

Kraków, 8 sierpnia 2023 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kamili Grabowskiej zatytułowanej
„Zależna od deacetylazy histonowej 1 rearanżacja chromatyny neuronów hipokampalnych szczura
indukowana pobudzeniem”,
przygotowanej pod opieką dr hab. Adrian Magalskiej
w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej, Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów
Komórkowych oraz Pracowni Epigenetyki Przestrzennej
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Grabowskiej przedstawia wyniki badań nad mechanizmami odpowiedzialnych za rearanżację chromatyny w neuronach i znaczenie tych procesów dla plastyczności synaptycznej. Podjęta tematyka badań ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za plastyczność neuronalną, stąd też ma istotne znaczenie zarówno w obszarze neuronauk jak i biologii komórki. Należy też podkreślić, że badania przedstawione w rozprawie są częścią pracy naukowej opublikowanej w 2022 roku, która otrzymała honorową nagrodę kapituły konkursu im. Jerzego Konorskiego, co nie pozostawia wątpliwości względem znaczenia podjętej tematyki.

Rozprawa została przygotowana w języku polskim, liczy 115 numerowanych stron i ma klasyczny układ z podziałem na główne części wstępu, metod, wyników, dyskusji i bibliografii. W rozprawie zawarte są wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, które zwięźle wprowadzają tematykę i cele badań oraz podsumowują najistotniejsze wyniki. Wyniki badań zilustrowane są na 27 rycinach i 19 wykresach, przy czym większość rycin syntetycznie prezentuje bardzo obszerne doświadczenia. Piśmiennictwo zawiera łącznie 152 pozycje, które są większości odniesieniami do literatury poświęconej mechanizmom kontrolującym strukturę chromatyny i zależną od aktywności neuronalnej ekspresji genów. Praca jest napisana w sposób zrozumiały i zauważyłem jedynie pomniejsze potknięcia językowe (np. podwójna kropka na stronie 9, niekonsekwencja w pisowni c-Fos, zapożyczenia z angielskiego takie jak „reprezentują”, małe “k” w oznaczeniu potasu, itp).

Rozpoczynający rozprawę wstęp liczy 15 stron i skupia się na dwóch głównych zagadnieniach: mechanizmach odpowiedzialnych za indukowaną aktywnością neuronalną ekspresję genów oraz rearanżacji chromatyny. Część poświęcona chromatynie dobrze wprowadza tematykę badań i uwypukla rolę HDAC1, zgodnie z kierunkiem doświadczeń przedstawionych w rozprawie. Niemniej, wstęp jest chyba ogólnie zbyt zwięzły. Części poświęcone ekspresji genów indukowanych aktywnością oraz heterogenności organizacji chromatyny zrobiły na mnie wrażenie powierzchownych, bardzo skromne jest też podsumowanie całości wstępu. Pierwszy akapit wstępu jest prawie tożsamy z początkiem streszczenia. Dalej pojawia się opis synaps, który jest właściwy dla synaps pobudzających, ale niekoniecznie dla synaps nie-glutaminianergicznych lub transmisji objętościowej. Co więcej, niektóre stwierdzenia dotyczące regulacji aktywności CREB przez CaMKII wydają się sporne. Zgodnie z klasycznymi doniesieniami, zależna od jonów wapnia aktywacja CREB przebiega głównie poprzez aktywację CaMKIV, za którą odpowiada CaMKK, która z kolei może być aktywowana przez niektóre izoformy CaMKII (ale nie alfa). Bezpośrednia fosforylacja CREB przez CaMKII (podjednostki delta) może mieć działanie hamujące (wskutek fosforylacji na serynie 142). Dodatkowo, warto wspomnieć, że dwa inne białka z tej samej rodziny co CREB mają w istotnej mierze równoważne funkcje (CREM i ATF1), tworzą



heteromery z CREB i mogą go funkcjonalnie zastępować. Stąd też schematy na Rycinie 1 oraz Rycinie 27 są uproszczeniem, z którym można polemizować, szczególnie w kontekście mechanizmu aktywacji CREB. Podsumowując, jakkolwiek wstęp potwierdza wiedzę doktorantki w tematyce prowadzonych badań, jednak jest zbyt zdawkowy zważywszy na rozległość badań przedstawionych w rozprawie.

Jako cel pracy postawione jest wyjaśnienie mechanizmu kondensacji chromatyny w jądrach hipokampalnych neuronów piramidowych. Dodatkowo, wskazane cztery szczegółowe cele są de facto planem badań przedstawionych wyników i obejmują: analizę zmian organizacji chromatyny, swoistość neuronalną zmian, analizę zmian modyfikacji histonów oraz ekspresji genów i w końcu identyfikację kluczowego białka dla rearanżacji chromatyny.

Materiały i metody liczą 21 stron, z czego połowę zajmują tabele zawierające szczegółowe listy odczynników, w tym buforów, przeciwciał, odczynników wykorzystanych do barwień tkanek oraz plazmidów wraz z ich mapami. Ogromne wrażenie robi zróżnicowanie metodyki badawczej, łączącej hodowle neuronów hipokampalnych, wachlarz metod obrazowania komórek z wykorzystaniem immunofluorescencji, mikroskopii elektronowej, analizy ekspresji genów za pomocą sekwencjonowania (RNAseq) oraz zaawansowanych metod analizy obrazu. Opisy metod są zwięzłe, a miejscami zbyt zwięzłe. W szczególności, opis procedury sekwencjonowania jest minimalistyczny, z nazwy zestawu odczynników wnoszę, że metoda identyfikowała zsekwencjonowaną nić („stranded”), ale nie znalazłem żadnych informacji o liczbie, długości ani miarach jakości odczytów, albo wersjach zastosowanych algorytmów. Nie jestem pewien, jaka była wielkość próby (liczność grup) w analizie ekspresji genów, ani w jakim czasie od indukcji cLTP została przeprowadzona analiza. Brak też informacji, czy wyniki RNAseq zostały zdeponowane w jednym z publicznych repozytoriów. Opis procedury immunodetekcji białek po rozdziale w żelu jest bardzo krótki i odwołuje się do tabel, niemniej nie znalazłem nigdzie informacji względem użytego rodzaju błon (membran) do transferu. Zastosowane do analizy danych metody statystyczne są właściwe, niemniej mam kilka zastrzeżeń. Po pierwsze wskazane na początku testy Kołomogorowa-Smirnowa i Shapiro-Wilka nie potwierdzają normalności rozkładu, ale mogą stwierdzić znamienne odstępstwo od normalności. Dodatkowo, dlaczego stosowano dwa testy badające odstępstwo od normalności (tym bardziej, że drugi z nich uważany jest za znacząco lepszy)? Jaka była wielkość prób, dla których zastosowano testy normalności rozkładu? Drugą kwestią jest, że jeśli do analiz różnic między grupami stosowane były metody nieparametryczne, test Kruskala-Wallisa i *post hoc* test Dunn, to przedstawianie wyników jako średnich i standardowych błędów średniej jest niekonsekwencją. Jeśli dobrze rozumiem, na wielu wykresach (na przykład od 4 do 9) test Kruskala-Wallisa wskazany jest jako metoda porównania dwóch prób. Czy ten opis jest poprawny? Dodatkowo w przypadku analizy ekspresji genów pojawiają się wzmianki o stosowaniu poprawki do testów wynikającej z liczby porównań, ale nie mam pewności jaką metodę stosowano. Zwracam uwagę, że niektóre zmiany pokazane na wykresie 1 miały $p < 10^{-200}$ – czy są to wartości po zastosowaniu poprawki? Podsumowując ocenę tej części pracy ponownie chciałbym podkreślić, że ogromne wrażenie robi bardzo różnorodna i zaawansowana metodyka, przedstawione tabele ułatwiają wyszukiwanie informacji, ale słabością jest przesadna zdawkowość opisów i niedopracowana część opisująca metody statystyczne.

Wyniki są najobszerniejszą częścią rozprawy i na 42 stronach przedstawiają analizy ekspresji genów, zmiany zachodzące w organizacji chromatyny neuronów hipokampalnych w hodowli po pobudzeniu za pomocą mieszaniny forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny, analizę mechanizmów i znaczenia modyfikacji potranslacyjnych histonów spowodowane pobudzeniem i w końcu analizę wpływu wyciszenia ekspresji



HDAC1 na rearanżację chromatyny. Ogromne wrażenie robią ilustrujące wyniki zdjęcia barwionych z wykorzystaniem przeciwciał jąder komórkowych i ich zestawienie z obrazami uzyskanymi za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Zebrane w rozprawie wyniki pokazują ogromną pracowitość doktorantki i rozmach oraz ambicję projektu naukowego w ramach którego praca została przygotowana. Niemniej, jakkolwiek rzetelność i jakość wyników nie budzą zastrzeżeń, mam szereg uwag względem tego jak zostały zaprezentowane. Ogólnie opisy wyników są bardzo skromne, jeśli dobrze policzyłem, tylko 13 stron wyników zawiera tekst (nie licząc podpisów do rycin), cała reszta wyników to ryciny i wykresy, często zajmujące kilka kolejnych stron, jak na przykład siedem kolejnych stron zamykających wyniki. Co więcej, prawie wszystkie ryciny zawierają przykładowe wyniki i nie pokazują pełnych danych wykorzystanych do przygotowania wykresów. W tekście pojawiają się konkluzje wskazujące na zmiany (lub ich brak) w strukturze chromatyny, które zilustrowane są jedynie zdjęciami pojedynczych jąder komórkowych (na przykład 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 i 4.8). Można przyjąć, że zmiany są jakościowe i pominąć analizę ilościową, niemniej wymagałoby to chyba obszerniejszej ilustracji, lub przynajmniej opisu w tekście dokładniej opisującego na czym opiera się jednoznaczny wniosek o zmianach.

Lakoniczność wyników jest ich głównym mankamentem i dotyka ona wszystkich części przedstawionych badań. W opisie wyników analiz ekspresji wskazanym jest, że znamienne zmieniona była abundancja ponad 900 transkryptów, ale na Wykresach 1-3 opisane są jedynie wybrane geny (dodatkowo opis osi X na wykresie 1 jest błędny, jakkolwiek jest ona opisana poprawnie w legendzie). W przypadku danych pokazanych na rycinach 13 do 17 oraz 25, wyniki hybrydyzacji błon z przeciwciałami są jak rozumiem jedynie przykładami. Jaka była wielkość próby dla tych analiz? W przypadku Ryciny 25 w opisie są podane wyniki analizy statystycznej densytometrii sygnału odpowiadającego HDAC1, ale nie są pokazane wykresy z wynikami? W szeregu miejsc w wynikach pokazane są barwienia CaMKII (na przykład Ryciny 8 i 9). Zgodnie z numerem katalogowym podanym w metodach, przeciwciało użyte do badań jest swoiste do CaMKII alfa i powinno wykrywać homomery lub heteromery zawierające tę podjednostkę. Białko CaMKII alfa występuje w bardzo wysokim stężeniu w neuronach pobudzających i w takim kontekście analizowane jest w wynikach, ale wskazanym byłoby podkreślenie, że chodzi właśnie o podjednostkę alfa (co ma też istotne znaczenie dla Ryciny 27).

Podsumowując ocenę wyników rozprawy, zwracam ponownie uwagę, że są one jednocześnie obszerne i pokazują ogromną skalę badań przeprowadzonych przez doktorantkę, ale też opisane w sposób skrótowy, co znacząco utrudnia ich prześledzenie.

Dyskusja wraz z podsumowaniem liczy 13 stron i jest mojej ocenie mocną częścią rozprawy. Rozpoczyna ją zwięzłe podsumowanie wyników, po czym doktorantka przechodzi do bardzo dobrze napisanej dyskusji metodycznych aspektów zaprezentowanych doświadczeń, umiejętnie zestawiając wyniki z wcześniejszymi doniesieniami (fragment o pętlach zwrócił moją szczególną uwagę) w tym również wcześniejszej publikacji, której jest główną autorką. W dalszej części dyskusji doktorantka analizuje wyniki badań nad zależnością między acetylacją histonów i organizacją chromatyny w kontekście istniejącego stanu wiedzy, kończąc na omówieniu mechanizmów poprzez które HDAC1 może odgrywać główną rolę w kondensacji chromatyny. Jakkolwiek chętnie wdałbym się w polemikę w kwestii roli CaMKII (po raz trzeci w niniejszej recenzji), albo znaczenia acetylacji histonów w plastyczności neuronalnej, jednak w podsumowaniu oceny dyskusji mogę napisać jedynie, że jest przygotowana bardzo dobrze, unika powtórzeń, a przede wszystkim potwierdza dojrzałość naukową doktorantki.



W odpowiedzi na recenzję, oprócz odpowiedzi na pytania zawarte w ocenach poszczególnych części rozprawy, proszę również o przedyskutowanie trzech kwestii:

- W analizie ekspresji genów pojawiają geny odpowiedzi wczesnej, których ekspresja maleje po pobudzeniu. Czy spadek ekspresji genu może spowodować dwukrotny spadek abundancji transkryptu po pobudzeniu?
- Kluczowym elementem badań była stymulacja neuronów w hodowli w celu indukcji LTP. Na ile zastosowany model jest zbliżony do plastyczności neuronów *in vivo*?
- Zgodnie z przedstawionymi w rozprawie wynikami, wyciszenie białka HDAC1 powoduje zmniejszenie zależnej od indukcji cLTP kondensacji chromatyny. Niemniej, na wykresach widać tendencję do bazowo zmniejszonej kondensacji. Czy w takim razie konkluzją jest, że HDAC1 kontroluje kondensację chromatyny, czy też zależną od indukcji kondensację chromatyny?

W ocenie rozprawy przedstawiłem liczne uwagi krytyczne i chętnie wchodziłem w polemikę z interpretacją doświadczeń. Niemniej, uważam że rozprawa potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki i z całą pewnością pokazuje jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zaproponowany mechanizm rearanżacji chromatyny związanej z plastycznością neuronalną jest niewątpliwie oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i istotnym wkładem w badania z obszaru neurobiologii molekularnej. Dobitym potwierdzeniem wpływu badań doktorantki jest wyróżnienie przez kapitułę konkursu im. Jerzego Konorskiego opublikowanej w 2022 roku pracy naukowej zawierającej część badań przedstawionych w rozprawie. Stąd też stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kamili Grabowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zwracam się wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Kamili Grabowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem,

Dr hab. Jan Rodriguez Parkitna
Zastępca Dyrektora ds. Naukowych
Kierownik Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
Smętna 12, 31-343 Kraków, tel.: +48 12 6623316, e-mail: janrod@if-pan.krakow.pl

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Agnieszki K. Grabowskiej

pt. **„Zależna od deacetylazy histonowej 1 rearanżacja chromatyny neuronów
hipokampalnych szczura indukowana pobudzeniem”**

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej, Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych oraz Pracowni Epigenetyki Przestrzennej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem promotora dr hab. Adrian Magalskiej. Rozprawa doktorska została przygotowana jako klasyczne opracowanie monograficzne, obejmujące następujące rozdziały: *Wykaz stosowanych skrótów*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (po 2 strony), *Wstęp* (15 stron), *Założenia i cele pracy* (1 strona), *Materiały i metody* (21 stron), *Wyniki* (42 strony), *Dyskusja* (14 stron), *Podsumowanie i wnioski* (1 strona) oraz *Bibliografia* obejmująca 152 pozycje. Cała praca liczy 115 stron i jest bogata w liczne ryciny (27), wykresy (19) i tabele (16). W pracy zawarto informację, że badania zostały zrealizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN) Sonata Bis 5 (nr: 2015/18/E/NZ3/00730), którego kierownikiem była Pani Promotor – dr hab. Adriana Magalska.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy próby poznania mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za zmiany w przestrzennej organizacji chromatyny w jądrach komórkowych neuronów szczura poddanych pobudzeniu. W ciągu ostatnich lat dokonano ogromnego postępu w odkryciu znaczenia roli architektury jądra interfazowego w regulacji ekspresji genów w różnych typach komórek, w stanach fizjologicznych i patologicznych a zespół, z którego wywodzi się Doktorantka dokonał istotnych odkryć w poznaniu architektury jądrowej neuronów szczura. Neurony stanowią bardzo ważny obiekt badawczy, gdyż w odpowiedzi na bodźce, dochodzi do aktywacji transkrypcyjnej i plastyczności synaptycznej będącej podstawą procesów uczenia się i pamięci jak i stanów patologicznych np. padaczki. Wiele wcześniejszych prac miało charakter opisowy i pokazywało jakim zmianom podlegają wybrane frakcje chromatyny (m.in. relokalizacja wybranych terytoriów chromosomowych, reorganizacja centromerowego DNA, kondensacja chromatyny) w trakcie wzbudzenia neuronów, potwierdzając zależność z pomiędzy zmianami aktywności tych komórek a zmianami organizacji chromatyny. Mimo szeregu badań, ciągle nie jest jednak jasne przyczynowo-skutkowe powiązanie pomiędzy tymi procesami. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej podjęto się bardzo ambitnego zadania jakim jest wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za rearanżacje

chromatyny w jądrach neuronów hipokampalnych szczura indukowane pobudzeniem. Podjęty temat badawczy i nakreślone cele uważam za bardzo ważne, nowatorskie i interesujące naukowo. Ogromną wartością pracy jest zastosowanie zaawansowanych technik mikroskopowania i analizy obrazu pozwalających na analizę pojedynczych komórek neuronalnych, co stanowi wartościowe uzupełnienie danych pochodzących z analiz całych populacji komórek (m.in. wywodzących się z technik analizy konformacji chromatyny - 3C).

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Punktem wyjścia do podjęcia badań w ramach ocenianej pracy doktorskiej były wcześniej uzyskane w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej wyniki (praca magisterska - Czechowska, 2016), które wykazały, że indukcja długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w neuronach hipokampalnych szczura hodowanych *in vitro* wiąże się z globalną kondensacją chromatyny. Proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego związany jest z uruchomieniem ekspresji szeregu genów, jednak wiedza o epigenetycznej regulacji, w tym roli rearanżacji chromatyny w plastyczności synaptycznej jest niezbyt zaawansowana. Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę pracy doktorskiej i przedstawiają najważniejsze wyniki. We *Wstępie* Doktorantka opisuje neuroplastyczność i podstawy molekularne długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz dokonuje przeglądu literatury na temat organizacji chromatyny w jądrze komórkowym oraz podstaw procesów epigenetycznych. Ta część pracy napisana jest bardzo starannie i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki w omawianej tematyce. Na uwagę zasługuje odniesienie się do wielu pozycji literaturowych, w tym do prac publikowanych w ostatnich latach. Pracę wzbogacają rycina i tabela, dla których warto byłoby podać źródło opracowania. Drobną uwagę dotyczy jedynie pewnych sformułowań, które prawdopodobnie wynikają z problemów z tłumaczeniem. Przykładowo mówiąc o DNA czy chromosomie metafazowym lepiej użyć określenia „szerokość” w nm niż „grubość”. Sformułowanie „wstawienie na ich promotorach” czy „otwieranie się chromatyny” także nie jest zbyt fortunne. Jako przykład modyfikacji histonów związanych z euchromatyną podano modyfikację H3K56me3, która u ssaków występuje na dość niskim poziomie i nie jest najpowszechniej badanym znacznikiem euchromatyny a jej funkcja jest zróżnicowana. Warto byłby w tej części przywołać także inne typowe dla euchromatyny znaczniki epigenetyczne.

Założenia i główny cel pracy dotyczący poznania mechanizmu wywołującego zmiany w organizacji chromatyny w odpowiedzi na pobudzenie neuronów, zostały jasno sformułowane. Dodatkowo, określono cztery cele szczegółowe, które obejmowały analizę jakościową i ilościową zmian w przestrzennej organizacji chromatyny, określenie tempa i stopnia zmian w zależności od typu pobudzanego neuronu, sprawdzenie czy rearanżacjom chromatyny towarzyszą zmiany w modyfikacjach histonów i aktywności genów oraz identyfikację białka odpowiedzialnego za te rearanżacje. Zaplanowane zadania badawcze uznają za kompleksowe i o dużym znaczeniu poznawczym.

Rozdział *Materiały i Metody* rozpoczyna się od tabelarycznego zestawiania użytych odczynników, stosowanych roztworów i buforów oraz plazmidów i przeciwciał. Metody badawcze zostały opisane w wyczerpujący sposób. Jest to cenne opracowanie, które może stanowić materiał źródłowy pozwalający na powtórzenie czy kontynuowanie opisanych eksperymentów. W pracy zastosowano wiele metod badawczych, takich jak: prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro*, sekwencjonowanie RNA, wyciszanie genu za pomocą shRNA, barwienia immunocytochemiczne, Western blot, trójwymiarowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, mikroskopia konfokalna i elektronowa, metody analiz obrazów mikroskopowych, testy statystyczne. Na odnotowanie zasługuje

fakt, że w sytuacji kiedy Doktorantka wykonywała wybrane procedury we współpracy z innymi osobami czy wręcz niektóre z nich zostały w całości przez nie wykonane, jest to odnotowane w pracy. Cennym elementem tego rozdziału jest rycina 5 ilustrująca schemat przeprowadzonych eksperymentów, świadczący o opanowaniu szerokiego wachlarza technik badawczych stosowanych przez Doktorantkę. W części doświadczeń zastosowano układ porównawczy: komórki poddane chemicznej indukcji LTP *versus* komórki traktowane DMSO. Czy przeprowadzono analizy wskazujące na brak różnic w funkcjonowaniu komórek z DMSO i bez DMSO?

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w kolejnym rozdziale rozprawy doktorskiej. W pierwszej kolejności wykonano analizę ekspresji genów w komórkach po indukcji LTP w odniesieniu do kontroli z DMSO. Za pomocą metody RNA-Seq zidentyfikowano kilkaset genów, których poziom transkryptu wzrastał lub malał po indukcji LTP. Wyniki zaprezentowano na trzech wykresach i dwóch rycinach, które bardzo dobrze obrazują zmiany ilościowe ekspresji genów odpowiedzi wczesnej oraz prezentują grupy funkcjonalne genów. Czy wyniki uzyskane za pomocą RNA-Seq zostały walidowane dla wybranych genów za pomocą techniki Real-time PCR? Wyniki zmian w ekspresji genów wykonano dla całej populacji komórek, mimo, że zmiany w organizacji chromatyny badano oddzielnie w odniesieniu do komórek ziarnistych i komórek piramidowych. Czy są dostępne dane o różnicach w ekspresji genów w tych dwóch typach komórek? Następnie dokonano jakościowej ilościowej analizy zmian w organizacji chromatyny w komórkach ziarnistych i piramidowych po indukcji LTP. Obserwowano tworzenie silnie świecących foci DNA wizualizowanych za pomocą barwnika Hoechst, identyfikującego regiony DNA bogate w pary A-T oraz pojawianie się przestrzeni w jądrze komórkowym bez DNA. Czy obserwowany wzór reorganizacji chromatyny był także obserwowany po zastosowaniu innych barwników do DNA? Czy tworzenie się chromocentrów potwierdzano barwieniami immunofluorescencyjnymi np. z przeciwciałem przeciwko białku HP1 α lub hybrydyzacją z sondami dla sekwencji powtarzalnych? Dowiedziono, że chromatyna ulega kondensacji już po kilku minutach od indukcji a obserwowane zmiany były szybsze i intensywniejsze w komórkach ziarnistych. Wyniki obrazują bardzo dobrej jakości ryciny z mikrofotografiami z mikroskopii konfokalnej i elektronowej. Uzyskane obrazy z mikroskopu konfokalnego analizowano ilościowo i pokazano na wykresach jako punkty procentowe. Taka forma dobrze obrazuje obserwowane zmiany ale nie wynika z niej ile jąder komórkowych analizowano w każdym z punktów czasowych. Proszę o uzupełnienie tych danych w trakcie obrony. Dodatkowo, aby zobrazować zmiany w organizacji chromatyny po indukcji LTP, wykonano technikę 3D-FISH z sondą specyficzną dla chromosomu 1 szczura. W pracy podano zastosowanie techniki immuno-FISH (str. 59) – jednak nie widzę, aby dodatkowo lokalizowano też białka jądrowe. Czym było podyktowane wybranie tylko jednego chromosomu - właśnie nr 1 do analizy? Zaobserwowano, że po indukcji LTP terytorium chromosomowe zajmowało zmniejszona objętość jądra komórkowego oraz zwiększało swoją powierzchnię, co świadczyło o rozgałęzieniu i rozluźnieniu jego struktury. Zatem zachowanie terytorium chromosomowego jest odmienne od globalnej organizacji chromatyny, która ulegała kondensacji. Ponieważ za organizację w jądrze komórkowym podstawowych klas chromatyny (euchromatyny i heterochromatyny) odpowiada ekspresja białek laminy A/C i LBR, proszę o wyjaśnienie w trakcie obrony co wiadomo o ich ekspresji w badanym modelu komórkowym *in vitro*.

W kolejnym eksperymencie dokonano skutecznej inhibicji transkrypcji za pomocą trzech różnych inhibitorów (DRB, aktomycyna D, α -amanityna) i nadal obserwowano kondensację chromatyny w jądrach komórkowych neuronów. Ta część pracy potraktowana jest bardzo skrótowo. Pokazano tylko wyniki analizy jakościowej jąder komórkowych bez ich oceny ilościowej. Na rycinie 12 nie zaznaczono skali. Nie znalazłam także informacji jak czasowo przeprowadzono podanie inhibitorów względem wywołania LTP. W rozdziale *Materiały i metody* w tabeli 4 podano tylko czas działania inhibitorów (od 1h do 12h, w zależności od inhibitora). Nie jestem przekonana czy można mówić o

efekcie pobudzenia neuronów, jeśli dokonano całkowitej blokady transkrypcji i wykazano brak ekspresji kluczowych genów, będących markerami tego procesu. Jeśli w tym eksperymencie obserwowano zmiany organizacji chromatyny po samym podaniu DMSO, to wracam do mojego pytania postawionego powyżej dlaczego nie stosowano także jako kontroli komórek bez podania DMSO? Czy objętości podania DMSO między eksperymentami różniły się i czy obserwowano różnice w jądrach komórkowych pomiędzy grupami badawczymi. Wydaje się, że w przypadku α -amanityny, z która najdłużej inkubowano komórki (12h) zanik DNA jest najbardziej widoczny. Z danych literaturowych wiadomo, że samo DMSO powoduje zmiany w konformacji chromatyny, np. poprzez obniżenie poziomu acetylacji histonów oraz zmiany w metylacji DNA.

Do analizy modyfikacji histonów w jądrach komórkowych neuronów wybrano następujące znaczniki: dla heterochromatyny - H3K9me2, H4K20me2/3 i H3K27me3 oraz dla euchromatyny - H3K9ac i H3K56ac. Tak jak wspomniano wcześniej warto byłoby dodać jeszcze inną modyfikację typową dla euchromatyny np. H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3. Chętnie usłyszę na obronie dlaczego zdecydowano się na modyfikację H3K56ac. Modyfikacje te badano za pomocą barwień immunofluorecencyjnych oraz Western blot. Nie stwierdzono zmian ilościowych. Wzór rozmieszczenia znaczników heterochromatyny (H3K9me2, H4K20me2/3) w jądrach neuronów pobudzonych korespondował z rozmieszczeniem skondensowanej frakcji chromatyny. W podsumowaniu tej części wyników stwierdzono, że aktywna chromatyna przesuwiała się do wolnych przestrzeni międzychromatynowych. Jednak na podstawie pokazanych przekrojów nie można stwierdzić lokalizacji sygnału w wolnych przestrzeniach i nie badano zmian w radialnej dystrybucji tych znaczników w przestrzeni jądra komórkowego. Następnie stosując cztery wybrane inhibitory wykazano, że zahamowanie działania enzymów przeprowadzających posttranslacyjne modyfikacje histonów nie zablokowało procesu reanranżacji chromatyny w badanych komórkach. Wyniki te zobrazowano na dwóch bardzo rozbudowanych rycinach, co trochę utrudnia ich interpretację. Przykładowo na rycinie 19 nie widzę barwienia dla białka c-FOS, mimo takiego podpisu w legendzie. W opisie wyników brakuje wyjaśnień, co do badanych modyfikacji np. dlaczego wizualizowano zarówno H4K20me2/3 i H4K20me3 i co decydowało o wyborze danej modyfikacji np. dla inhibitora metylotransferazy badano H3K9ac. Proszę o odniesienie się do tych kwestii podczas obrony.

W kolejnych eksperymentach uzyskano bardzo ciekawe wyniki wskazujące na znaczenie napływu jonów wapnia do komórek dla procesu kondensacji chromatyny w stymulowanych neuronach. Zastosowanie dwóch inhibitorów kalcyneuryny (FK506 i cyklosporyny) blokowało odpowiednio ekspresję genu *c-Fos* lub prowadziło do redukcji białka c-FOS i w konsekwencji nie dochodziło do kondensacji chromatyny lub do hamowania jej kondensacji w mniejszym stopniu. Najważniejszym wynikiem pracy było wykazanie, że zablokowanie aktywności deacetylaz histonowych skutkowało zahamowaniem kondensacji chromatyny. W doświadczeniach zastosowano inhibitory deacetylaz histonowych o szerokim spektrum działania oraz specyficznych dla wybranych klas tych enzymów, co ostatecznie pozwoliło na wytypowanie do dalszych badań deacetylazy histonowej 1. W celu potwierdzenia roli tego białka w omawianym procesie, przeprowadzono eksperymenty wyciszania ekspresji genu *Hdac1* za pomocą shRNA oraz przywracania aktywności białka przez wprowadzenie jego ludzkiej formy do komórek poddanych wyciszeniu. Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane i przedstawione na 3 rycinach i 8 wykresach. W komórkach poddanych wyciszeniu, chromatyna nie podlegała rearanżacji po stymulacji neuronów, co obserwowano m.in. na podstawie porównania liczby formowanych foci DNA i ich objętości w komórkach poddanych transdukcji wektorem kontrolnym (scr) i wyciszającym ekspresję *Hdac1* (Δ HDAC1). Na niektórych wykresach istotności statystyczne zaznaczano tylko dla porównań w obrębie badanej grupy (scr i Δ HDAC1) a nie pomiędzy – czy ich brak oznacza, że takich różnic nie było? Przywrócenie funkcji białka HDAC1 prowadziło do zwiększenia liczby formowanych foci DNA i wzrostu ich objętości. Ta kompleksowa analiza pozwoliła na identyfikację

białka HDAC1 jako kluczowego dla reorganizacji chromatyny w jądrach neuronów poddanych stymulacji.

Podsumowując tę część, stwierdzam, że w pracy uzyskano szereg wartościowych i oryginalnych wyników. Forma ich prezentacji w postaci tak licznych rycin i wykresów pozwala na wnikliwą analizę uzyskanych danych. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z ich opisem i interpretacją, co świadczy o bardzo dużym przygotowaniu merytorycznym w tym zakresie.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- dokonanie kompleksowej charakterystyki zmian w przestrzennej organizacji chromatyny w neuronach hipokamplanych szczura poddanych stymulacji;
- wykazanie, że reorganizacji chromatyny towarzyszyły zmiany transkrypcji kilkuset genów oraz zmiany w potranslacyjnych modyfikacjach histonów;
- dowiedzenie, że zmiany chromatyny były zależne od napływu jonów wapnia do komórek;
- wykazanie roli białka HDAC1 jako kluczowego dla procesu kondensacji chromatyny neuronów indukowanych pobudzeniem.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka umiejętnie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi. Podkreśla zalety ale i dostrzega wady zastosowanego modelu doświadczalnego – hodowli pierwotnej neuronów hipokamplanych szczura i wybranego sposobu chemicznej indukcji pobudzenia. Kwestie, które mogą budzić pewien niedosyt po przeczytaniu wyników (m.in. badania wyłącznie na modelu komórkowym, wykonanie tylko części eksperymentów z podziałem na typy komórek, wybór do badań terytoriów chromosomowych) są umiejętnie tłumaczone w części dyskusyjnej pracy. Wskazane są także możliwości kontynuowania badań. Taka forma dyskusji świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki. Bardzo cenne jest opracowanie propozycji możliwego mechanizmu regulacji kondensacji chromatyny w neuronach po indukcji LTP ze wskazaniem roli białka HDAC1. Rozprawę dokorską kończy rozdział **Podsumowanie** i *wnioski*. Wnioski zostały poprawnie sformułowane i w pełni odpowiadają na wcześniej postawione hipotezy badawcze. Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą adekwatnych i nowoczesnych metod badawczych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem wielu technik badawczych a na szczególne wyróżnienie zasługuje umiejętność stosowania zaawansowanych technik mikroskopowych i analizy obrazu. W pracy uzyskano szereg wartościowych i oryginalnych wyników, które stanowią istotny wkład w badaniach nad poznaniem mechanizmów regulacji epigenetycznej w neuronach poddanych pobudzeniu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *„Zależna od deacetylazy histonowej 1 rearanżacja chromatyny neuronów hipokamplanych szczura indukowana pobudzeniem”* autorstwa mgr Agnieszki K. Grabowskiej spełnia wymogi formalne określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Agnieszki K.

Grabowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Biorąc pod uwagę zakres i wysoki poziom przeprowadzonych badań, duże walory poznawcze uzyskanych wyników i ich nowatorski charakter wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.

Poznań, dn. 22 sierpnia 2023r.

Krzysztof Szreniela



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
kierownik Zakładu Ekspresji Genów

Poznań, 25 września 2023

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kamili Grabowskiej
zatytułowanej „Zależna od deacetylazy histonowej 1 rearanżacja chromatyny
neuronów hipokampalnych szczura indukowana pobudzeniem”**

Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie (IBD PAN). Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Agnieszki Grabowskiej została wykonana w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej IBD PAN pod opieką merytoryczną dr hab. Adrianę Magalskiej, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim. Wcześniejsze badania zespołu kierowanego przez panią doktor zasugerowały istotną rolę zmian w organizacji chromatyny w kształtowaniu plastyczności synaptycznej, co wywiedziono z eksperymentów prowadzonych w szczurzych neuronach hipokampalnych, których stymulacja prowadziła do globalnej kondensacji chromatyny. Dlatego też zasadnym było postawienie jako cel dalszych badań wyjaśnienie molekularnych mechanizmów tego zjawiska. Elementy tego szerokiego zagadnienia stały się podstawą projektu doktorskiego mgr Grabowskiej. Zaplanowane badania miały w pierwszej kolejności ukazać jakościowe i ilościowe zmiany w organizacji chromatyny w pobudzonych komórkach nerwowych, w tym w różnych typach neuronów, aby w dalszej części zapytać o wynikające z tej zmiany modulacje ekspresji genów i potranslacyjnych modyfikacji histonów. Zwieńczeniem badań miała być identyfikacja czynników, które stoją za tak gwałtowną zmianą organizacji chromatyny w jądrach pobudzonych neuronów hipokampalnych.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi niezbyt obszerny, liczący 14 stron, wstęp omawiający istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka opisuje w nim zarówno mechanizmy molekularne stojące u podstaw neuroplastyczności jak i mechanizmy odpowiedzialne za organizację chromatyny w jądrze komórkowym. Część ta choć krótka napisana jest w sposób bardzo kompetentny i informatywny. Druga część zawiera bardzo konkretnie nakreślony cel badań z uwzględnieniem zadań szczegółowych. Może jeden z celów, cel 4, mówiący o



identyfikacji jednego białka odpowiedzialnego za obserwowany fenotyp jest nazbyt dopasowany do uzyskanych wyników, ponieważ mogę się domyślać, że Doktorantka spodziewała się odkryć więcej niż jeden czynnik zawiadujący organizacją chromatyny w badanych modelowych komórkach. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się opisem metodyki badawczej, a kończący się przedstawieniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników prowadzonych badań. Jest to tradycyjny układ pracy dyplomowej pozwalający na logiczne wprowadzanie poszczególnych treści. Na uwagę zasługuje bardzo klarowny opis poszczególnych podrozdziałów, w których znajduje się krótkie wprowadzenie ukazujące celowość podjęcia konkretnych zadań badawczych, a kończy konkluzja nie wykraczająca w większości przypadków poza realny wynik przeprowadzonych eksperymentów, głębiej przedyskutowana w ostatniej części pracy z dotychczasową wiedzą z zakresu przedmiotu prowadzonych badań.

Celem pierwszej części realizowanych badań było określenie zmian ekspresji genów na skutek natychmiastowej i opóźnionej odpowiedzi na indukcję LTP z wykorzystaniem głębokiego sekwencjonowania RNA. Badania doprowadziły do identyfikacji setek genów o zwiększonej ekspresji, w tym z nadreprezentacją genów związanych z uczeniem się, pamięcią i innymi funkcjami poznawczymi oraz istotnie mniejszej liczby genów o obniżonej ekspresji, w tym z istotnym wzbogaceniem grup związanych z synchronizacją rytmu dobowego lub prowadzeniem aksonów. Ta część pracy ma jedynie wartość opisową, ponieważ nie stanowiła punktu wyjścia do głębszych eksperymentów prowadzonych w kierunku poznania mechanizmu badanego zjawiska.

Celem drugiej części pracy było opisanie jakościowych i ilościowych różnic w kondensacji chromatyny na skutek pobudzenia neuronów ziarnistych i piramidowych. Stosując właściwie dobrane metody mikroskopowe ukazano czasowo-zależne zmiany względnej objętości zajmowanej przez DNA oraz względnej objętości najbardziej skondensowanej postaci chromatyny. Ponadto wykazano zmniejszenie terytorium chromosomu 1 w pobudzonych neuronach. W pracy Doktorantka pisze o całkowitej objętości np. DNA, chociaż nie jest to sformułowanie precyzyjne, ponieważ wartości wyrażone są w procencie sygnału pochodzącego z barwienia DNA barwnikiem Heoechst w stosunku do objętości jądra komórkowego. Zasadniczo objętość bezwzględną powinno wyrażać się np. w mikrometrach sześciennych. Nasuwa się zatem pytanie, czy zostało sprawdzone w eksperymentach kontrolnych, czy za owymi zmianami objętości względnej nie stoi zmiana całkowitej objętości jąder komórkowych w badanych warunkach eksperymentalnych. Ponadto stwierdzenie zawarte w tytule rozdziału 4.4 wymagałoby przedstawienia ilościowego wymiaru opisywanych fenotypów.



Szereg dalszych eksperymentów doprowadził z jednej strony do stwierdzenia, że istnieje asocjacja pomiędzy rearanżacją chromatyny a zmianami w lokalizacji histonów zawierających różne modyfikacje potranslacyjne, jednak z drugiej strony pokazano, że nie jest to zjawisko przyczynowo skutkowe, a sama rearanżacja chromatyny musi wynikać z innych mechanizmów.

Najciekawsze wyniki przyniosły eksperymenty przedstawione w ostatniej części pracy. Stosując szereg dobrze zaplanowanych eksperymentów Doktorantka wykazała, że kluczową grupą enzymów zaangażowaną w badany proces są deacetylazy histonowe (HDAC), a zwłaszcza jeden z jej przedstawicieli białko HDAC1. Zarówno wyciszenie ekspresji genu kodującego to białko jak i przywrócenie jego aktywności pokazały istotną rolę HDAC1 w stymulowanej przez LTP rearanżacji organizacji chromatyny. Tutaj ponownie rodzi się pytanie o sposób normalizacji uzyskanych wyników przy obliczaniu całkowitej objętości DNA w jądrze komórkowym. W eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem wyciszania ekspresji genu kodującego HDAC1 dochodzi bowiem do istotnego zwiększenia średnicy jąder komórkowych. Chciałbym prosić Doktorantkę o odniesienie się do tych wątpliwości podczas publicznej obrony tez swojej rozprawy doktorskiej.

Zawartość ocenianej pracy doktorskiej została już częściowo opublikowana w 2022 roku w bardzo dobrym czasopiśmie *Cell Reports* (IF₂₀₂₂ 9,995). Mgr Agnieszka Grabowska jest pierwszym autorem pracy pt „Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity” (doi: 10.1016/j.celrep.2022.110352). Większość dysertacji została więc już wnikliwie oceniona przez ekspertów z obszaru tematycznego projektu. Zastanowiło mnie jednak to, dlaczego w rozprawie doktorskiej nie przedstawiono np. wymiaru ilościowego wyciszenia HDAC1 przedstawionego na rycinie 25 skoro jest on ukazany na rycinie 7 w publikacji, co dopiero pokazuje istotność statystyczną osiągniętego efektu biologicznego.

Z obowiązku recenzenta zwróciłem uwagę na występowanie w kilku miejscach pracy określeń żargonowych lub kalek językowych. Na przykład wykresy 4, 5 ... 16 mają nie do końca właściwy tytuł, ponieważ eksperyment nie pokazuje całkowitej objętości chromatyny, a jedynie udział procentowy sygnału pochodzącego z barwienia DNA. Wykresy 6, 7 ... 18 zawierają z kolei nie do końca precyzyjne sformułowanie „najmocniej świeczące miejsca DNA w jądrze komórkowym”. Na str. 80 zapisano, że zastosowano spinę RNA specyficzną dla szczurzego białka HDAC1. Z pewnością chodziło o mRNA kodujący to białko. Nie wyjaśniono również celowości stosowania reportera w postaci GFP, co oczywiście jest łatwe do wyobrażenia, ale powinno być opisane.



Podsumowując chciałbym jednak powiedzieć, że Praca doktorska jest bardzo solidna i odpowiada na kilka ważnych pytań biologicznych. W znakomitej większości jest napisana w sposób czytelny, a narracja prowadzona w logiczny sposób. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Agnieszki Grabowskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 2021 r., poz. 478, 619, 1630). Zapoznając się z rozprawą odczuwałem satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego punktu widzenia. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych. Uzyskała istotne wyniki, poprawnie je opisała i wyciągnęła uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Agnieszki Grabowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie uważam, że oceniana praca ma ponadprzeciętny charakter. Doktorantka publikując swoje wyniki jako pierwszy autor w znakomitym czasopiśmie naukowym dowiodła, że przeprowadzone przez nią badania mają bardzo duże znaczenie dla pogłębienia wiedzy w zakresie mechanizmu modulacji reaktywności neuronów na ścieżce zależnej od białka HDAC1. Zwracam się zatem o rozważenie wyróżnienia ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Krzysztof Sobczak