



Poznań, 27 października 2022 r.

Dr hab. K. Dorota Raczyńska, prof. UAM
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Małgorzaty Zawadzkiej pt.: „Charakterystyka struktury genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 w warunkach *in vitro* oraz na wybranych etapach replikacji w drożdżach”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem pani prof. ICHB PAN, dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek, a zrealizowana w Zakładzie Struktury i Funkcji Retrotranspozonów, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Praca doktorska stanowi cykl trzech prac naukowych, opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, mianowicie:

- 1) A. Andrzejewska, M. Zawadzka, J. Gumna, D.J. Garfinkel, K. Pachulska-Wieczorek „In vivo structure of the Ty1 retrotransposon RNA genome” *Nucl. Acids Res.*, 2021; 49(5):2878-2893
- 2) M. Zawadzka, A. Andrzejewska-Romanowska, J. Gumna, D.J. Garfinkel, K. Pachulska-Wieczorek „Cell compartment-specific folding of the Ty1 LTR-retrotransposon RNA genome” *Viruses*, 2022; 14(9):2007
- 3) A. Andrzejewska*, M. Zawadzka*, K. Pachulska- Wieczorek „On the way to understanding the interplay between the RNA structure and functions in cells: A genome-wide perspective” *Int. J. Mol. Sci.*, 2020; 21(18):6670.

Tematyka badań koncentruje się wokół drugorzędowej struktury genomu RNA retrotranspozonu Ty1. Wykorzystując metodę SHAPE, Doktorantka po raz pierwszy otrzymała model *in vitro* Ty1 gRNA oraz model jądrowy tego RNA w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Modele te następnie przyrównała do scharakteryzowanych modeli otrzymanych w innych warunkach eksperymentalnych. W pracy opublikowanej w *Nucl. Acids Res.* Doktorantka przyrównuje strukturę drugorzędową Ty1 gRNA *in vitro* do struktury *in vivo*, opisanej w tej samej pracy, otrzymanej przez innego członka tego samego Zespołu badawczego. Z pracy opublikowanej w *Viruses* poznajemy podobieństwa i różnice struktur Ty1 gRNA z różnych etapów replikacji retrotranspozonu w komórce drożdżowej, tj. występujących w jądrze

strona 1 z 4



komórkowym, w cytoplazmie oraz w cząstkach wirusopodobnych. Podsumowując najważniejsze wyniki badań opublikowanych w obu pracach, Autorka wykazała, że struktura RNA retrotranspozonu Ty1 *in vivo* jest mniej stabilna i bardziej heterogenna niż struktura otrzymana *in vitro*, co może wynikać nie tylko z odmiennych warunków eksperymentalnych, ale także z tego, że Ty1 gRNA analizowany w warunkach *in vitro* nie podlega dimeryzacji i cyklizacji, które są ważnymi etapami retrotranspozycji wirusa. Z kolejnej pracy płyną kolejne wnioski, a mianowicie, Ty1 gRNA jest mniej ustrukturyzowany w komórce niż po spakowaniu do cząstek wirusopodobnych czy w warunkach *in vitro*. Pewne stabilne i wysoce ustrukturyzowane motywy RNA są zachowane pomiędzy kompartmentami komórki, jądrem komórkowym i cytoplazmą, przy czym wspólne pary zasad stanowią głównie oddziaływania krótkiego zasięgu. Niemniej, Ty1 gRNA jądrowy jest mniej ustrukturyzowany i bardziej heterogeny w porównaniu z RNA cytoplazmatycznym, wskazując na istotne rearanżacje strukturalne po eksporcie retrotranspozonu do cytoplazmy. Ponadto, badania Doktorantki potwierdziły kluczową rolę białka Gag dla interakcji RNA:RNA ważnych dla retrotranspozycji Ty1.

Praca przeglądowa to bardzo ciekawa publikacja przedstawiająca ówczesny stan wiedzy na temat wpływu różnych czynników komórkowych na zwijanie się RNA oraz wzajemną korelację pomiędzy strukturą i funkcją RNA w komórkach.

Badania Doktorantki mają wysoką wartość naukową i niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat wpływu „otoczenia” na strukturę RNA. W mojej opinii, na podkreślenie w tej rozprawie doktorskiej zasługuje też kilka innych kwestii. Mianowicie, badania Autorki potwierdziły wiele wcześniejszych obserwacji lub tez, dotyczących fałdowania RNA i faz cyklu replikacyjnego wirusów. Na przykład, formowanie oddziaływań krótkiego zasięgu zachodzi tuż po transkrypcji, cyklizacja Ty1 gRNA zachodzi w cytoplazmie, a białko Gag Ty1 odgrywa kluczową rolę w istotnych dla retrotranspozycji interakcjach RNA:RNA w komórce drożdżowej. Autorka wskazała istotne zmiany w strukturze Ty1 gRNA *in vitro* i *in vivo*. Autorka wykorzystała w eksperymentach zręczny model badawczy, w którym plazmid Ty1 syntetyzowany jest w komórkach tylko z plazmidu po indukcji. Z kolei, do badań struktury Ty1 gRNA w jądrze, Doktorantka wykorzystała model mutantu zalegającego w tym przedziale komórkowym, tym samym uniknęła wykonywania procedury separacji jądra komórkowego. Autorka poddała analizie długi fragment RNA, 5652 nt, czyli pełnej długości retrotranspozonu Ty1 występujący w komórce. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w powtarzalnych warunkach (metoda SHAPE z użyciem odczynnika modyfikującego NMIA).

Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr Małgorzata Zawadzka jest współautorką 6 publikacji, z czego 4 powstały w trakcie realizacji studiów doktoranckich. Uzyskane w trakcie doktoratu wyniki prezentowała na 5 konferencjach, w tym raz w formie wykładu.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich, których osiągnięcia opisane są w publikacjach naukowych. Oprócz spisu publikacji, znajdujemy „Wprowadzenie” do tematyki pracy doktorskiej, czyli tematyki elementów transpozonowych

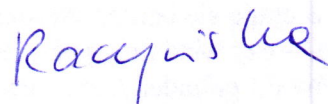
ze szczególnym uwzględnieniem retrotranspozonu Ty1. Autorka przybliżyła metody wykorzystywane do badań struktury RNA oraz podaje przykłady opublikowanych wyników badań nad strukturą RNA wirusów, która zmienia się w zależności od warunków eksperymentalnych czy kompartmentu komórkowego. Dane te są nieliczne, tym bardziej wartościowe stają się osiągnięcia samej Kandydatki, streszczone i dołączone w kolejnych rozdziałach przedstawiających cykl prac naukowych wchodzących w skład rozprawy. Badania zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Nucleic Acids Research*, *Viruses* i *International Journal of Molecular Sciences*, o wartościach współczynnika wpływu IF, odpowiednio, 19,160, 5,818 i 5,923. Są to czasopisma recenzowane, w związku z tym opublikowane w nich prace, w tym również prace mgr Małgorzaty Zawadzkiej, są wysokiej jakości. Warto jednak wspomnieć, że pozostała część rozprawy, rozdziały „Streszczenie”, „Wprowadzenie”, „Skrótowy opis prac”, są również napisane poprawną polszczyzną, z właściwym doбором słów i znajomością terminologii w zakresie dyscypliny. Autorka unika żargonu laboratoryjnego, zdania są jasne, wnioski sformułowane poprawnie. Zdarzają się naprawdę nieliczne błędy, przecinki w niewłaściwych miejscach, czy niezręczne sformułowania typu „powstałe cDNA importowane jest” zamiast „powstały cDNA importowany jest”, „oddziaływania typu Watsona-Cricka” zamiast „oddziaływania typu Watson-Crick”, które jednak nie umniejszają dużej wartości naukowej niniejszej pracy.

W trakcie czytania niniejszej rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, mianowicie:

1. Z opublikowanych prac wynika, że użyte w badaniach szczepy drożdżowe DG3408 i DG3412, nie zawierają w swoim genomie żadnych endogennych kopii elementów Ty1, a ekspresja Ty1 zachodzi z wielokopijnego plazmidu po indukcji. Czy Autorka jest pewna, że analizowała pulę jednego, egzogenego RNA Ty1? W komórkach drożdżowych typu dzikiego występuje więcej izoform transpozonu Ty1. Czy wiadomo, jaki jest stopień zróżnicowania/mutacji w DNA różnych kopii Ty1 i jak zmiany te odnoszą się do struktury RNA (5652 nt) opisanej w niniejszej pracy?
2. Jak opisuje Autorka, „tylko ok. 15% z transkryptów Ty1 jest poliadenylowanych. Mimo to, RNA Ty1 cechują się bardzo wysoką stabilnością i stanowią nawet do 0,8% wszystkich RNA w komórce” – czy wiadomo, jaki mechanizm odpowiada za kierowanie tylko niektórych z tych transkryptów do poliadenylacji? Jak wygląda dojrzewanie i koniec 3' niepoliadenylowanych form? Jakie czynniki/mechanizmy decydują o wysokiej stabilności RNA Ty1?
3. Wiadomo, że modyfikacje potranskrypcyjne mogą zmieniać strukturę RNA. W pracy przeglądowej sama Autorka porusza temat wpływu naturalnie występujących modyfikacji RNA, w tym N6-metyloadenozyny, na strukturę mRNA. W badaniach Doktorantki obserwujemy różnice w strukturze analizowanej w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Czy Doktorantka rozważała, że modyfikacje potranskrypcyjne mogą wpłynąć na strukturę RNA Ty1 w komórce? Czy coś wiadomo na temat modyfikacji potranskrypcyjnych, którym podlega Ty1, w jądrze lub w cytoplazmie? Jeśli tak, jaki mogą one mieć wpływ na strukturę RNA Ty1? Nie jest to dyskutowane w żadnej pracy eksperymentalnej.

4. Jak już wspomniałam, badania naukowe Doktorantki, przedstawione w niniejszej rozprawie, dostarczające wiedzy na temat wpływu „otoczenia” na strukturę RNA, w tym na różnicę w strukturze RNA otrzymanej w badaniach *in vitro* w porównaniu z tą *in vivo*, są bardzo wartościowe. Skoro jednak wiadomo, że środowisko, oddziaływania z białkami, z tRNA czy kompleksem rybosomu, zmienia konformację RNA, jaki jest, zdaniem Autorki, cel badań struktury RNA *in vitro*? Zwłaszcza, gdy badania mogą mieć wartość medyczną/terapeutyczną. Podkreślę, że moje pytanie wynika z czystej chęci przeprowadzenia dyskusji naukowej, absolutnie nie ma na celu podważania istoty badań, które Pani przeprowadziła.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Małgorzaty Zawadzkiej uważam za wartościową naukowo i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Badania naukowe Doktorantki niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat wpływu „otoczenia” na strukturę RNA, o czym pamiętać powinni wszyscy badacze RNA. Jej wyniki wypełniają również lukę w wiedzy dotyczącej zmian strukturalnych zachodzących podczas przemieszczania się RNA pomiędzy różnymi przedziałami w komórce. 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. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową osiągnięć mgr Małgorzaty Zawadzkiej, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.



Katarzyna Dorota Raczyńska