



Poznań, dnia 25 września 2023 roku

dr hab. Kinga Kamieniarz-Gdula
Wydział Biologii i Centrum Zaawansowanych Technologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań
email: kinga.kamieniarz-gdula@amu.edu.pl

**OCENA DOROBKU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO
STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ DO PRZEPROWADZENIA POSTĘPOWANIA
HABILITACYJNEGO PANI DOKTOR ALEKSANDRY PĘKOWSKIEJ**

Poniższa recenzja została przygotowana w oparciu o dokumentację, obejmującą m.in.: wniosek przewodni, dyplom doktorski z tłumaczeniem przysięgłym, autoreferat i wykaz osiągnięć naukowych, przedstawione w wersji polskiej i angielskiej.

Przebieg pracy naukowo-zawodowej kandydatki

Dr Aleksandra Pękowska uzyskała tytuł doktora biologii nadany 10 grudnia 2012 roku przez Uniwersytet Aix-Marseille. Pracę doktorską wykonała w latach 2006-2011 w laboratorium dr Pierre'a Ferrier pod opieką dr Salvatore Spicuglia.

Następnie odbyła dwa staże podoktorskie. W latach 2011-2016 był to interdyscyplinarny staż podoktorski w laboratoriach: dr Wolfganga Hubera, dr Larsa Steinmetza i dr Paula Bertone w Europejskim Laboratorium Biologii Molekularnej (EMBL) w Heidelbergu, Niemcy oraz w Europejskim Laboratorium Bioinformatyki w Cambridge, Wielka Brytania. Z kolei w latach 2016 - 2019 staż podoktorski w laboratorium Lymphocyte Nuclear Biology kierowanym przez dr Rafaela Casellas w Narodowym Instytucie Zapalenia Stawów, Chorób Mięśniowo-Szkieletowych i Skórnym (National Institute of Arthritis Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS)) w Narodowych Instytutach Zdrowia (National Institutes of Health (NIH)), Bethesda, USA.

ul. H. Wieniawskiego 1, 61-712 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 00 00, fax +48 61 829 00 00

Od października 2019 dr Aleksandra Pękowska kieruje Centrum Dioscuri Biologii Chromatyny i Epigenomiki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie.

Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Ocena osiągnięcia naukowego w postaci jednotematycznego cyklu publikacji

Na osiągnięcie habilitacyjne dr Aleksandry Pękowskiej zatytułowane „Struktura chromatyny w jądrach komórek ssaków: dynamika rozwojowa, wkład w kontrole ekspresji genów oraz mechanizmy kontrolujące” składa się cykl czterech prac doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej.

Są to:

1. Pękowska i wsp. “Gain of CTCF-anchored chromatin loops marks the exit from naive pluripotency” *Cell Systems* 2018
2. Schwarzer i wsp., “Two independent modes of chromosome organization are revealed by cohesin removal” *Nature* 2017
3. Vian, Pękowska i wsp. “The energetics and physiological impact of cohesin extrusion” *Cell* 2018
4. Petermann i wsp. “The Magnitude of IFN- γ Responses Is Fine-Tuned by DNA Architecture and the Non-coding Transcript of *Ifng-as1*” *Molecular Cell* 2019
5. Dehingia i wsp. “CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease” *EMBO Reports*. 2022

Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ich łączny Impact Factor wg Web of Science Core Collection wynosi 111.438, a łączna liczba punktów MNiSW – 940.

Do osiągnięcia nie dołączono zwyczajowych oświadczeń wszystkich autorów określających ich współdziałanie w powstaniu poszczególnych publikacji. W mojej opinii nie są one jednak konieczne do oceny wkładu dr Pękowskiej w przedstawione publikacje ze względu na 1) pozycję, którą zajmuje na liście autorów; 2) dokładny opis jej roli w poszczególnych publikacjach przedstawiony w autoreferacie; 3) sekcje „*Author Contributions*” zawarte w samych publikacjach dołączonych do dokumentacji, wyjaśniające udział wszystkich współautorów. Dr Pękowska w trzech z pięciu przedstawionych prac jest pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem, co w naukach biologicznych jest jednoznaczne z jej wiodącą rolą. W dwóch kolejnych pracach jest drugim autorem – w publikacji 2 wykonała kluczowy eksperyment (TCC, ang. *tethered chromatin conformation capture*) a w publikacji 4 m.in. kluczowe dla pracy analizy danych lokalnego HiC.

Jądro komórkowe u organizmów eukariotycznych to otoczona podwójną błoną struktura zawierająca komórkowy materiał genetyczny, tj. kwasu deoksyrybonukleinowego DNA. DNA zorganizowane jest w postaci długich liniowych cząstek zwanych chromosomami. W jądrach komórkowych ssaków sumaryczna długość nici DNA wynosi około 2 metrów, podczas gdy średnica jądra wynosi zazwyczaj mniej niż 10×10^{-6} metra. Wynika z tego konieczność bardzo wydajnego i uporządkowanego upakowania materiału genetycznego. Równocześnie genom musi być dostępny dla dużych kompleksów molekularnych odpowiedzialnych za odczytywanie informacji genetycznej – transkrypcję oraz jej kopiowanie – replikację DNA. Dzięki mikroskopii świetlnej i elektronowej wiadomo, że materiał genetyczny jest niejednorodny, a jego rozmieszczenie w jądrze nierównomierne. Bardziej skondensowana, w dużej mierze nieaktywna chromatyna jest skoncentrowana na jądrowych peryferiach lub przylega do jąder. Pionierskie eksperymenty Tomasza i Krzysztofa Cremerów wykazały, że interfazowe chromosomy zajmują ograniczone trójwymiarowe autonomiczne terytoria. Rozwój technik typu FISH umożliwił dalszą charakteryzację poszczególnych terytoriów chromosomowych, ich subdomen a także poszczególnych loci genomowych. Opracowanie metodologii 3C: *chromatin conformation capture* pozwalające zmapować bliskość poszczególnych włókien chromatynowych przez Job'a Dekker'a w 2002 znacznie przyspieszyło poznawanie struktury interfazowego jądra komórkowego i zapoczątkowało dwie dekady obfitujące w przełomowe odkrycia. Wysoko-przepustowe warianty 3C takie jak Hi-C i Capture-C pozwoliły opisać kompleksowo organizację chromatyny na różnych poziomach, zidentyfikować różne typy oddziaływań oraz pomogły w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za ich powstawanie, a także w dużym stopniu zrozumieć ich biologiczne znaczenie.

Cykl publikacji dr Aleksandry Pękowskiej opisuje jej udział w 4 pionierskich i przełomowych projektach stanowiących ważny wkład w opis struktury chromatyny w jądrze komórkowym, zrozumienie mechanizmów kierujących jej organizacją, a także znaczenie tych procesów w kontroli ekspresji genów i różnicowania się komórek.

W pierwszo-autorskiej publikacji „Gain of CTCF-Anchored Chromatin Loops Marks the Exit from Naive Pluripotency” opublikowanej w *Cell Systems* w 2018 habilitantka za pomocą serii eksperymentów Hi-C scharakteryzowała po raz pierwszy różnice w rozmieszczeniu pętli chromatynowych i domen o zwiększonej częstotliwości interakcji (TAD, *topologically associated domains*) pomiędzy nieodróżnionymi mysimi komórkami embrionalnymi oraz komórkami zróżnicowanymi w kierunku neuronalnych progenitorów. Przy pomocy bardzo głęboko zsekwencjonowanych eksperymentów wykonanych równolegle przy pomocy dwóch różnych protokołów Hi-C (*tethered conformation capture*, TCC i *in situ* Hi-C) pokazała, że w trakcie różnicowania komórki macierzyste wytwarzają pętle chromatynowe w nowych miejscach. Zmiany te są związane ze zwiększonym wiązaniem CTCF, czynnika, który definiuje miejsca zaczepienia, ograniczenia pętli chromatynowych, a także ze zwiększeniem ogólnego poziomu izolacji domen chromatynowych w bardziej zróżnicowanych komórkach. Habilitantka pokazała również, że przy procesie odwrotnym – reprogramowaniu zróżnicowanych progenitorów



neuralnych w kierunku komórek pluripotentnych zostaje odtworzona struktura komórkowa charakterystyczna dla opisanych wcześniej komórek macierzystych, co dodatkowo potwierdza jej znaczenie dla stanu pluripotentnego. To bardzo ważna praca pokazująca po raz pierwszy w tak przekonujący sposób zmiany w organizacji pętli chromatynowych w trakcie różnicowania się komórek. Dodatkowo ważnym elementem tej pracy są powstałe dane genomowe wysokiej jakości, które są cennym zasobem dla innych badaczy mogących je re-analizować na potrzeby własnych projektów.

W pracy „Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal” opublikowanej w prestiżowym *Nature* w 2017, w której dr Pękowska wykonała kluczowe eksperymenty oraz wstępne analizy bioinformatyczne, zademonstrowano, że dwa podstawowe typy organizacji chromatyny: kompartmenty (aktywnej i nieaktywnej chromatyny; A i B, odpowiednio) oraz domeny zwiększonych oddziaływań chromatynowych (tzw. TAD) powstają w wyniku dwóch zupełnie innych, choć wpływających na siebie procesów. Usunięcie Nipbl - czynnika niezbędnego do załadowania kompleksu kohezynowego na włókno chromatynowe - spowodowało zgodnie z oczekiwaniami zniknięcie TAD’ów, lecz podział na kompartmenty A i B pozostał, co więcej został wzmocniony. Eksperymenty te pokazują, że powstawanie kompartmentów jest niezależne od kohezyn i wytlaczania chromatyny, choć wytlaczanie pętli chromatynowych wpływa na nie osłabiając siłę oddziaływań włókien chromatynowych w ich obrębie. Jest to bardzo ważna, przełomowa praca i tak jak poprzednio wygenerowane zostały cenne dane genomowe przydatne w innych badaniach.

Publikacja „The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion”, w której habilitantka jest współpierwszym autorem pokazuje, że proces wytlaczania chromatyny przez pętle chromatynowe jest zależny od ATP, choć do utrzymywania się tych struktur ATP nie jest potrzebne. Kluczowy eksperyment tego projektu połączył system degron użyty do indukowalnego szybkiego usunięcia białka Rad21, komponentu kompleksu kohezynowego niezbędnego do jego funkcjonowania z redukcją poziomu ATP przy pomocy oligomycyny. Poprzednie badania wykazały, że pętle chromatynowe znikają zupełnie po usunięciu kohezyny, ale są odtwarzane do poprzedniego poziomu w ciągu 3 godzin, gdy poziom kohezyny zostaje odtworzony po domyciu auksyny. Autorom udało się odtworzyć ten wynik w eksperymencie kontrolnym. W równoległym eksperymencie z komórkami, którym poza usunięciem kohezyny obniżono również poziom ATP odtworzenie pętli zostało zablokowane, co jasno pokazuje zależność procesu powstawania pętli od ATP. Jest to bardzo ważne odkrycie będące istotnym krokiem w kierunku pełnego zrozumienia procesu powstawania pętli chromatynowych. W pracy tej scharakteryzowano również po raz pierwszy struktury widoczne w danych Hi-C jako paski („stripes”), gdy jeden punkt zaczepienia pętli oddziałuje nie z pojedynczym innym punktem, ale z całą domeną. Zasugerowano ich rolę w regulacji transkrypcji oraz powstawaniu translokacji chromosomowych.



W kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego dr Pękowskiej „The Magnitude of IFN-g Responses Is Fine-Tuned by DNA Architecture and the Non-coding Transcript of *lfn-g-as1*”, w której jest ona drugim autorem pokazano, że architektura chromatyny oraz niekodujący transkrypt *lfn-g-as1* wspólnie kontrolują ekspresję interferonu gamma. Usunięcie locus *lfn-g-as1* zlokalizowanego w pobliżu *lfn-g* zaburzyło lokalną organizację chromatyny a także reakcje obronna związana z interferonem gamma. Knock down *lfn-g-as1* obniżył ekspresję interferonu. Praca ta wyjaśnia ważny nieopisany wcześniej aspekt kontroli ekspresji interferonu gamma.

Piątą pracą wchodzącą w skład osiągnięcia naukowego jest praca przeglądowa „CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease” opublikowana w *EMBO reports*. Jest to solidne podsumowanie aktualnej wiedzy na temat czynnika CTCF i jego roli w organizacji chromatyny, ekspresji genów a także zaburzeniach chorobowych z nim związanych. Praca powstała już po założeniu przez dr Pękowską własnej grupy badawczej w Polsce.

Podsumowując, dr Aleksandra Pękowska w ramach osiągnięcia naukowego przedstawiła pięć prac ważnych dla zrozumienia mechanizmów kierujących organizacją chromatyny, jej znaczenia biologicznego oraz wpływu na ekspresję genów. Przy okazji wygenerowane zostało wiele zestawów bardzo wartościowych danych przydatnych dla innych badaczy. Prace te zostały wykonane we współpracy z czołowymi badaczami o renomie światowej i to doświadczenie zapewne zaprocentuje w dalszej karierze dr Pękowskiej.

Ocena pozostałego dorobku naukowego, dydaktycznego, popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej

Dane naukometryczne dr Aleksandry Pękowskiej:

Sumaryczny Impact Factor publikacji wg Web of Science Core Collection z dnia 23.03.2023: 275,628. Liczba cytowań wg Web of Science z dnia 23.03.2023: 1593, w tym 1585 bez autocytowań, Index Hirscha według tej samej bazy: 13.

Na podstawie przedstawionego autoreferatu, w mojej opinii Dr Pękowska wykazuje się ponadprzeciętnymi osiągnięciami naukowymi, szczególnie w okresie po doktoracie. Pozytywnie oceniam również jej działalność dydaktyczną i popularyzatorską. Biorąc pod uwagę ścieżkę kariery kandydatki oraz prace naukowe powstałe we wiodących ośrodkach badawczych na świecie, jej współpraca międzynarodowa zasługuje na najwyższą ocenę.



Opinia recenzenta

W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca habilitacyjna dr Aleksandry Pękowskiej spełnia w nadmiarze wymogi stawiane w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 r, wraz z późniejszymi nowelizacjami.

W szczególności dr Aleksandra Pękowska:

1. Posiada stopień doktora w dziedzinie biologii nadany w 2012 roku przez Uniwersytet Aix-Marseille. Praca doktorska zatytułowana: „Epigenetic landscape of normal and malignant lympho-hematopoiesis: interplays between chromatin signature and tissue specific gene expression” została wykonana pod kierownictwem dr Pierra Ferrier oraz dr Salvatore Spicuglia w Centre d’Immunologie de Marseille Luminy, Marsylia, Francja.
2. Posiada osiągnięcie naukowe opublikowane w cyklu pięciu prac powiązanych tematycznie w prestiżowych czasopismach międzynarodowych. Osiągnięcia te stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny biologii (ocena osiągnięcia i jego znaczenie powyżej). Również pozostały dorobek naukowy uzyskany po doktoracie przez dr Aleksandrę Pękowską jest imponujący.
3. Ma wiodący wkład w powstanie publikacji będących składowymi osiągnięciami naukowego. W trzech z pięciu prac jest pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem, co w przypadku dyscypliny biologii świadczy o jej wiodącej roli. W dwóch kolejnych pracach jest drugim autorem – w publikacji 2 wykonała kluczowy eksperyment (TCC, ang. *tethered chromatin conformation capture*) a w publikacji 4 m.in. kluczowe analizy danych lokalnego HiC.
4. Wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej, w tym zagranicznej:
 - pracę magisterską z biologii, specjalność biofizyka, dr Pękowska wykonała na Uniwersytecie Łódzkim;
 - doktorat z biologii, specjalność immunologia, dr Pękowska wykonała w Centre d’Immunologie de Marseille Luminy we Francji;
 - staże poddoktorskie, w czasie których powstała większość wyników przedstawionych jako praca habilitacyjna (publikacje 1-4), dr Pękowska odbyła w Europejskim Laboratorium Biologii Molekularnej (EMBL) w Heidelbergu (Niemcy) oraz Cambridge (Wielka Brytania), oraz w National Institutes of Health (NIH) w Bethesda (USA)
 - aktualnie kieruje Centrum Dioscuri w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN, w Warszawie, gdzie powstała publikacja nr 5.



Wniosek końcowy

Moja ocena osiągnięć naukowych dr Aleksandry Pękowskiej jest jednoznacznie pozytywna. Przedstawione osiągnięcie habilitacyjne i dorobek naukowy spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego zgodnie z kryteriami określonymi w art. 219 Ustawy "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2021r. poz. 478 z późniejszymi zmianami).

dr hab. Kinga Kamieniarz-Gdula