

Warszawa, 11.03.2024.

Prof. dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta  
Pracownia Transkrypcji tRNA  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

**Ocena osiągnięcia naukowego, dodatkowego dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Wojciecha Siwka w sprawie nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego**

Pan dr Wojciech Siwek ukończył w 2007 studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. W okresie realizacji pracy magisterskiej w pracowni prof. Jacka Henniga w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN odbył staż naukowy w Laboratorium Sainsbury w Norwich, w Wielkiej Brytanii. Studia doktoranckie realizował w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie pod opieką prof. Mathiasa Bochtlera. W 2014 roku obronił pracę doktorską zatytułowaną „The mechanism of action of N6-methyladenine dependent restriction endonuclease R.DpnI” uzyskując dyplom z wyróżnieniem. Jego wyniki przyczyniły się do odkrycia mechanizmu strukturalnego leżącego u podstaw specyficznego rozpoznawania metylowanego DNA przez białka.

Bezpośrednio po obronie doktoratu dr Wojciech Siwek uzyskał stypendium z portugalskiej fundacji *Fundação para a Ciência e Tecnologia* i odbył czteroletni staż podoktorski w laboratorium profesora Larsa Jensena w *Instituto Gulbenkian de Ciência* w Oeiras. W 2018 roku prof. Lars Jensen uzyskał pozycję kierownika grupy na *University of Oxford* i tam pod jego kierunkiem dr Wojciech Siwek kontynuował swe badania nad epigenetycznymi mechanizmami dziedziczenia chromatyny i pamięci transkrypcyjnej w latach 2019 – 2020. Osiągnięcia podczas stażu podoktorskiego, a także narzędzia i metody, które opracował w tym czasie, pozwoliły mu zdobyć stypendium Marie Skłodowska-Curie, aby w latach 2021-2023 kontynuować pracę nad pamięcią transkrypcyjną w laboratorium prof. Boba Kingstona w *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School*, w USA. W 2023 roku uzyskał stanowisko adiunkta w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi (ICCVS) na Uniwersytecie Gdańskim, gdzie prowadzi samodzielne badania nad mechanizmem pamięci transkrypcyjnej.

Po obronie doktoratu dr. Wojciech Siwek pogłębiał wiedzę i doskonalił swe umiejętności poprzez uczestnictwo w licznych warsztatach i kursach naukowych organizowanych przez prestiżowe instytucje jak EMBO, *University of Oxford* czy *Harvard Medical School*. Odbył intensywne kursy z bioinformatyki, podstawowej i stosowanej immunologii oraz biologii komórki.

Ponadto uczestniczył w warsztatach z pisania i recenzowania publikacji naukowych oraz szkoleniu dla kierowników grup badawczych.

### **Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Mechanizmy epigenetyczne w utrzymaniu aktywnych stanów transkrypcyjnych” objętego postępowaniem habilitacyjnym**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego dr Wojciecha Siwka to cykl trzech wieloautorskich prac, dwóch eksperymentalnych i jednej metodycznej. Tematyka prac, określona tytułem osiągnięcia habilitacyjnego, jest spójna. Prace te były cytowane ponad 37 razy (w momencie składania dokumentów), ich całkowity IF wynosi 33,6 a liczba punktów MNiSW – 470.

Należy podkreślić, że prace eksperymentalne ukazały się w czasopiśmie międzynarodowych o najwyższej, uznanej renomie. Udział habilitanta w tych wybitnych pracach jest dominujący, co zasługuje na najwyższe uznanie. Jest ko-korespondencyjnym autorem prac *Molecular Cell*, 2020 i *EMBO Journal*, 2023, a zarazem pierwszym autorem prac *Methods in Molecular Biology*, 2018 i *Molecular Cell*, 2020. Habilitant precyzyjnie określił swój udział w poszczególnych artykułach, a jego deklaracje można zweryfikować na podstawie oświadczeń poszczególnych autorów. Zaprojektowanie doświadczeń opisanych w pracach *Molecular Cell*, 2020 i *EMBO Journal*, 2023 wydaje się być domeną habilitanta podczas gdy opracowanie koncepcji badań, prócz habilitanta, deklaruje również kierownik laboratorium, Lars Jansen.

Zagadnienie naukowe cyklu prac składających się na osiągnięcie habilitacyjne dr. Siwka dotyczy molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw zjawiska pamięci transkrypcyjnej. Jest to proces epigenetyczny, który polega na zachowaniu aktywnego stanu transkrypcji w odpowiedzi na bodziec. W konsekwencji, jeśli komórki napotkają ponownie ten sam bodziec, reagują na niego silniej. Tematyka ta jest wybitnie nowatorska zaś badania habilitanta dokumentują zupełnie nowe, niekonwencjonalne aspekty epigenetycznego mechanizmu regulacji ekspresji genów leżące u podstaw wrodzonej oporności immunologicznej.

Zasadniczym tematem recenzowanego osiągnięcia habilitacyjnego jest molekularny mechanizm pamięci transkrypcyjnej indukowanej interferonem gamma (IFN $\gamma$ ), cytokiny, która jest mediatorem odpowiedzi odpornościowej. Z poprzednich badań wiadomo było, że pierwotna indukcja interferonem powoduje przejściowy, odwracalny wzrost ekspresji pewnych genów odpowiedzi immunologicznej, nazwanymi genami pamięci, a transkrypcja tych genów nie jest wymagana do wzmocnienia odpowiedzi wtórnej. Brak takiego wymagania stwarzał wykorzystaną przez habilitanta możliwość badania mechanizmu utrzymującego ekspresję genów niezależnie od procesu transkrypcji.

Celem pierwszej z prac eksperymentalnych wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego (*Molecular Cell*, 2020) była dokładna charakterystyka pamięci transkrypcyjnej IFN $\gamma$  i ustanowienie modelowego systemu do badania tego zjawiska. Dr Wojciech Siwek przeprowadził analizę porównawczą transkryptomu komórek poddanych pierwotnej i wtórnej indukcji IFN $\gamma$ , która potwierdziła zmianę ekspresji kontrolnego genu pamięci HLA-DRA i doprowadziła do odkrycia grupy genów GBPs (ang. Guanylate Binding Proteins) jako nowych genów pamięci. Pamięć transkrypcyjna indukowanych IFN $\gamma$  genów GBP została następnie

potwierdzona na poziomie RNA i białka. Habilitant ustalił że *pamięć* transkrypcyjna IFN $\gamma$  jest utrzymywana przez ponad 14 cykli podziału komórkowego. Za pomocą sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq), cytometrii przepływowowej oraz FACS (ang. Fluorescence-activated Cell Sorting) dr Wojciech Siwek stwierdził, że pamięć transkrypcyjna jest osiągnięta przez zmianę prawdopodobieństwa zaangażowania pierwotnie indukowanych komórek w transkrypcję genów pamięci.

Kolejne eksperymenty wykonane przez habilitanta potwierdziły, że aktywna transkrypcja nie jest niezbędna dla utrzymania pamięci komórkowej. Mimo, że żadna z klasycznych modyfikacji histonów nie jest długoterminowo utrzymywana na genach pamięci IFN $\gamma$ , pamięć transkrypcyjna IFN $\gamma$  jest regulowana lokalnie w trybie *cis*. Dodatkowo, habilitant ustalił, że geny wykazujące pamięć transkrypcyjną mają tendencję do lokalizowania się w klastrach, a inicjacja pamięci transkrypcyjnej jest hamowana lokalnie przez kohezynę.

Nowatorski charakter tych odkryć został podkreślony przez czasopismo *Science Immunology* w artykule „*A cytokine to remember me by*” a także opisany w czasopiśmie Nauka w Polsce w artykule pt. „Jak komórki zapamiętują informacje? Pojawia się nowy trop”. Ponadto, opisywana publikacja *Mol. Cell*, 2020 została zacytowana w Wikipedii pod hasłem „*Transcriptional memory*”.

Poprzez wykonanie kolejnych eksperymentów habilitant ustalił, że sama transkrypcja nie jest wystarczająca do inicjacji pamięci transkrypcyjnej, a wymagany jest system specyficzny dla szlaku sygnalizacji IFN $\gamma$ . Analiza udziału aktywowanych przez IFN $\gamma$  czynników transkrypcyjnego w kontroli pamięci transkrypcyjnej stanowi temat kolejnej doskonałej pracy eksperymentalnej należącej do cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego dr. Siwka i powstałej z jego dominującym udziałem (*EMBO Journal*, 2023).

Aby zrozumieć jakie czynniki transkrypcyjne mogą odgrywać rolę w pamięci, habilitant przeanalizował serię kandydatów z rodzin STAT i IRF stosując mutagenezę CRISPR-Cas9. Stwierdził, że STAT1 i IRF1 są kluczowe w aktywacji genu GBP5. Stosując eksperymenty kinetyczne habilitant stwierdził, że w ponownej aktywacji IFN $\gamma$  chromatyna otwiera się szybciej niż w aktywacji pierwotnej, a czynniki STAT1 i IRF1 są rekrutowane do genu GBP5 w szybszym tempie w porównaniu z pierwotną aktywacją.

Z literatury wiadomo było, że STAT1 jest aktywowany przy związaniu IFN $\gamma$  z receptorem poprzez zwiększenie transkrypcji i fosforylację tyrozyny w pozycji 701 (Y701), natomiast stymulacja IRF1 jest wtórna. Skupiając się na roli STAT1, habilitant eksperymentalnie wykluczył możliwość, że pamięć transkrypcyjna może być regulowana na poziomie transkrypcji genu STAT1 oraz importu STAT1 do jądra komórkowego. Stwierdził również, że zapobieganie fosforylacji (Y701) STAT1 nie miało znaczącego wpływu na utrzymywanie pamięci transkrypcyjnej. Odkrył natomiast, że fosforylacja seryny 727 w STAT1 (S727), niezbędnej do pełnej aktywności tego czynnika transkrypcyjnego, jest utrzymywana długo po usunięciu IFN $\gamma$ . Poprzez konstrukcję i zastosowanie linii komórkowej w której gen STAT1 został zmodyfikowany degenem dTAG odkrył, że usunięcie STAT1 po pierwotnej indukcji IFN $\gamma$  i stabilna fosforylacja (S727) nie mają wpływu na utrzymanie pamięci transkrypcyjnej. Natomiast STAT1 jest fundamentalnym czynnikiem niezbędnym do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. Reasumując, STAT1 jest niezbędny do inicjacji, ale nie do utrzymania pamięci transkrypcyjnej.

Należy podkreślić wkład dr Siwka w udoskonalenie metod molekularnych badania epigenetycznej regulacji ekspresji genów na poziomie chromatyny. Praca o charakterze metodycznym, która wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego została opublikowana w piśmie *Methods in Molecular Biology* w 2018 roku. Zawiera ona opis i weryfikację eksperymentalną nowej, wypracowanej przez habilitanta wysokorozdzielczej metody pomiaru długoterminowej dynamiki nukleosomów w skali całego genomu nazwanej *time-ChIP*. Kluczowym elementem tej metody jest enzym SNAP krótko-terminowo znakowany substratem biotyny. Komórki produkujące histon z dołączonym znacznikiem SNAP inkubowano z CP-Biotyną. Następnie, substancja wmywano, a po pewnym czasie część znakowanych histonów ulega wymianie w nukleosomach. W określonych momentach z komórek izolowano jądra, uwalniano chromatynę a następnie izolowano związanie z RNA nukleosomy, które poddawano analizie qPCR lub sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu. Metoda ta pozwala na izolację i bezpośredni pomiar retencji histonów w chromatynie w określonych *loci*, w komórkach ludzkich. Działanie metody *time-ChIP* potwierdzono przez dokonanie pomiarów dynamiki wariantu histonu H3.3 i połączeniu tych wyników z informacją o aktywnych i nieaktywnych częściach genomu.

Tak więc wyniki prac dr Wojciecha Siwka wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wnoszą bardzo istotne nowe aspekty mechanizmu pamięci transkrypcyjnej w komórkach eukariotycznych. Poza charakterem nowatorskim, wyniki te mają potencjalny aspekt biotechnologiczny wskazując kierunki manipulacji wrodzonym układem odpornościowym.

W autoreferacie dr Siwek opisał także wyniki wykraczające poza osiągnięcie habilitacyjne. Uzyskane przez niego nieopublikowane dane doprowadziły do hipotezy, że elementy *cis* bogate w H3K4me1 w pobliżu genów pamięci są kluczowe dla utrzymania pamięci transkrypcyjnej IFN $\gamma$ . Niezależnie, jako stypendysta Marie Skłodowskiej-Curie w Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School habilitant wykonał przesiew genetyczny w skali całego genomu wykorzystując do tego celu narzędzie CRISPR-Cas9. W ten sposób, zidentyfikował potencjalne czynniki regulujące utrzymanie, ale także inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN $\gamma$ .

### **Ocena dorobku naukowego**

W swojej karierze dr Wojciech Siwek opublikował 7 prac, z których 5 ukazało się po uzyskaniu przez niego stopnia naukowego doktora. Sumaryczny współczynnik IF tych prac wynosi ponad 80, ilość cytacji przekracza 150, zaś indeks Hirsha wynosi 4.

W skład osiągnięcia habilitacyjnego wchodzi trzy prace, które omówiono w pierwszej części niniejszego opracowania. Wyniki swoich badań, nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, dr Wojciech Siwek opublikował w postaci czterech prac. Dwie z nich, które ukazały się w czasopiśmie *Nucleic Acids Research* w latach 2012 i 2014, zawierają wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej i dotyczą analizy struktury enzymu R.Dpn1 i specyfiki mechanizmu rozpoznania metylowanego DNA przez to białko.

Tematyka pozostałych dwóch prac jest pokrewna. Pierwsza praca (*Journal of Molecular Biology*, 2019) stanowi analizę struktury krystalicznej i ewolucji enzymu restrykcyjnego NlaIV. Druga praca (*Acta Biochimica Polonica*, 2016) ma charakter biochemiczny i stanowi opis izolacji i badania aktywności kompleksu III CRISPR z *Thermus thermophilus*.

Habilitant uczestniczył w licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Przed obroną pracy doktorskiej dwa doniesienia zostały opublikowane w *FEBS Journal* a cztery przedstawione w formie posterów na konferencjach, m. in. organizowanych przez FEBS i EMBO. Wygłosił także jeden referat konferencyjny. Wyniki uzyskane po obronie pracy doktorskiej dr. Wojciech Siwek prezentował w formie plakatów na sześciu konferencjach, w tym w *Cold Spring Harbor* i w *EMBL* w Heidelbergu.

W latach 2017-2022 dr Wojciech Siwek wygłosił pięć seminariów na zaproszenie; ich tematyka dotyczyła pamięci transkrypcyjnej.

Poza upowszechnianiem wyników badań naukowych w postaci publikacji, komunikatów naukowych i referatów, dr Wojciech Siwek wykazał się także zdolnościami w pozyskiwaniu funduszy na badania naukowe. Podczas wykonywania pracy doktorskiej był kierownikiem projektu PRELUDIUM finansowanego przez NCN. W trakcie stażu podoktorskiego uzyskał, wraz z prof. Larsem Jansenem, finansowanie badań przez portugalską fundację *Fundação para a Ciência e Tecnologia*, a następnie, z Komisji Europejskiej grant Marii Curie-Skłodowskiej. Środki na uruchomienie własnego laboratorium w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Nowotworowymi zdobył w ramach Programu Młodych Liderów Grup Badawczych na Uniwersytecie Gdańskim. Obecnie jest kierownikiem grantu SONATA pt. "Mechanizmy Inicjacji Pamięci Transkrypcyjnej" finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Był także jednym z głównych wykonawców międzynarodowych projektów Wellcome Trust i ERC. Recenzował publikacje naukowe dla pism *Epigenetics* i *Cancer Communications*

Habilitant był beneficjentem stypendiów, przyznanych, jak powyżej wspomniano, przez *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (stypendium podoktorskie, 2017-2020), Komisję Europejską (Stypendium Marie Skłodowska-Curie GF, 2021-2024) oraz stypendiów podróży przyznawanych przez EMBO i FEBS. W 2021 roku otrzymał nagrodę „Premia na Horyzoncie” z Ministerstwa Edukacji i Nauki.

Dr Wojciech Siwek jest członkiem organizacji i towarzystw naukowych, *Harvard Club of Poland*, *Marie Skłodowska-Curie Alumni Association*, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, komitetu naukowego konferencji *International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology* oraz komisji podoktorskiej w *Instituto Gulbenkian de Ciência*.

Podsumowując dorobek naukowy, za najważniejsze argumenty przemawiające za nadaniem dr Wojciechowi Siwkowi stopnia doktora habilitowanego uważam:

- nowatorskie osiągnięcia naukowe, które znalazły odzwierciedlenie w wybitnych publikacjach, w których rola habilitant występuje jako autor korespondencyjny
- spójność tematyki naukowej i konsekwentne rozwijanie badań nad pamięcią transkrypcyjną, które doprowadziły do poznania mechanizmu molekularnego tego zjawiska
- ustanowienie nowatorskiej metody time-ChIP
- doświadczenie pracy w kilku wybitnych ośrodkach naukowych
- umiejętność pozyskiwania środków finansowych na badania
- Samodzielność, kreatywność. Habilitant nie działa według utartych schematów, ale sam tworzy nowe strategie.

- Wytrwałość i determinacja. Habilitant nie zniechęca się wynikami negatywnymi – liczne takie zostały opisane -ale dąży do zrozumienia istoty problemu

### **Działalność dydaktyczna, popularyzatorska, organizacyjna**

Równolegle do badań naukowych Pan dr Wojciech Siwek uczestniczył w kształceniu młodej kadry naukowej. Był ko-promotorem pracy doktorskiej realizowanej na *University of Oxford* oraz opiekunem jednej magistrantki i dwóch stażystów w *Instituto Gulbenkian de Ciência* w Portugalii. W 2017 wygłosił wykład dla uczestników szkoły doktorskiej w *Instituto Gulbenkian de Ciência*.

W okresie studiów doktoranckich w Polsce habilitant założył naukowy klub dyskusyjny "DoScience" i był współorganizatorem ponad 25 wydarzeń naukowych. Był również współorganizatorem warsztatów laboratoryjnych dla licealistów w ramach BioCentrum Edukacji Naukowej.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując moją opinię wyrażam przekonanie, że przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe i aktywność dr Wojciecha Siwka spełniają warunki konieczne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego.

Popieram wniosek o nadanie Panu dr Wojciechowi Siwkowi stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biotechnologia. Wnioskuje także o wyróżnienie osiągnięcia naukowego dr Siwka ze względu na jego nowatorski charakter.



Prof. dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta