



prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl
tel. 61 829 5959

Poznań, 07. 07. 2021

Ocena pracy doktorskiej mgr Urszuli Kaźmierczak pt. „Charakterystyka mitochondrialnych zmian powstałych w odpowiedzi na zaburzoną biogenezę mitybosomów”

Badania, których wyniki zostały przedstawione w pracy doktorskiej mgr Urszuli Kaźmierczak wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem przedstawionej do oceny rozprawy jest prof. dr hab. Hanna Jańska, a promotorem pomocniczym dr Małgorzata Kwaśniak-Owczarek. Praca dotyczy budowy i funkcjonowania rybosomów w mitochondriach komórek roślinnych i jest ściśle powiązana z tematyką badawczą od lat uprawianą w grupie kierowanej przez prof. dr hab. Hannę Jańską. We wszystkich opisanych w rozprawie doświadczeniach wykorzystano roślinę modelową, *Arabidopsis thaliana*, a zatem uzyskane przez Doktorantkę wyniki wpisują się w obszar badań podstawowych, a tym samym poszerzają naszą wiedzę o funkcjonowaniu komórki na poziomie molekularnym. Zarówno temat rozprawy, jak i przedstawione w niej wyniki są w pełni oryginalne i mają charakter nowatorski. Pod tym względem przedstawiony przez mgr Urszulę Kaźmierczak manuskrypt w pełni spełnia wymagania stawiane przed rozprawami doktorskimi.

Oceniana rozprawa ma klasyczny układ i została napisana w języku polskim. Praca napisana jest poprawnie i zrozumiale, chociaż Autorka nie ustrzegła się błędów redakcyjnych, które w żadnym wypadku nie utrudniły jednak czytanie manuskryptu. Rozprawa mgr Urszuli Kaźmierczak rozpoczyna się obszernym wstępem, w którym Doktorantka przedstawiła dane literaturowe potrzebne czytelnikowi do właściwego zrozumienia i oceny zaprezentowanych w rozprawie wyników. Magister Urszula Kaźmierczak rozpoczyna ten rozdział od opisanie pochodzenia i funkcjonowania mitochondriów roślinnych. We Wstępie przedstawione zostały także informacje na temat budowy i działania roślinnych rybosomów mitochondrialnych. W dalszej części tego dobrze napisanego rozdziału Autorka



ocenianej rozprawy wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z ekspresją genów mitochondrialnych, skupiając się przede wszystkim na potranskrypcyjnej obróbce cząsteczek RNA powstających na matrycy DNA mitochondrialnego. Doktorantka charakteryzuje w tej części również białka PPR, które u roślin odgrywają zasadniczą rolę w dojrzewaniu i stabilizacji mitochondrialnego RNA. Wstęp zawiera także wyczerpujące informacje na temat translacji prowadzonej przez mityribosomy. Muszę przyznać, że czytając tę część rozprawy byłem zaskoczony, jak mało poznany jest ten proces i jak wiele jeszcze czeka nas pracy zanim w pełni zrozumiemy translację zachodzącą w mitochondriach, a przede wszystkim poznamy mechanizmy związane z jej regulacją. Ostatni podrozdział Wstępu wyróżnia się od pozostałych, ponieważ dotyczy metodyki badań zastosowanej przez Doktorantkę, a mówiąc dokładniej, opisuje technikę profilowania rybosomów. Magister Urszula Kaźmierska podkreśliła w tym podrozdziale szerokie możliwości wykorzystania profilowania rybosomów do badania translacji *in vivo*. Jestem wdzięczny Doktorantce, że opisała w rozprawie tę ciekawą metodę, ponieważ szczegóły techniczne, które znalazłem w tym opisie znacznie ułatwiły mi analizę przedstawionych w rozprawie wyników. Podsumowując, bardzo obszerny przegląd literaturowy został napisany zrozumiałym dla czytelnika językiem. Ma logiczny, przejrzysty układ i został opracowany na podstawie najnowszej literatury naukowej. Jego jedyną wadą jest fakt, że ma prawie 50 stron, chociaż, muszę przyznać, że czytałem go z zainteresowaniem i sam miałbym nie lada dylemat, które części Wstępu można by „odchudzić”.

W następnym rozdziale rozprawy mgr Urszuli Kaźmierska przedstawiła cel badań, których wyniki znalazły się w ocenianej pracy doktorskiej. Głównym celem Doktorantki było poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany w translacji przebiegającej w mitochondriach, zaobserwowane w mutancie *A. thaliana* z wyciszoną ekspresją białka S10 wchodzącego w skład małej podjednostki mityribosomów. Mutant *rps10* został skonstruowany wcześniej w laboratorium prof. dr hab. Hanny Jańskiej. Uzyskane wyniki planowano porównać z mutantem o obniżonym poziomie białka L11, które wchodzi w skład dużej podjednostki mityribosomów *A. thaliana*. Dodatkowo Doktorantka zaplanowała analizę roślin mutantów *rps10* pod kątem zbadania ścieżki dojrzewania pre-rRNA kodującego cząsteczkę 18S rRNA i 5S rRNA. Magister Urszula Kaźmierska postanowiła również przetestować, czy w mutancie *rps10* aktywność terminalnych oksydaz jest zmieniona w stosunku do roślin typu dzikiego. Główny cel badań jest dla mnie jasny i oczywisty, chociaż w formie zaproponowanej przez Doktorantkę nadmierna uwaga zwrócona została w kierunku zastosowanej metodyki, a nie czysto poznawczego charakteru celu badawczego. Nie jest to w żadnym wypadku krytyka, raczej dobra rada na przyszłość - przy formułowaniu celu badań lepiej skupić się na zasadniczym pytaniu badawczym, a dopiero później proponować odpowiednie narzędzia i metody. Skupienie uwagi czytelnika na metodyce doświadczeń przy przedstawianiu celu



naukowego badań powoduje, że staje się on mniej wyrazisty, a czasami nawet niejasny.

Kolejny rozdział poświęcony został użytym w eksperymentach odczytnikom oraz zastosowanym metodom badawczym. Nie mam zastrzeżeń do tej części rozprawy, wszystkie wątpliwości metodyczne, na które natrafiłem podczas czytania rozdziału opisującego uzyskane wyniki, znalazły swoje wyjaśnienia w opisie zastosowanych technik i odczytników. Zwraca uwagę różnorodność stosowanych przez Doktorantkę metod, a przede wszystkim użycie przez nią zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych, które musiała doskonale opanować, aby przeanalizować dane pochodzące z sekwencjonowania transkryptomu oraz wyniki profilowania rybosomów.

Najważniejszą część rozprawy stanowi rozdział opisujący uzyskane wyniki. Jak już wspomniano wcześniej, w badaniach wykorzystano mutantą *rps10*, w którym metodą RNAi wyciszono ekspresję jądrowego genu kodującego białko S10. Białko to transportowane jest do mitochondriów, gdzie wchodzi w skład małej podjednostki mityrybosomów. Użyto dwie różne heterozygotyczne linie transgeniczne różniące się czasem pojawienia się charakterystycznego fenotypu związanego z obniżonym poziomem białka S10. Wcześniejsze badania przeprowadzone w zespole prof. dr hab. Hanny Jańskiej pokazały, że w mitochondriach obu analizowanych mutantów *rps10*, w porównaniu do mitochondriów typu dzikiego (wt), dochodzi do zmiany profilu syntezy białek. W celu wyjaśnienia tej różnicy Doktorantka postanowiła przeprowadzić profilowanie mityrybosomów i porównać wyniki uzyskane dla obu mutantów *rps10* i roślin typu wt. Głównym pytaniem jakie zadała mgr Urszula Kaźmierczak było, czy zmiany obserwowane na poziomie białka są powiązane ze zmianami translacji kodujących je mRNA. Uzyskane dane zostały wzorcowo opracowane, a analiza bioinformatyczna jednoznacznie pokazała, że mają dobrą jakość i nadają się do dalszej obróbki. Ciekawe, że w wynikach profilowania mityrybosomów pochodzących z roślin typu wt stwierdzono zwiększoną liczbę transkryptów nie pochodzących z genomu mitochondrialnego. Zgadzam się z Autorką rozprawy, że takie RNA mogą pochodzić z cytoplazmatycznych rybosomów ulokowanych na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Oznaczałoby to jednak, że takich rybosomów jest mniej w mutantach *rps10* niż w komórkach roślin typu wt. Czy mikroskopowo obserwowano taką różnicę? Czy wśród tych zidentyfikowanych w trakcie profilowania mityrybosomów RNA niekodowanych przez genom mitochondrialny przeważają mRNA białek kierowanych do mitochondriów? Doktorantka zaobserwowała również, że liczba odczytów związanych z niekodującymi częściami transkryptów jest u mutantą *rps10* większa niż w mitochondriach wt. W przypadku sekwencjonowania mitochondrialnego RNA dotyczyło to dodatkowych odczytów w obrębie intronów, a w przypadku RNA otrzymanego w wyniku profilowania rybosomów, w obrębie intronów i 3' UTR-ów.



Wyniki te jasno wskazują na zaburzenia splicingu w mutancie *rps10*, a także rozpoczęciu translacji niedojrzałych, zawierających jeszcze introny mRNA. Z kolei badania periodyczności odczytów profilowania mitorybosomów jednoznacznie wskazały, że jest ona dużo bardziej wyraźna w przypadku mitochondriów typu wt niż obu badanych mutantów *rps10*. Co więcej, różnica ta jest jeszcze większa jeśli analizie poddano geny posiadające introny. Dane te wskazują, że mitochondrialne rybosomy pozbawione białka S10 mają kłopot z rozpoznaniem/utrzymaniem odpowiedniej ramki odczytu. Niezwykle ciekawy jest również wynik wskazujący, że w mutancie *rps10* dochodzi do zahamowania splicingu, z wyjątkiem intronów ulegającym *trans*-splicingowi. Jednak najciekawsze są dla mnie wyniki wskazujące na wzrost ekspresji maturazy, przy jednoczesnym obniżeniu wydajności splicingu intronów grupy II. Jak już wspomniałem, te niedojrzałe, posiadające introny mRNA są w mutancie *rps10* rozpoznawane przez mitorybosomy. Magister Urszula Kaźmierczak postanowiła sprawdzić, czy w wyniku translacji sekwencji intronowych powstają specyficzne fragmenty białek. Wykorzystując specjalnie przygotowane przeciwciała, Doktorantka wykazała, że sekwencje intronowe nie są wykorzystywane do syntezy peptydów, co sugerowałoby, że rybosomy w mitochondriach kończą translację w czasie odczytywania sekwencji intronowej. Zastanawiam się jednak na jakiej zasadzie mitorybosom rozróżnia sekwencję egzonu i intronu?

Zaskakujące wzbogacenie odczytów z rejonów niekodujących zaobserwowane w mutancie *rps10* zachęciło mgr Urszulę Kaźmierczak do dokładniejszej analizy krótkich RNA pochodzących z tych rejonów mitochondrialnego RNA. Ponieważ analizowane niskocząsteczkowe RNA nie wykazywały charakterystycznej periodyczności trójnukleotydu, Doktorantka słusznie założyła, że mogą to być fragmenty RNA chronione przez odpowiednie białka, czyli tak zwane cosRNA (ang. *clustered organellar sRNAs*). Wykonane analizy wykazały, że duża część sekwencji pochodzących z 3' UTR i 5' UTR zidentyfikowanych przez profilowanie rybosomów to właściwie krótkie fragmenty RNA (sRNA) ochronione przed nukleazami przez związane z nimi białka. Spośród 58 zidentyfikowanych przez Doktorantkę mtRibo-seq_sRNA, 12 w dużym stopniu pokrywało się z opisanymi wcześniej sekwencjami cosRNA z *A.thaliana*.

Magister Urszula Kaźmierczak porównała wyniki sekwencjonowania RNA mitochondrialnego i fragmentów RNA otrzymanych w wyniku zastosowania metody profilowania rybosomów. Przeprowadzone analizy wykazały, że w mitochondriach mutantu *rps10* poziom transkryptów kodujących białka rybosomowe, białka zaangażowane w biogenezę cytochromu c, a także kodujące białka MatR i TatC był dużo wyższy niż u roślin typu wt. Z drugiej strony poziom transkryptów pochodzących z genów kodujących białka systemu fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) był bardziej zróżnicowany, jednak najczęściej obserwowano wyraźnie obniżoną akumulację transkryptów tej grupy genów. Analizując wydajność procesu translacji potwierdzono, że w mitochondriach typu wt najczęściej syntetyzowane są białka na matrycy mRNA OXPHOS. W przypadku mitochondriów mutantu *rps10* nie zaobserwowano już takiej



selektywności, znacznie wzrosła natomiast wydajność biosyntezy białek rybosomowych, a także białek MatR i TatC. Doktorantka opisała także wydajność translacji dwóch dicistronowych mRNA, w których jedna sekwencja kodująca polipeptyd podlega wydajniejszej translacji na rybosomach typu wt, a druga ulega wydajniejszej translacji przebiegającej na rybosomach pozbawionych białka S10. Uzyskane wyniki nie wzbudzają wątpliwości, trudno mi sobie jednak wyobrazić mechanizm takiego wybiórczego wyboru cistronu na dicistronowych mRNA. W czasie obrony chciałbym poprosić Doktorantkę o przedstawienie swojej opinii na ten temat. Oprócz badania wydajności translacji mgr Urszula Kaźmierczak wykorzystwała uzyskane dane do określenia tak zwanej efektywności translacji, czyli skuteczności wykorzystania poszczególnych mRNA przez mityribosomy. Analiza ta wykazała, że w mitochondriach typu wt najefektywniej ulegają translacji mRNA kodujące białka odpowiedzialne za fosforylację oksydacyjną, w tym szczególnie wydajnie wykorzystywany jest mRNA białka NAD3. Najmniej efektywnie z kolei ulegają translacji białka rybosomowe (z wyjątkiem RPS7), a także MatR i TatC. Natomiast w mutancie *rps10* z najwyższą efektywnością syntetyzowane są białka rybosomowe, ale również białka COX3 i ATP6-2. Porównanie efektywności translacji w mitochondriach mutanta i roślin wt wykazało, że w przypadku genów kodujących wiele białek rybosomowych, a także białek MatR i TatC, w mutancie *rps10* obserwuje się zarówno podwyższenie ich ekspresji, jak również wzrost efektywności ich translacji. Natomiast ekspresja genów białek uczestniczących w biogenezie cytochromu C jest regulowana w mutancie *rps10* przede wszystkim na poziomie transkrypcyjnym. Najbardziej zróżnicowana była efektywność syntezy poszczególnych białek OXPHOS. Muszę jednak stwierdzić, że analiza wykresów przedstawiających efektywność translacji jest bardzo trudna ze względu na zastosowane kolory (rys. 4.22). Niektórych kolorów nie sposób od siebie odróżnić, co uniemożliwia właściwą interpretację uzyskanych wyników. Dotyczy to również rys. 4.20.

Doktorantka zauważyła także, że w mutancie *rps10* zaburzona jest produkcja 18S rRNA z cząsteczki prekursorowej, która zawiera w sobie również 5S rRNA. W tym samym czasie poziom 5S rRNA był wyższy, porównywalny z poziomem 26S rRNA. Obserwacje te wskazują jednoznacznie na nieprawidłowości w dojrzewaniu prekursora 18S rRNA i 5S rRNA. Jeśli dobrze interpretuję rys. 4.23 to poziom zarówno 5S, jak i 26S w mutancie *rps10* był wyższy niż w mitochondriach typu wt. Towarzyszy temu, omówiony wcześniej, wzrost translacji białek rybosomowych, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmu kompensacyjnego wywołanego zaburzeniami działania łańcucha oddechowego, a w konsekwencji mniejszym zapotrzebowaniem na tlen. Nie można również wykluczyć, że jest to reakcja na niższy poziom ATP obserwowany w mutancie *rps10*. Przedstawione hybrydyzacje typu Northern świadczą o akumulacji form prekursorowych 18S-5S rRNA. Interpretacja wyników tej hybrydyzacji byłaby pełniejsza, gdyby zastosowano dodatkowe sondy komplementarne do innych fragmentów tego prekursora. Zamiast



hybrydyzacji wykonano jednak analizy PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki tego eksperymentu pokazały, że w mutancie *rps10* poziom prekursora 18S-5S jest dużo wyższy u mutantu niż w mitochondriach roślin wt. Co więcej, Doktorantka wykazała, że w mitochondriach mutantu *rps10* gromadzą się cząsteczki RNA zawierające 18S rRNA, sekwencję ITS i 5S rRNA, a także i takie, które zawierają 18S rRNA i różnej długości fragmenty ITS. Ciekawe, że większość z nich posiadała kilka reszt A na końcu 3', co sugeruje, że są to nieprawidłowe produkty cięcia najprawdopodobniej przeznaczone do degradacji. Wpływ białka S10 na dojrzewanie prekursora 18S-5S rRNA jest bardzo ciekawy, ale przedstawione wyniki mają jedynie charakter wstępny i dla zrozumienia tej zależności potrzebna jest dużo bardziej dokładna analiza ścieżki dojrzewania prekursorów rRNA.

Porównanie transkryptomów mutantu *rps10* oraz podwójnego mutantu *aox1a_rpoTmp* wykazało, że są one do siebie niezwykle podobne. Magister Urszula Kaźmierczak pokazała, że podobnie do podwójnego mutantu *aox1a_rpoTmp*, w mutancie *rps10* dochodzi do obniżenia aktywności zarówno drogi cytochromowej, jak i alternatywnej oddychania mitochondrialnego. O ile zaburzenia w funkcjonowaniu kompleksu IV wydawały się oczywiste, obniżona aktywność alternatywnej oksydazy była niejasna. Okazało się, że główną przyczyną obniżonej aktywności alternatywnej oksydazy jest transport pirogronianu. Doktorantka oznaczyła także poziom ATP w mitochondriach roślin wt i mutantu *rps10* i wykazała, że jest on znacząco niższy u mutantu niż w mitochondriach wt. Nie wiem tylko dlaczego w eksperymentach, których wyniki przedstawiono na rys. 4.30 i 4.31 nie uwzględniono podwójnego mutantu *aox1a_rpoTMP*, tak jak przy wcześniejszych analizach aktywności oddechowej mitochondriów. Uzyskane wyniki sugerowały, że sygnałem wywołującym zmiany charakterystyczne dla mutantu *rps10* jest mniejsze zużycie tlenu.

W ostatniej części rozdziału zatytułowanego Wyniki mgr Urszula Kaźmierczak przeanalizowała fenotyp mutantu *mrp11*. Jest to mutant insercyjny z uszkodzonym genem kodującym białko L11, wchodzące w skład dużej podjednostki mityriobosomu *A. thaliana*. W pracy wyczytałem, że ekspresja genu kodującego L11 jest ograniczona w tym mutancie o 90%. W trakcie obrony chciałbym poprosić o wyjaśnienie, jak to jest możliwe w przypadku mutantu insercyjnego. Czy jest to heterozygota? Byłem zaskoczony, że mutant ten nie wykazuje ani zaburzeń w dojrzewaniu cząsteczek rRNA, ani w poziomie białek rybosomów mitochondrialnych. Co więcej, nie zaobserwowano również żadnego wpływu badanej mutacji na wydajność translacji w mitochondriach. Dlaczego wpływ braku L11 jest tak marginalny? Wyniki te bardzo mnie zdziwiły, ale z drugiej strony podkreśliły wyjątkowość białka S10 – głównego bohatera ocenianej rozprawy.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały podsumowane w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Rozdział ten jest stosunkowo krótki, ale został napisany jasno i dobrze się go czyta. Jest jednak w dużej mierze przypomnieniem najważniejszych wyników ocenianej pracy. Jednak większość wyników przedstawionych w rozprawie została



skonfrontowana z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Trochę brakuje mi w tej części pracy spekulacji na temat mechanizmów wyjaśniających otrzymane wyniki. Rozumiem jednak, że wynika to z ostrożności i z obawy przed zarzutem nadinterpretacji zaprezentowanych wyników. Sądzę jednak, że przedstawienie takich roboczych hipotez dodałoby Dyskusji koloru.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Urszuli Kaźmierczak pt. "Charakterystyka mitochondrialnych zmian powstałych w odpowiedzi na zaburzoną biogenezę mitochondriów" spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W pracy przedstawiono oryginalne wyniki precyzyjnie przemyślanych i dobrze zaplanowanych eksperymentów, które zostały we właściwy sposób zinterpretowane i skonfrontowane z danymi literaturowymi. Część zaprezentowanych w pracy wyników została opublikowana w artykule, który ukazał się w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, co najlepiej świadczy o wysokim poziomie uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Mając powyższe na uwadze, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Urszuli Kaźmierczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, z uwagi na wysoki poziom przedstawionych w rozprawie wyników naukowych, zwracam się z prośbą o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Urszuli Kaźmierczak stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski



UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50
ibmib@amu.edu.pl
