych i plemnikowych nie występuje histon H3 trimetylowany w pozycji lizyny 27 – znacznik heterochromatyny;
- ustalenie, że w rosnącej łagiewce pyłkowej, blisko siebie położone regiony jądra wegetatywnego i jądra komórki generatywnej przyjmują specjalne piętno epigenetyczne (m.in. struktura chromatyny jest tam rozluźniona, poziom znaczników euchromatynowych wysoki a heterochromatynowych niski) co może wskazywać na podwyższoną aktywność transkrypcyjną tego obszaru i jego udział w metabolicznych interakcjach pomiędzy składnikami męskiej jednostki rozrodczej;
- stwierdzenie, że inhibitor metylacji DNA (5-azacytydina) nie ma istotnego wpływu na kiełkowanie pyłku i wzrost łagiewek pyłkowych *in vitro*, natomiast inhibitor deacylaz histonowych (maślan sodu), przypuszczalnie zakłócając mechanizmy reorganizacji

chromatyny jądra wegetatywnego w początkowym okresie hodowli, opóźnia lub obniża kiełkowanie pyłku i wzrost łagiewek pyłkowych.

Nie mam poważniejszych zastrzeżeń do jakości wyników przedstawionych w rozprawie oraz sposobu ich interpretacji i udokumentowania. Język i styl rozprawy są w zdecydowanej części poprawne, tekst zwarty i logicznie ułożony, stosowana terminologia na ogół nie budzi zastrzeżeń. Dokumentacja fotograficzna zawarta w pracy jest wykonana na bardzo dobrym poziomie. Jej wysoka jakość wskazuje zarówno na bardzo dobre opanowanie metod badawczych, jak też staranność Doktorantki w przygotowaniu tej części rozprawy.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić także kilka uwag krytycznych. INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW (s. 14–15) nie jest w porządku alfabetycznym, co nie ułatwia posługiwania się nim; ponadto w SPISIE TREŚCI na s. 5 figuruje jako WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW. Tekst rozprawy zawiera kilka błędów w cytowaniu (s.21 i 146 jest Rathavan – powinno być Raghavan; na s. 25 i 26 cytowana jest praca Li i Zhu 2015, której nie umieszczono w spisie literatury; s. 36 jest Strughl – powinno być Struhl; s. 129 i 130 jest Russell i Cass 1985 – powinno być Russell i Cass 1981), kilkanaście błędów literowych (s. 8 Dykusja – zamiast Dyskusja; s. 10 ach3 – ach4; s. 13 duartion – duration; s. 14 i 24 DOU – DUO; s. 18 i 130 plasmodesm – plazmodesm; s. wegeatywną – wegetatywną; s. 19 glooves – grooves; s. 22 syntetyzone – syntetyzowane; s. 31 degraf\dacji – degradacji; s. 69 otocza – otacza; s. 102 pożywka – pożywce; s. 106 histonowanych – histonowych; s. 115 składnia – składania; s. 132 łagiewkę – łagiewkę) oraz pojedyncze uchybienia stylistyczne (s. 69 w. 2-3) lub gramatyczne (s. 70 w. 8-9). Ponadto chciałbym, aby Autorka rozważyła zastąpienie sformułowania „wzorzec dystrybucji”, wielokrotnie używanego w rozprawie, przez „wzór rozmieszczenia”. Wymienione powyżej uwagi są w większości natury redakcyjnej, nie podważają w najmniejszym stopniu uzyskanych wyników i nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości rozprawy.

Proszę także Doktorantkę o wyjaśnienie:


- czy w zdaniu ze str. 18 „W dojrzewającym ziarnie pyłku tytoniu zaobserwowano, że w błonie komórki generatywnej pojawiają się kanały podobne do plasmodesm, które określono jako „abundant plasmodesmata-like channels”, słusznie powołuje się na pracę Cresti i wsp. z 1987 r.?

- w jakim celu przetrzymywano ziarna pyłku w oparach 30% H₂SO₄ w temp. 4°C (s. 54 rozprawy); oraz
- jak rozumie następujący fragment tekstu pracy ze str. 70: „Kolejne przekroje optyczne pozwoliły zaobserwować mitozę komórki generatywnej, która odbywa się w obrębie MGU (...)”.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że Doktorantka zrealizowała założone cele pracy. Jej rozprawa dotyczy problematyki naukowej o dużym znaczeniu poznawczym, zawiera wartościowe wyniki właściwie zaprojektowanych, starannie wykonanych i bardzo dobrze udokumentowanych obserwacji naukowych. Sposób ich przedstawienia i omówienia potwierdzają, z jednej strony, bardzo dobrą orientację Doktorantki w problematyce badawczej, w ramach której praca powstała, zaś z drugiej, Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Część z zamieszczonych w dysertacji wyników badań została już opublikowana w czasopiśmie naukowym o wysokim współczynniku wpływu (Kozłowska i wsp. 2016, *Plant Reproduction*), co również potwierdza ich wysoką wartość naukową.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marleny Kozłowskiej pt. „Epigenetyczne modyfikacje chromatyny w komórkach męskiego gametofitu *Hyacinthus orientalis* L. w okresie od dojrzałości pyłku do powstania komórek plemnikowych” spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, określone w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 3 listopada 2017 roku


Prof. dr/hab. Jerzy Bohdanowicz