

Warszawa, 05-07-2021

**Dr hab. Roman Szczęsny**

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Kaźmierczak "Charakterystyka mitochondrialnych zmian powstałych w odpowiedzi na zaburzoną biogenezę mitorybosomów".***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Urszuli Kaźmierczak została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Jańskiej. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Małgorzata Kwaśniak-Owczarek.

Mitochondria są półautonomicznymi organellami posiadającymi własny genom o ograniczonej pojemności informacyjnej. Tylko nieliczne białka mitochondrialne kodowane są w genomie mitochondrialnym. Pozostałe białka, w tym białka niezbędne do utrzymania i ekspresji genomu mitochondrialnego, kodowane są w genomie jądrowym. Białka te po syntezie z udziałem rybosomów cytoplazmatycznych są importowane do mitochondriów. Szczególnym przykładem maszyny mitochondrialnej zależnej od informacji genetycznej zawartej w genomie mitochondrialnym i jądrowym są rybosomy mitochondrialne (mitorybosomy). U *Arabidopsis thaliana*, który stanowił organizm modelowy recenzowanej rozprawy, w skład rybosomów wchodzi 3 cząsteczki RNA kodowane w mitochondrialnym DNA oraz białka kodowane w genomie mitochondrialnym i jądrowym. Wyniki dotychczasowych prac wskazują, że prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów wymaga skoordynowanej ekspresji obu wymienionych genomów. Jednakże, pomimo intensywnych badań, mechanizmy odpowiedzialne za koordynację ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego nie zostały w pełni poznane. Co więcej, nadal stosunkowo niewiele wiadomo o podstawowych mechanizmach ekspresji genomu mitochondrialnego, zwłaszcza w przypadku roślin, u których złożona organizacja genomu mitochondrialnego powoduje, że jest to bardzo ciekawy obiekt badań, ale jednocześnie stanowi duże wyzwanie badawcze.

Badania przeprowadzone przez mgr Urszulę Kaźmierczak stanowią kontynuację dotychczasowych prac zespołu prof. Jańskiej, który zaobserwował, że obniżenie ekspresji genu *RPS10* u rzodkiewnika pospolitego skutkuje zaburzeniem biogenezy rybosomów mitochondrialnych. Zaproponowano, że niedobór białka S10 kodowanego przez ten gen prowadzi do utraty równowagi pomiędzy małą a dużą podjednostką mitorybosomów. Zaobserwowano, że obniżenie ekspresji genu *RPS10* powoduje zmiany

w selektywności mityribosomów. Obserwacje te stanowiły podstawę badań przeprowadzonych przez mgr Urszulę Kaźmierczak. Autorka rozprawy jako temat badań przyjęła charakterystykę zmian translacji mitochondrialnej powodowanych obniżeniem ekspresji genu *RPS10*. Aby osiągnąć ten cel postanowiła zastosować technikę wysokorozdzielczej analizy regionów RNA związanych z rybosomami (Ribo-seq) w połączeniu z wysokoprzepustową analizą transkryptomu mitochondrialnego (RNA-seq). Cel rozprawy uważam jako wysoce interesujący i ważny dla zrozumienia jednego z kluczowych etapów ekspresji informacji genetycznej w mitochondriach.

Wykorzystując wspomniane powyżej techniki oparte o sekwencjonowanie nowej generacji oraz szereg metod biologii molekularnej mgr Kaźmierczak zrealizowała, a nawet poszerzyła zamierzony zakres badań. Autorka potwierdziła i znacząco rozwinęła wcześniejsze obserwacje wskazujące, że obniżenie ekspresji genu *RPS10* prowadzi do zmniejszenia selektywności rybosomów mitochondrialnych. Autorka wykazała, że obniżona ekspresja genu *RPS10* prowadzi do zwiększenia translacji mitochondrialnych mRNA kodujących białka rybosomalne przy jednoczesnym zmniejszeniu translacji mitochondrialnych mRNA dla białek wchodzących w skład kompleksów fosforylacji oksydacyjnej. Autorka po raz pierwszy uzyskała wyniki sugerujące zmiany w strukturze mityribosomów w warunkach obniżonej ekspresji *RPS10*. Mgr Kaźmierczak stwierdziła bowiem, że w takich warunkach dochodzi do zmiany długości RNA związanego przez mityribosom.

Za bardzo interesujące uznaję odkrycie przez mgr Kaźmierczak wpływu zaburzenia translacji mitochondrialnej na składanie mitochondrialnego pre-mRNA. Dzięki zastosowanej strategii badawczej Autorka zaobserwowała utratę precyzyjnego działania mityribosomów. W normalnych warunkach fragmenty RNA wiązane przez rybosom wykazują trzynukleotydową cykliczność, która wynika z precyzyjnego miejsca inicjacji translacji oraz trzynukleotydowego kodu genetycznego. Badania mgr Kaźmierczak pozwoliły jej zaproponować, że nieprawidłowo złożona mała podjednostka mityribosomu może rozpoczynać syntezę białka w miejscach, które zazwyczaj nie służą jako miejsce inicjacji translacji. Ponadto, Autorka uzyskała wyniki wskazujące na wiązanie intronów przez mityribosomy. Znaczenie tych obserwacji wymaga dalszych badań, niemniej uważam, że wykazanie przez mgr Kaźmierczak powiązania pomiędzy translacją mitochondrialną, a składaniem pre-mRNA może być istotnym etapem w rozpoczęciu nowego kierunku badań biologii mitochondriów roślinnych.

Co ciekawe, Autorka wykazała związek między prawidłowym składem białkowym rybosomów mitochondrialnych, a posttranskrypcyjną obróbką 18S i 5S rRNA kodowanego w genomie mitochondrialnym. Tym samym, wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Kaźmierczak dostarczają dowodów na istnienie zależności między biogenezą białkowej części mityribosomów z formowaniem ich składników rybonukleinowych. Co ważne, Autorka przeprowadziła eksperymenty mające na celu sprawdzenie czy opisane powyżej zmiany w metabolizmie mitochondrialnego RNA są ogólną konsekwencją zaburzenia składu mityribosomów czy też mają charakter specyficzny dla białka S10 i pełnionej przez niego funkcji. W tym celu Autorka zbadała translację mitochondrialną w warunkach obniżonej ekspresji genu *MRPL11*, który koduje białko wchodzące w skład dużej podjednostki mityribosomu. Uzyskane wyniki pozwoliły zaproponować mgr Kaźmierczak, że zmiany zaobserwowane w warunkach obniżonej ekspresji *RPS10* są specyficzne dla białka S10.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego, nie budzącego zastrzeżeń układu podziału tekstu na: wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz spis literatury. Wstęp został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Dobrze zaplanowane rysunki dopełniają tekst, który w sposób ciekawy prowadzi czytelnika przez kolejne rozdziały rozprawy. Dodatkowa korekta językowa, usunięcie zwrotów żargonowych (np.

egzony ulegają łączeniu lub składaniu, a nie klejeniu) oraz zwiększenie czcionki na niektórych rysunkach mogłaby poprawić ten aspekt rozprawy (przykładowo: ostatni wiersz na stronie 121 powinno być D6 zamiast D5, oprócz zamiast oprucz, również zamiast rónież, fragment zamiast fragmnet). Moich zastrzeżeń nie budzi piśmiennictwo zastosowane w rozprawie (brak referencji numer 216). Stwierdzam, że Autorka opanowała umiejętność przygotowywania tekstów naukowych.

Rozdział „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badań. Autorka bardzo dobrze dobrała poziom szczegółowości przedstawianych informacji niezbędnych dla zrozumienia celu i wyników badań opisanych w rozprawie. Jednocześnie, co chciałbym podkreślić, Autorka wykazała się znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań. W rozdziale „Wstęp” Autorka opisuje technikę Ribo-seq omawiając jej poszczególne etapy, wskazując m.in. różne możliwości zahamowania rybosomów. W trakcie publicznej obrony prosiłbym o komentarz na temat ich wad i zalet. Jednocześnie prosiłbym o komentarz jakie dowody świadczą o tym, że w mitochondriach rzodkiewnika występują polisomy.

W rozdziale „Materiały i metody” w poprawny sposób opisane zostały stosowane metody oraz materiały badawcze. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. Zakres stosowanych technik jest szeroki, a zastosowana metodyka badań odpowiednio dobrana do stawianych celów badawczych. Wykorzystana technika Ribo-seq jest narzędziem wymagającym, a jej zastosowanie świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym mgr Kaźmierczak. Niektóre eksperymenty lub analizy zostały wykonane przez Autorkę we współpracy z innymi badaczami. Nie zmniejsza to znaczenia mgr Kaźmierczak w przeprowadzeniu badań, a wręcz pozytywnie świadczy o tym, że Autorka posiada umiejętność współpracy z innymi badaczami.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Prace te zostały wykonane z należytą starannością. Rozdział ten stanowi opis cyklu eksperymentów stanowiących logiczny ciąg. Co ważne, Autorka słusznie zwraca uwagę, że RNA zidentyfikowany w Ribo-seq nie zawsze musi reprezentować fragment związany przez mityribosom. Nie zgadzam się natomiast z Autorką, która wydaje się interpretować wyniki analizy RNA-seq jako wskaźnik procesu transkrypcji. Metoda ta pozwala badać transkryptom i określić poziom poszczególnych RNA, który zależy od intensywności syntezy danego RNA (transkrypcji) oraz jego degradacji (o czym pisze również Autorka w rozdziale 1.4.3.5). Ponieważ, Autorka nie wykluczyła zmian w degradacji RNA to nie może interpretować zmian w poziomie RNA jako regulacji na poziomie transkrypcji (przykładowo tytuł rozdziału 4.1).

Główne wyniki uzyskane przez Autorkę zostały opisane powyżej. W tym miejscu chciałbym poprosić Autorkę o komentarz do następujących zagadnień:

- Zarówno w genomach mitochondrialnych kręgowców jak i roślin postuluje się istnienie dodatkowych otwartych ramek odczytu. Czy w danych uzyskanych z eksperymentów Ribo-seq Autorka poszukiwała dowodów na istnienie otwartych ramek odczytu dotychczas nieopisanych w genomie mitochondrialnym rzodkiewnika?
- Sugeruje się, że transkrypty mitochondrialne u roślin podlegają intensywnej edycji. Na istnienie tego procesu zwraca również uwagę Autorka rozprawy. Jednocześnie, opisując dane Ribo-seq i RNA-seq Autorka wskazuje, że większość odczytów NGS miała identyczną sekwencję jak genom referencyjny (rozd. 4.1.2.2). Jak należy interpretować ten wynik? Czy częstość edycji mitochondrialnego RNA jest mniejsza niż się przypuszcza? Czy obróbka danych NGS mogła zaniżyć liczbę odczytów wskazujących na istnienie edycji RNA? Proszę o komentarz.

- Na Rysunku 4.17A przedstawiono mtRibo-seq\_sRNA. 40 z nich było wspólnych dla wszystkich badanych warunków (WT, P2, P3). 24 zostały zidentyfikowane zarówno w P2 i P3, ale nie w roślinach kontrolnych. Czy potencjalne sRNA zidentyfikowane w roślinach P2 i P3 były zlokalizowane w określonych transkryptach, lub regionach transkryptów?
- Czy w trakcie badań sprawdzono poziom białka S10?

Autorka w krytyczny i ciekawy sposób interpretuje wyniki swoich badań w rozdziale „Dyskusja”. Ten rozdział rozprawy potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr Urszulę Kaźmierczak oraz ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są omawiane i analizowane na tle danych literaturowych. Autorka stawia hipotezę, że niektóre zmiany spowodowane obniżeniem ekspresji genu *RPS10* mogą sugerować, że białko S10 może pełnić rolę niezależną od rybosomów mitochondrialnych. Eksperymentalna weryfikacja tej hipotezy mogłaby dostarczyć kolejnych istotnych informacji na temat molekularnych podstaw ekspresji informacji genetycznej w mitochondriach.

Znacząca część wyników prac badawczych zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, co podkreśla znaczenie oraz jakość omawianych w recenzji badań. Mgr Urszula Kaźmierczak jest jednym z dwóch równorzędnych pierwszych autorów wspomnianego artykułu. Doktorantka jest również współautorką dwóch innych artykułów. Biorąc pod uwagę, że w rozprawie zawarto inne interesujące i dotychczas nieopublikowane wyniki można spodziewać się, że dorobek mgr Urszuli Kaźmierczak poszerzy się o kolejne publikacje. Dorobek naukowy Kandydatki oceniam jako bardzo dobry.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Urszuli Kaźmierczak oceniam wysoko. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego jednego z kluczowych etapów podstawowego procesu biologicznego – ekspresji informacji genetycznej w mitochondriach. Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych badań oraz duże znaczenie dla rozwoju dziedziny stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca w pełni spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Urszuli Kaźmierczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Roman Szczęsny