

Poznań, 05.03.2024

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN
Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja

osiągnięcia naukowego oraz aktywności naukowej dr. Wojciecha Siwka
w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie
nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biotechnologia

Podstawowe dane o Kandydacie

Pan dr Wojciech Siwek uzyskał dyplom magistra biotechnologii w 2007 roku na Uniwersytecie Warszawskim. Następnie w tej samej jednostce odbył studia podyplomowe w zakresie chemii analitycznej. Stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia uzyskał w 2014 roku w Instytucie Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Mechanizm działania enzymu restrykcyjnego R.DpnI zależnego od N6-metyloadeny*”. Promotorem tej wyróżnionej rozprawy doktorskiej był profesor Matthias Bochtler.

Dr Wojciech Siwek ma bardzo bogate doświadczenie naukowe i większość jego aktywności po uzyskaniu stopnia doktora była realizowana w prestiżowych zagranicznych ośrodkach badawczych. Obecnie dr Wojciech Siwek jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi na Uniwersytecie Gdańskim.

Podstawa prawna i ocena formalna

Obowiązujące kryteria oceny odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Ocenę osiągnięć Pana dr. Wojciecha Siwka wykonano na podstawie następujących materiałów: (1) autoreferatu zawierającego oświadczenia Habilitanta o udziale w powstaniu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, (2) wykazu osiągnięć naukowych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny oraz informacji o aktywności naukowej, osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzatorskich, (3) oświadczeń współautorów o ich udziale w powstaniu prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Do wniosku załączono również kopię dyplomu potwierdzającego nadanie stopnia doktora oraz kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Stwierdzam, że przedstawiona dokumentacja jest kompletna, spełnia wymogi formalne i pozwala na przeprowadzenie oceny osiągnięć Habilitanta.

Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe pt. „*Mechanizmy epigenetyczne w utrzymaniu aktywnych stanów transkrypcyjnych*” składa się cykl 3 powiązanych tematycznie prac eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2018-2023 w renomowanych czasopismach naukowych, tj. *Molecular Cell*, *EMBO J* oraz w wydaniu książkowym *Methods in Molecular Biology*. We wszystkich publikacjach udział dr. Wojciecha Siwka jest wiodący (pierwszy autor lub autor do korespondencji). Oświadczenia współautorów o ich indywidualnym udziale w pracach zostały przedstawione w odpowiednim Załączniku do wniosku.

Badania dr. Wojciecha Siwka koncentrują się wokół zrozumienia mechanizmów epigenetycznych kontrolujących ekspresję genów oraz rozwoju metodyki badań tych problemów. Bardziej szczegółowo, Habilitant badał wrodzoną pamięć immunologiczną na poziomie ekspresji genów - zjawisko zwane pamięcią transkrypcyjną. W publikacji nr 1 pt. „*Activation of clustered IFN γ target genes drives cohesin-controlled transcriptional memory*” Wojciech Siwek*, Sahar S.H. Tehrani, João F. Mata and Lars E.T. Jansen* opublikowanej w *Molecular Cell* w 2020 roku, Habilitant badał komórkowe i molekularne aspekty pamięci transkrypcyjnej indukowanej interferonem gamma (IFN γ). Jest to tematyka niezwykle ciekawa i mało poznana. W wykorzystanym przez Autora systemie modelowym do badania pamięci transkrypcyjnej, geny reagują na określony sygnał, w tym przypadku IFN γ , i po ponownej ekspozycji na ten sam sygnał ulegają silniejszej ekspresji. Dobrze znanym przykładem takiego systemu jest gen HLA-DRA, wykazujący silny fenotyp pamięci transkrypcyjnej IFN γ w komórkach HeLa. Wykorzystując analizy transkryptomyczne (RNA-seq) Habilitant zidentyfikował nową rodzinę genów GBP (ang. Guanylate Binding Proteins), która wykazuje silny fenotyp pamięci transkrypcyjnej. Co ciekawe, funkcja tych genów jest związana z hamowaniem replikacji patogenów wewnątrzkomórkowych oraz promowaniem odpowiedzi zapalnej. Najsilniejszy efekt pamięci (silniejszy niż wcześniejszy model pamięci transkrypcyjnej – HLA-DRA) wykazywał gen *GBP5*. Habilitant wykazał, że pamięć transkrypcyjna indukowana IFN γ występuje zarówno w komórkach HeLa jak i zdrowych fibroblastach. Określił również czas trwania takiej pamięci transkrypcyjnej (długotrwała-ponad 14 dni, ale nie permanentna). Wykorzystując metody sekwencjonowania RNA w pojedynczych komórkach (scRNA-seq), cytometrii przepływowej oraz FACS dr Wojciech Siwek scharakteryzował efekt pamięci transkrypcyjnej IFN γ na poziomie komórkowym. Odkrył, że zjawisko pamięci transkrypcyjnej jest wynikiem zarówno zwiększonej transkrypcji genu jak i większej liczby komórek biorących udział w ekspresji genu po ponownej stymulacji. W kolejnych eksperymentach, polegających na długoterminowych pomiarach poziomu RNA i inhibicji polimerazy RNA II, dr Wojciech Siwek wykazał, że globalna transkrypcja nie jest wymagana do utrzymania pamięci transkrypcyjnej IFN γ . Taki wynik zasugerował obecność mechanizmów regulacyjnych opartych na chromatynie a nie pętli sprzężenia zwrotnego czynników transkrypcyjnych. Wykorzystując zaawansowane metody badania dostępności chromatyny (ATAC-seq) oraz obecności określonych czynników lub modyfikacji (ChIP-seq) dr Wojciech Siwek wykazał, że żadna z klasycznych modyfikacji histonów nie jest długoterminowo utrzymywana na genach pamięci. Wynik ten nie potwierdził wcześniejszych doniesień o kluczowej roli badanych modyfikacji dla pamięci transkrypcyjnej. W wyniku dalszych analiz Habilitant wykazał, że kluczowe geny pamięci sąsiadują ze sobą i są zlokalizowane w klastrach genomowych. Ta ważna obserwacja skłoniła autorów pracy do zbadania roli kohezyny, czynnika odpowiedzialnego za topologię genomu, w regulacji pamięci transkrypcyjnej IFN γ . Habilitant wykazał, iż globalne usunięcie kohezyny, przy użyciu technologii degronu indukowanego auksyną, nie ma wpływu na utrzymanie pamięci transkrypcyjnej IFN γ . Bardzo

ważnym odkryciem było wykazanie, że kohezyna ma wpływ na inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN γ . Poprzez selektywną delecję poszczególnych miejsc wiązania kohezyny za pośrednictwem technologii CRISPR/Cas9 autorzy zidentyfikowali miejsca wiązania kohezyny w klastrze GBP. Wykazali, że kohezyna specyficznie hamuje inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN γ w genach GBP, a nie w drugim klastrze pamięci – MHC klasy II. Podsumowując, Habilitant wykazał, że pamięć transkrypcyjna IFN γ jest specyficznym procesem kontrolowanym lokalnie i nie jest ona zależna od transkrypcji i czynników transkrypcyjnych. Wiązanie kohezyny hamuje indukowane przez cytokiny reakcje pamięci transkrypcyjnej w klastrach genów związanych z podstawowymi procesami regulacji odporności. Wyniki opisane w publikacji nr 1 stanowią podstawę do przyszłych badań mechanizmów odpowiedzialnych za nabywanie odporności w przypadku komórek raka i procesu autoimmunizacji. Pozwoli to również na lepsze zrozumienie roli oddziaływań chromatyny dalekiego zasięgu w pośredniczeniu w tych procesach. Badania przedstawione w publikacji nr 1 reprezentują najwyższy poziom naukowy. Przedstawiona praca jest kompleksowa i wykorzystuje najnowocześniejsze metody badawcze. O randze tych badań może świadczyć artykuł w prestiżowym czasopiśmie *Science Immunology* „A cytokine to remember me by”, w którym autorzy opisują okrycia dr. Siwka i ich znaczenie.

W publikacji nr 2 pt. „*STAT1 is required to establish but not maintain interferon- γ induced transcriptional memory*” Sahar S.H. Tehrani, Pawel Mikulski, Izma Abdul-Zani, João F. Mata, Wojciech Siwek*, Lars E.T. Jansen* opublikowanej w 2023 r w *EMBO J* autorzy wykorzystali system pamięci transkrypcyjnej IFN γ , aby zrozumieć rolę transkrypcji i funkcje kluczowych rodzin czynników transkrypcyjnych STAT i IRF w inicjacji i utrzymaniu pamięci transkrypcyjnej. Jest to kontynuacja wcześniejszych badań, w których nie wyjaśniono w jaki sposób utrzymywany jest stan „primingu” genów pamięci. W eksperymentach, wykorzystujących system CRISPRa-SAM (ang. CRISPR-Cas9 Synergistic Activation Mediator) do aktywacji genu pamięci *GBP1*, dr Wojciech Siwek potwierdził, że sam proces transkrypcji nie jest wystarczający do ustanowienia pamięci. Jednak analiza kinetyki stanów chromatyny (ATAC-seq) wykazała zwiększoną aktywację promotorów genów wykazujących pamięć podczas reindukcji IFN γ . Ponieważ czynniki transkrypcyjne STAT i IRF regulują sygnalizację IFN γ , w kolejnym etapie autorzy zbadali ich rolę w procesie pamięci transkrypcyjnej. Wykorzystując technologię CRISPR-Cas9 oraz eksperyment kinetyczny CUT&RUN Habilitant odkrył, że do aktywacji genu *GBP5* niezbędne są czynniki STAT1 i IRF1, które podczas reaktywacji są rekrutowane w szybszym tempie w porównaniu z pierwotną aktywacją. Co ciekawe, regulacja transkrypcyjna STAT1 oraz szybkość jego importu do jądra komórkowego w warunkach indukcji i reindukcji nie miała wpływu na pamięć transkrypcyjną IFN γ . Kolejnym ważnym odkryciem było określenie roli fosforylacji STAT1 w kontekście pamięci transkrypcyjnej. Zarówno fosforylacja STAT1 na tyrozynie, w pozycji 701 (Y701) jak i Serynie 727 (S727) nie miała znaczącego wpływu na utrzymywanie pamięci transkrypcyjnej. Nieoczekiwanie, ta druga modyfikacja była utrzymywana długo po usunięciu IFN γ . Podsumowując, w publikacji nr 2 Habilitant wykazał, że STAT1 jest niezbędny do inicjacji, ale nie do utrzymania pamięci transkrypcyjnej a reindukcja IFN γ skutkuje szybszym wiązaniem STAT1 i IRF1 do genów pamięci. Jest to bardzo ważne osiągnięcie poszerzające naszą wiedzę na temat regulacji pamięci transkrypcyjnej i roli czynników transkrypcyjnych w tym procesie.

Ostatnia z cyklu prac pt. „*Time-ChIP: a method to determine long-term locus-specific nucleosome inheritance*” Wojciech Siwek*, Mariluz Gómez-Rodríguez*, Daniel Sobral, Ivan R. Corrêa Jr and Lars E.T. Jansen jest publikacją opisującą nową metodę pomiaru dynamiki nukleosomów w skali całego genomu z wysoką rozdzielczością. Praca została opublikowana w 2018 r w *Methods in*

Molecular Biology. Opracowana metoda pozwala na izolację i bezpośredni pomiar retencji histonów w chromatynie w specyficznych loci, w komórkach ludzkich. Jest ona podobna do metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) z dodanym komponentem czasowym, w celu określenia dynamiki nukleosomów. Autorzy wykorzystali strategię biotynylacji SNAP a następnie oczyszczania SNAP-histonów na podłożu ze streptawidyną. W celu poprawienia wydajności reakcji opracowali udoskonalony, względem komercyjnie dostępnego, substrat CP-Biotynę. Komórki produkujące histon z dołączonym znacznikiem SNAP są inkubowane z CP-Biotyną. Po pewnym czasie część znakowanych histonów ulega wymianie w nukleosomach. Są one izolowane i oczyszczane na podłożu ze streptawidyną. Wyizolowany DNA jest poddawany analizie qPCR lub sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu. Autorzy potwierdzili przydatność ich metody w serii eksperymentów, gdzie wykazali m.in. że histon H3.1 może być utrzymywany na konkretnym DNA nawet podczas intensywnej transkrypcji lub replikacji. Wykorzystując metodę time-ChIP w połączeniu z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem dla wariantu histonu H3.3-SNAP wykazali (zgodnie z oczekiwaniami), że szybka wymiana histonów występuje w aktywnych częściach genomu. Podsumowując, opracowana przez dr. Siwka metoda umożliwia analizę lokalnej dynamiki i dziedziczenia histonów za pomocą qPCR oraz wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Oprócz protokołu, autorzy przedstawiają zalety i ograniczenia metody w odniesieniu do innych istniejących technik. Wśród wymienianych zalet jest m.in. możliwość analizy określonych wariantów histonów, identyfikacja regionów o wysokim i niskim stopniu obrotu (ang. turnover) histonów oraz lokalizacja puli „długo żyjących” histonów. Jest to wartościowy protokół uzupełniający wachlarz metod do badania dynamiki nukleosomów.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu badawczego i przyczynia się do znaczącego rozwoju dziedziny nauki reprezentowanej przez dr. Wojciecha Siwka. Zostało ono opublikowane w postaci trzech wybitnych, spójnych tematycznie prac, w których Habilitant pełnił rolę wiodącą. Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe dr. Wojciecha Siwka charakteryzują się wysokim sumarycznym współczynnikiem oddziaływania (IF) wynoszącym 33,479. Prace te zostały opublikowane niedawno, co może mieć wpływ na stosunkowo niewielką liczbę ich cytowań, wynoszącą 37 (wg Google Scholar, 20/09/2023). W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na niefortunne sformułowanie tytułu osiągnięcia, które wymagałoby przeredagowania, szczególnie w polskiej wersji językowej.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Poza publikacjami omówionymi powyżej na dorobek naukowy Habilitanta składają się 4 prace opublikowane w latach 2012-2019. Dwie z tych prac powstały po uzyskaniu przez Pana Wojciecha Siwka stopnia doktora (H. Czapinska, W. Siwek, et al., „Crystal structure and directed evolution of specificity of *NlaIV* restriction endonuclease” *Journal of Molecular Biology* oraz M. Szychowska*, W. Siwek*, et al., „Type III CRISPR complexes from *Thermus thermophilus*” *Acta Biochimica Polonica*), a kolejne dwie powstały w okresie przed doktoratem (K. Mierzejewska*, W. Siwek1*, et al. „Structural basis of the methylation specificity of *R.DpnI*” oraz W. Siwek, et al., “Crystal structure and mechanism of action of the N6 methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease *R.DpnI*” *Nucleic Acids Research*). Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR. Tematyka badawcza wymienionych prac obejmuje opisanie struktur krystalicznych analizowanych białek oraz określenie podstaw strukturalnych specyficznego rozpoznawania metylowanego DNA przez białka. Mimo że liczba prac nie jest imponująca (podobnie liczba ich cytowań), to ranga czasopisma i wiodący udział

Habilitanta w większości z nich rekompensują tę słabość. Poza tym, dr Wojciech Siwek jest współautorem dwóch doniesień pokonferencyjnych opublikowanych w FEBS Journal. Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji Habilitanta wynosi 80,299; były one cytowane 153 razy (Google Scholar, 20/09/2023) a IH wynosi 4. Choć wartości wskaźników naukometrycznych nie są wysokie, to dorobek naukowy Habilitanta spełnia wymagania stawiane osobom wnoszącym o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

W Autoreferacie dr Wojciech Siwek przedstawił również nieopublikowane badania, które nie są *de facto* dorobkiem naukowym, a bardziej wpisują się w naukowe plany Habilitanta. Wśród nich jest weryfikacja hipotezy, że elementy cis bogate w H3K4me1 w pobliżu genów pamięci są kluczowe dla utrzymania pamięci transkrypcyjnej IFNy. Plany dr. Wojciecha Siwka obejmują również analizę czynników regulujących inicjację i utrzymanie pamięci transkrypcyjnej IFNy. Potencjalni kandydaci zostali wcześniej zidentyfikowani przez Habilitanta na podstawie analiz przesiewowych z wykorzystaniem technologii CRISPR-Cas9. Dr Wojciech Siwek aktywnie rozwija te ścieżki badawcze jako adiunkt w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi na Uniwersytecie Gdańskim. Habilitant przedstawia również szereg innych, bardzo ambitnych planów badawczych, co świadczy o jego kreatywności i wizji swojej przyszłej samodzielnej drogi naukowej. W 2023 r dr Wojciech Siwek uzyskał finansowanie projektu Sonata 18 NCN pt. „Mechanizmy Inicjacji Pamięci Transkrypcyjnej”, co pozwoli mu na realizację ambitnych planów naukowych.

Aktywność naukowa, osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne i popularyzatorskie

Pan dr Wojciech Siwek ma bardzo bogate doświadczenie naukowe zdobyte w międzynarodowych ośrodkach badawczych. W latach 2015–2019 Habilitant odbył staż podoktorski w Instytucie Gulbenkian w Lizbonie (mentor: Lars Jansen), następnie pracował kolejno na Wydziale Biochemii na Uniwersytecie Oksfordzkim (2019–2020) i na Wydziale Biologii Molekularnej, Massachusetts General Hospital; Wydział Genetyki, Harvard Medical School, Boston (2020–2021). W ostatniej placówce pracował przez kolejne lata (2021–2023) jako stypendysta programu Marie Skłodowska-Curie, a jego mentorem w Harvard Medical School był prof. Bob Kingston.

Wśród swojej aktywności naukowej Habilitant wykazał wygłoszenie kilku wykładów na zaproszenie, organizację międzynarodowych konferencji i warsztatów naukowych. Był kierownikiem kilku projektów naukowych, w tym projektu Preludium NCN (UMO-2012/05/N/NZ1/01912), pt. „*Strukturalne podstawy rozpoznawania postreplikacyjnych modyfikacji DNA*”; projektu przyznanego przez Uniwersytet Gdański „*Program młodych liderów grup badawczych UG – junG, środki na uruchomienie laboratorium*”; projektu stypendialnego Marie Skłodowska-Curie GF pt. „*Identification of transcriptional memory maintenance factors through a cell selection strategy*” i współkierownikiem Projektu z Larssem Jansenem (02/SAICT/2017) Fundação para a Ciência e Tecnologia, PT „*Determining chromatin-based mechanisms and biological relevance of long-term transcriptional memory during innate immune response*” (grant nie zainicjowany przez autorów).

Dr Wojciech Siwek jest lub był członkiem towarzystw naukowych (PTBioch), komitetu naukowego konferencji czy komisji podoktorskiej. Pełnił rolę recenzenta dla dwóch czasopism Epigenetics i Cancer Communications. Aktywnie dba o swój rozwój naukowy poprzez szkolenia z zakresu analizy danych bioinformatycznych czy w zakresie zarządzania laboratorium (9 mies. kurs „Leadership in Research” Uniwersytet Harvarda). Co istotne, dr Wojciech Siwek miał dwie przerwy w pracy badawczej związane z urlopami ojcowskimi. Za swoją działalność naukową dr Wojciech Siwek

uzyskał szereg nagród i wyróżnień, w tym nagrodę Ministerstwa Edukacji i Nauki „Premia na Horyzoncie 2021” oraz stypendia EMBO, FEBS, Marie Skłodowska-Curie GF i stypendium podoktorskie Fundação para a Ciência e Tecnologia. Jedynym doświadczeniem dydaktycznym dr. Wojciecha Siwka było pełnienie funkcji wykładowcy w szkole doktorskiej, w Instituto Gulbenkian de Ciência, (tytuł wykładu: *“Insights into molecular biology using high throughput sequencing”*) oraz roli współopiekuna doktorantki, magistrantki i opiekuna dwóch stażystów. Ta część aktywności Habilitanta jest zdecydowanie najsłabszą stroną wniosku ale po części zrozumiałą, analizując przebieg jego drogi naukowej. W ramach aktywności popularyzatorskiej dr Wojciech Siwek aktywnie uczestniczył w promocji nauki jako założyciel i współorganizator naukowego klubu dyskusyjnego “DoScience”, Warszawa - zorganizował ponad 25 wydarzeń naukowych. Był również współorganizatorem warsztatów laboratoryjnych dla licealistów w BioCentrum Edukacji Naukowej.

Podsumowując, całkowity dorobek naukowy, dydaktyczny i popularyzatorski dr. Wojciecha Siwka jest odpowiedni do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Habilitant jest dobrze przygotowany do prowadzenia dalszej samodzielnej pracy naukowej.

Wniosek końcowy

Na podstawie przedstawionej mi do oceny dokumentacji stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr. Wojciecha Siwka pt. *„Mechanizmy epigenetyczne w utrzymaniu aktywnych stanów transkrypcyjnych”*, będące cyklem powiązanych tematycznie wybitnych artykułów naukowych, stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny biotechnologia. Jednocześnie potwierdzam, że dr Wojciech Siwek wykazał się istotną aktywnością naukową w więcej niż jednej instytucji naukowej, w tym instytucji zagranicznej. Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie Panu dr. Wojciechowi Siwkowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze w dyscyplinie biotechnologia.

Z poważaniem,



Marta Olejniczak