

Poznań, 28.10.2022

Dr hab. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGC PAN  
Zakład Patologii Molekularnej

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Zawadzkiej pt. „Charakterystyka struktury genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 w warunkach *in vitro* oraz na wybranych etapach replikacji w drożdżach” została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek, prof. ICHB PAN. Rozprawa została przedstawiona w formie zbioru trzech prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej w latach 2020-2022 i obejmuje dwie publikacje oryginalne oraz jedną przeglądową. W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem (w tym w jednej wspólnie z innym autorem, na zasadzie równorzędnego wkładu), a w trzeciej publikacji – drugim autorem. Znaczący wkład Pani mgr Małgorzaty Zawadzkiej w powstanie wszystkich prac został potwierdzony oświadczeniami samej Doktorantki oraz Pani Promotor, autorki korespondencyjnej.

Tematyka badawcza rozprawy dotyczy analizy struktury RNA transpozonu drożdżowego i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Zakładzie Struktury i Funkcji Retrotranspozonów oraz trendy światowej nauki wskazujące na znaczenie struktury RNA, zwłaszcza tych niekodujących, dla ich funkcji. Głównym celem badań Doktorantki było poznanie molekularnych aspektów procesu replikacji retrotranspozonów LTR na przykładzie zmian w strukturze RNA retrotranspozonu Ty1 w trakcie replikacji i w różnych kompartmentach komórkowych. Celowi temu zasadniczo odpowiada cel szczegółowy przedstawiony w publikacji nr 2, Zawadzka et al., *Viruses*, 2022. Natomiast cel szczegółowy pierwszej publikacji, Andrzejewska, Zawadzka et al., *NAR*, 2021 dotyczył określenia struktury gRNA Ty1 w warunkach *in vitro* i porównania do tej uzyskanej *in vivo*. Ponadto, celem trzeciej, przeglądowej publikacji, było usystematyzowanie wiedzy na temat komórkowych determinantów związania się struktur RNA oraz wpływu struktury RNA na funkcję tych cząsteczek. Wydaje się więc, że główny cel rozprawy mógł zostać ujęty szerzej, by cele szczegółowe były w nim zawarte, a nie stanowiły jego rozszerzenie.

RNA jest nośnikiem informacji zakodowanej na dwóch poziomach: w jego sekwencji oraz strukturze drugo- i trzeciorzędowej. Konformacja, jaką przybiera RNA, jest kluczowa dla stabilności, obróbki i funkcji transkryptów oraz determinuje oddziaływania RNA z białkami. Kluczowe dla funkcji RNA motywy często są wysoce ustrukturyzowane. Stąd określenie struktury RNA jest bardzo ważne dla poznania ich funkcji. Nie jest to jednak trywialne zadanie. Mimo coraz to nowszych algorytmów pozwalających na przewidywanie struktury drugorzędowej RNA, nie są one doskonałe i ostatecznie niezbędne jest jej eksperymentalne potwierdzenie. Tutaj stosowane są metody chemicznego mapowania, takie jak SHAPE. Opierają się one na różnej reaktywności nukleotydów RNA z pewnymi czynnikami chemicznymi, w zależności od tego czy dany nukleotyd jest zaangażowany w oddziaływania z innym nukleotydem, czy też jest on „wolny”. Większość badań opiera się na podejściu *in vitro*, które jest łatwiejsze z wielu względów. Jednak należy się spodziewać – i zostało to pokazane – że w złożonym środowisku, jakim jest wnętrze komórki, cząsteczki RNA mogą zwiijać się w inne struktury. Stąd istotne są badania mające na celu określenie struktur RNA w różnych warunkach, a także na różnych etapach „życia” transkryptów.

Rozprawa liczy 100 stron, rozpoczyna się spisem publikacji oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim; następnie przedstawione jest wprowadzenie do pracy. Oprócz przedruków publikacji, rozprawa zawiera też krótki opis każdej z nich w języku polskim. Praca zawiera też wykaz skrótów, życiorys Doktorantki oraz oświadczenia o wkładzie w publikacje wchodzące w skład rozprawy. Przydatny byłby moim zdaniem jeszcze krótki rozdział zawierający podsumowanie i wnioski płynące z prezentowanych prac.

W liczącym 11 stron wstępie Doktorantka przedstawia historię odkrycia ruchomych elementów genetycznych oraz ich podział na transpozony DNA i retrotranspozony. Następnie skupia się na grupie transpozonów typu LTR: omawia ich trzy główne rodziny i wskazuje podobieństwa oraz różnice w odniesieniu do retrowirusów. Są one przejrzysto zilustrowane na Rysunku 1., choć w legendzie zabrakło objaśnienia skrótów, takich jak PR, RT, RH, IN. Są one wprowadzone wyjaśnione w tekście, ale rysunek powinien być autonomiczną częścią, którą można zrozumieć bez odnoszenia się do głównego tekstu. Dalej Doktorantka płynnie przechodzi do charakterystyki retrotranspozonu Ty1, będącego przedmiotem jej badań. Szczegółowo omawia jego budowę i cykl życiowy, a następnie podsumowuje obecny – fragmentaryczny – stan wiedzy na temat struktury drugorzędowej gRNA Ty1, co jednocześnie stanowi uzasadnienie podjętych badań. Ostatnia część wprowadzenia stanowi zwięzły i jasny opis metod wykorzystywanych w określaniu struktury wirusowych cząsteczek RNA, jak również wyzwania i trudności na tym polu, zwłaszcza jeśli chodzi o różnice w strukturze wirusowego RNA w stanach *in virio*, *ex virio*, *in vivo* i *in vitro*. Rozdział ten stanowi przejrzyste, logiczne i spójne wprowadzenie w tematykę pracy i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki.

Omawiając publikacje wchodzące w skład rozprawy, Pani mgr Zawadzka rozpoczyna od prac eksperymentalnych. Jednak ja rozpoczęłam od zapoznania się z – prezentowaną jako ostatnią – pracą przeglądową, która zawiera wiedzę na temat metod badań struktur RNA oraz powiązań między strukturą a funkcją RNA. Moim zdaniem rozdział ten ułatwia późniejszą lekturę prac oryginalnych i mógłby być umieszczony w rozprawie jako pierwszy. W pracy nr 3 zatytułowanej „On the Way to Understanding the Interplay between the RNA Structure and Functions in Cells: A Genome-Wide Perspective” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* w roku 2020, według oświadczenia Doktorantka zebrała i przeanalizowała literaturę odnośnie wpływu struktury RNA na jego stabilność i degradację oraz na wiązanie białek. Zauważa, że wysokie ustrukturyzowanie RNA w regionie 5' UTR jest negatywnie skorelowane ze stabilnością transkryptów, podczas gdy struktury drugorzędowe w regionie 3' UTR powiązane są z dłuższym czasem półtrwania i ilością RNA w komórce. Powołuje się przy tym na badania w komórkach ludzkich, mysich, danio pręgowanego i drożdży. Kolejny podrozdział w tej publikacji opracowany przez Doktorantkę dotyczy ważnej kwestii dwustronnych zależności pomiędzy strukturą RNA a białkami wiążącymi RNA (RBP). Podkreśla kluczową rolę struktury drugorzędowej transkryptów w rozpoznawaniu i wiązaniu białek RBP, a z drugiej strony wpływ białek na modelowanie struktury RNA.

Poza częścią przygotowaną przez Doktorantkę, praca ta zawiera też omówienie metod określania struktury RNA i jej wpływu na translację oraz roli modyfikacji RNA w definiowaniu struktury transkryptów. Razem stanowi to wartościowe i kompleksowe opracowanie i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki. Badanie struktury drugorzędowej RNA i jej związku z funkcjami transkryptów to obecnie silnie eksplorowane pole, w którym wciąż jeszcze wiele pozostaje do odkrycia. Szczególnie zainteresowała mnie kwestia roli modyfikacji m<sup>6</sup>A w określaniu struktury RNA i nasunęła mi pytanie, czy będący przedmiotem badań Doktorantki gRNA Ty1 ulega takim modyfikacjom?

W eksperymentalnej pracy nr 1 „In vivo structure of the Ty1 retrotransposon RNA genome”, opublikowanej w *Nucleic Acids Research* w 2021 r., Doktorantka określiła drugorzędową strukturę Ty1 gRNA w ściśle zdefiniowanych warunkach *in vitro* i porównała ją do ustalonej przez współautorkę pracy struktury tegoż transpozonu *in vivo*, w komórkach drożdży. Pani mgr Zawadzka uzyskała wysokiej jakości dane SHAPE i ustaliła, że ponad połowa nukleotydów gRNA Ty1 wykazuje w warunkach *in vitro* niską reaktywność, co świadczy o ich zaangażowaniu w struktury drugorzędowe. Porównanie z wynikami dla struktury ustalonej *in vivo* wykazało, że Ty1 gRNA w warunkach *in vitro* wykazuje większe ustrukturyzowanie. Dodatkowo, tylko ok. połowa silnie ustrukturyzowanych regionów zidentyfikowanych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* pokrywała się między tymi stanami. Co ciekawe, tylko część znanych kluczowych sekwencji regulatorowych Ty1 gRNA wykazywała silne ustrukturyzowanie w obu stanach, podczas gdy inne charakteryzowały się stabilną strukturą jedynie *in vivo*.

Głównym osiągnięciem tej pracy jest określenie struktury kompletnej cząsteczki gRNA Ty1, która dotąd została poznana jedynie fragmentarycznie. Ponadto, analiza porównawcza struktury w warunkach *in vitro* i *in vivo* ma ogromne znaczenie, gdyż potwierdziła istotność warunków eksperymentalnych dla określania struktury drugorzędowej RNA. W związku z tymi wynikami, interesuje mnie opinia Doktorantki odnośnie celowości badania struktury RNA *in vitro*.

W pracy eksperymentalnej nr 2 „Cell compartment-specific folding of Ty1 long terminal repeat transposon RNA genome”, opublikowanej w czasopiśmie *Viruses* w 2022 r., Pani mgr Zawadzka wraz z zespołem pochyliła się nad kolejnym frapującym i ważnym aspektem gRNA Ty1, a mianowicie różnicami w jego strukturze pomiędzy kompartmentami komórkowymi. W pierwszym etapie Doktorantka wykazała – co nie było wcześniej stwierdzone – że używany do mapowania SHAPE odczynnik NMIA wydajnie modyfikuje RNA w jądrze drożdży. Jest to cenna informacja dla pracujących z tą techniką. Aby określić strukturę jądrowego gRNA Ty1, który wykazuje dominującą cytoplazmatyczną lokalizację, Doktorantka posłużyła się modelem drożdżowym, w którym ekspresji ulega zmutowana sekwencja Ty1. W tym modelu powstaje pełnej długości RNA Ty1, natomiast brak funkcjonalnego białka Gag, co wpływa na akumulację gRNA Ty1 w jądrze. Zastosowanie takiego podejścia Doktorantka przekonująco argumentuje trudnościami z wydajną izolacją integralnych jąder z komórek drożdży oraz niskim poziomem Ty1 w jądrze. Określona przez Doktorankę struktura jądrowego Ty1 gRNA została porównana ze zdefiniowaną we wcześniejszej pracy strukturą transpozonu w cytoplazmie oraz *in vitro*. Analiza ta wykazała 1) dużo mniejsze ustrukturyzowanie *in vivo* (czy to w jądrze czy w cytoplazmie) niż *in vitro*; 2) znaczące różnice w strukturze Ty1 między jądrem a cytoplazmą i generalnie niższy poziom ustrukturyzowania w jądrze. Jest to bardzo ciekawa i ważna praca, wskazująca na nowy, istotny aspekt we wzajemnych powiązaniach pomiędzy strukturą a funkcją RNA, dodatkowo determinowanych przez środowisko komórkowe. Ponieważ jest to pierwsza praca tego typu, niezmiernie ciekawe będzie zbadanie, czy jest to szerzej obserwowane zjawisko wśród innych wirusowych i retrotranspozonowych RNA.

Moje wątpliwości budziły analizy prezentowane w podrozdziale 3.5 publikacji nr 2. Wykazują one ważną rolę białka Gag w dimeryzacji i cyklizacji gRNA Ty1 oraz jego oddziaływaniu z  $tRNA_i^{Met}$ , co jest argumentowane brakiem takich oddziaływań w jądrze. Jednak rodzi się pytanie, czy nie jest to związane z brakiem białka Gag w stosowanym modelu eksperymentalnym. Jedynie na końcu w dyskusji jest odwołanie do pracy innych autorów, którzy wykazali, że białko Gag nie jest wykrywane w jądrze. To przemawia za poprawnością stosowanego modelu, jednak powinno być bardziej podkreślone w omówieniu publikacji.

W pracy wspomniane jest, że uzyskane wcześniej struktury Ty1 gRNA w cytoplazmie i *in vitro* zostały ponownie przeanalizowane przy pomocy uaktualnionej wersji programu SuperFold. Czy występowały znaczące różnice w wynikach analiz pomiędzy starszą a nowszą wersją programu?

W omówieniu publikacji, na str. 24 Doktorantka stwierdza, że model struktury jądrowego gRNA Ty1 uzyskany przy pomocy programu SuperFold wykazuje wysoką zgodność z eksperymentalnie uzyskanymi danymi. Jednak w poprzednim zdaniu wspomina, że dane eksperymentalne zostały wykorzystane do zbudowania tego modelu. Jest więc chyba oczywiste, że uzyskany na bazie danych eksperymentalnych model jest z nimi zgodny?

Rozprawa jest przygotowana starannie, jedynie z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne błędy:  
Interpunkcja – miejscami brakuje, a miejscami jest za dużo przecinków.

Str. 7 „loci” powinno być kursywą.

Str. 10 „rozpoznającemu kodon CUU”, a nie „rozpoznającego”.

Str. 15 „Niemniej” pisze się łącznie.

Str. 22 „wciąż” zamiast „wiąż”.

Podsumowując, Pani mgr Małgorzata Zawadzka w przedstawionym zbiorze prac dokonała kompleksowej analizy struktury drugorzędowej gRNA Ty1. Cele rozprawy zostały osiągnięte i dostarczyły istotnych, oryginalnych wyników. Dzięki połączeniu starannie zaplanowanych i wykonanych eksperymentów chemicznego mapowania struktury RNA oraz analiz bioinformatycznych, Doktorantka rzuciła nowe światło na zmiany w strukturze gRNA retrotranspozonu Ty1 w różnych warunkach eksperymentalnych oraz w zależności od środowiska komórkowego. Ma to implikacje nie tylko dla tego konkretnego RNA będącego przedmiotem rozprawy, ale bardziej ogólne dla tego typu badań i dostarcza cennych informacji dla naukowców zajmujących się strukturą RNA.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani mgr Małgorzaty Zawadzkiej zatytułowana „Charakterystyka struktury genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 w warunkach in vitro oraz na wybranych etapach replikacji w drożdżach” oraz publikacje naukowe będące jej podstawą stanowią istotne poszerzenie wiedzy na temat struktury RNA retroelementów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Małgorzaty Zawadzkiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowy charakter przedstawionych badań i analiz oraz nowatorstwo uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

A. Dzikiewicz-Krawczyk

Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk