

Warszawa, 03-12-2021

Dr hab. Roman Szczęsny

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Pawła Głodowicza “Wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych”.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Pawła Głodowicza została wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska.

Mitochondria są półautonomicznymi organellami posiadającymi własny genom o ograniczonej pojemności informacyjnej. Pozostałe białka, w tym białka niezbędne do utrzymania i ekspresji genomu mitochondrialnego, kodowane są w genomie jądrowym. Pomimo wielu lat badań funkcjonowanie mitochondrialnych systemów genetycznych nie zostało w pełni poznane. Znaczącą przeszkodą w poznaniu funkcjonowania mitochondrialnego systemu genetycznego roślin i ssaków jest brak możliwości ukierunkowanej modyfikacji genomu mitochondrialnego oraz brak możliwości specyficznego obniżenia ekspresji poszczególnych genów mitochondrialnych. Z tego powodu prowadzenie badań funkcjonalnych genów mitochondrialnych jest ograniczone.

U człowieka mutacje w DNA mitochondrialnym mogą prowadzić do chorób. Opracowanie technik ukierunkowanej modyfikacji genomu mitochondrialnego człowieka lub metody dostarczania do mitochondriów funkcjonalnego RNA stanowiłoby znaczący przełom w zaproponowaniu strategii terapeutycznych chorób mitochondrialnych warunkowanych mutacjami w genomie mitochondrialnym.

Badania przeprowadzone przez mgr. Pawła Głodowicza są kontynuacją prac zespołu nad opracowaniem skutecznej metody dostarczania kwasów nukleinowych do mitochondriów. We wcześniejszych pracach zespołu opracowano podstawowe założenia systemu umożliwiającego import RNA do mitochondriów komórek roślinnych oraz opisano jego aktywność po imporcie do organelli (Val i wsp. NAR, 2011, PMID: 21768127). Autor rozprawy postanowił sprawdzić czy tak opracowany system może być wykorzystany do badania funkcji genów mitochondrialnych u roślin wybierając jako przykład geny *matR* oraz *mttB*. Jednocześnie, jako jeden z celów pracy przyjął sprawdzenie czy system opracowany i przetestowany w komórkach roślinnych może być wykorzystany do modyfikowania ekspresji genów mitochondrialnych w ludzkich komórkach hodowanych *in vitro*.

Cel rozprawy uważam jako ambitny i niezwykle istotny dla poznania biologii mitochondriów. Warto podkreślić, że wiele zespołów badawczych na świecie próbowało lub próbuje opracować metodę importu kwasów nukleinowych do mitochondriów człowieka oraz metodę ukierunkowanej modyfikacji ludzkiego genomu mitochondrialnego. Dotychczas żadna z metod nie znalazła powszechnego zastosowania.

Wykorzystując podstawowe metody biologii molekularnej, transformacji roślin oraz podstawowe metody biologii komórki mgr. Głodowicz zrealizował cele badań przedstawione w rozprawie. Wykorzystując rybozym HH oraz cząsteczkę przypominającą tRNA (ang. tRNA-like) autor skonstruował model badawczy do badań funkcjonalnych roślinnych genów *matR* i *mttB*. W przypadku genu *matR* mgr. Głodowicz wykazał, że produkt tego genu – maturaaza R, uczestniczy w składaniu mitochondrialnego pre-mRNA. Wyniki tych badań zostały opublikowane w uznanym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Co ważne, w przypadku genu *matR* Autor rozszerzył wcześniejsze badania prowadzone w pracowni i wykazał możliwość zastosowania antysensownego RNA do regulacji genów mitochondrialnych *in vivo*. Badania nad genem *mttB* doprowadziły do opracowania modelu badawczego, który może stanowić bardzo cenny materiał do przeprowadzenia badań funkcjonalnych w przyszłości.

Za bardzo interesujące uznaję badania mgr. Głodowicza nad opracowaniem systemu do regulowanego obniżenia ekspresji genów kodowanych w genomie mitochondrialnym człowieka. Przeprowadzając analizę bioinformatyczną Autor zaproponował cząsteczki podobne do tRNA pochodzące z wirusa mozaiki tytoniu i wirusa mozaiki stokłosa jako potencjalne czynniki kierujące RNA z cytoplazmy do mitochondriów człowieka. W kolejnym etapie sprawdził czy cząsteczki te mogą być importowane *in vitro* do mitochondriów lub mitoplastów wyizolowanych z komórek ludzkich. Dane uzyskane przez Autora sugerują, że cząsteczki takie mogą być importowane do macierzy mitochondrialnej. Jednakże, w przedstawionej pracy nie opisano metody izolacji mitochondriów, nie opisano procedury przygotowania mitoplastów, a także nie przedstawiono kontroli czystości uzyskanych organelli. Czy istnieje możliwość, że RNA badany w tym oznaczeniu jest chroniony przed nukleazami poprzez jego związanie do innych organelli niż mitochondria? Czy zastosowana w tym eksperymencie mieszanina nukleaz może w pełni zdegradować badany, ustrukturalizowany RNA? Czy przeprowadzono odpowiednie reakcje kontrolne? Który „sygnał” przedstawiony na Ryc. 36 przyjęto jako 100%?

W kolejnym etapie badań mgr. Głodowicz stworzył transgeny kodujące cząsteczki podobne do tRNA w fuzji z rybozymbem HDV (zapewniającym właściwe formowanie końca 3' cząsteczki tRNA-like) oraz rybozymbem HH zaprojektowanym do „przecięcia” mitochondrialnego transkryptu „ATP6” (właściwie ATP8/6). Wykorzystując uzyskane konstrukcje DNA oraz system Flp-In T-Rex Autor uzyskał stabilne linie komórek ludzkich (293, HepG2), które w regulowany sposób wyrażały transgen wprowadzony do genomu jądrowego. Wykorzystując uzyskane stabilne linie komórek ludzkich Autor przeprowadził badania mające na celu sprawdzenie czy ekspresja wprowadzonego transgeny wpływa na poziom mRNA ATP8/6. Mgr. Głodowicz stwierdził, że ekspresja rybozymbu HH skierowanego przeciwko mRNA ATP8/6 prowadzi do obniżenia poziomu tego mRNA, ale nie innych badanych mRNA mitochondrialnych. Co więcej, stwierdzono znaczące obniżenie poziomu białka ATP6 już po 24 godzinach od indukcji ekspresji rybozymbu (Ryc. 54). Biorąc pod uwagę własne doświadczenie z przeciwciałami mającymi rozpoznawać białka kodowane w ludzkim mtDNA chciałbym zapytać czy próbowano potwierdzić (przynajmniej do pewnego stopnia) specyficzność stosowanych przeciwciał np. przez zahamowanie translacji mitochondrialnej. Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty wskazują na specyficzną aktywność wprowadzonego rybozymbu względem mRNA ATP8/6.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, wyniki, dyskusję, materiały i metody oraz spis literatury. Wstęp został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Praca napisana jest w sposób ciekawy, jednakże, niektóre rozdziały są nadmiernie rozbudowane, a dodatkowa korekta językowa (np. trujnukleotyd, strona 146), usunięcie zwrotów żargonowych (np. „poziom ekspresji wektora” w opisach osi wykresów) mogłoby znacząco poprawić jakość rozprawy. Autor odwołuje się do bogatej listy piśmiennictwa, obejmującej 422 pozycje, jednakże wiele cytowanych prac występuje na liście przynajmniej dwa razy (przykładowo 156/157, 197/199, 196/198, 302/304, 306/307, 357/359). Z drugiej strony niektóre pozycje cytowane w tekście nie są umieszczone w spisie piśmiennictwa (przykładowo Gueven, 2013 ze strony 38). O ile zastosowanie niektórych zwrotów nie wpływa na zrozumienie i odbiór merytoryczny rozprawy, to niektóre zwroty nie mogą pozostać bez komentarza:

- Autor wielokrotnie używa zwrotów sugerujących, że system, który opracowuje modyfikuje genom mitochondrialny. Czy rybozym HH modyfikuje genom mitochondrialny? Czy wyniki przedstawione w pracy pozwalają stwierdzić, że import rybozemu HH do mitochondriów powoduje modyfikację genomu?
- Bakterie nie posiadają mitochondriów (strona 23).
- Rozdział 3.2.1.2. - czy badano transport/import konstruktów do mitochondriów?
- Rozdział 3.2.5 - czy badano integralność błony mitochondrialnej, czy wprowadzano wektor do mitochondriów?

Rozdział „Wstęp” stanowi bardzo szerokie wprowadzenie do tematyki badań. Rozdział ten dostarcza wielu ciekawych informacji. Jednocześnie uważam, że pominięcie niektórych zagadnień (np. rozdział 1.2.1 pt. „Genom mitochondrialny protistów”) pozwoliłoby skoncentrować uwagę na głównej tematyce badań. Nie mam pewności co Autor rozprawy rozumie przez zwrot, że „geny leżą na nici lekkiej lub ciężkiej mtDNA” (opis Ryc. 1), warto jednak zwrócić uwagę, że w literaturze bardzo często błędnie definiowane są nici kodująca i matrycowa genów obecnych w genomie mitochondrialnym człowieka. Nie mam też pewności jakie czynniki przedstawiono w Tab.1 – czynniki transkrypcyjne, czy też czynniki związane ze składaniem pre-mRNA.

W rozdziale „Materiały i metody” Autor podjął się szczegółowego opisu stosowanych metod. Przedstawione opisy są poprawne, z tym, że w przekazanym do recenzji egzemplarzu pracy nie odnalazłem opisu metod, o których wspominałem powyżej. Nie odnalazłem również informacji na temat przeciwciał stosowanych do wykrywania białka ATP6. Istnieje rozbieżność pomiędzy informacją na temat słupków błędów przedstawionych na wykresach - wg. rozdziału 6.29 słupki reprezentują odchylenie standardowe podczas gdy opisy wykresów wskazują błąd standardowy średniej.

W rozdziale „Wyniki” Autor przedstawił rezultaty przeprowadzonych eksperymentów, które zostały podsumowane powyżej. W tym miejscu chciałbym poprosić Autora o komentarz/spekulacje do następujących zagadnień:

- Dlaczego obniżenie poziomu analizowanych transkryptów (matR, mttB, ATP8/6) jest niekompletne i w większości przypadków nie przekracza 50%. Jakie czynniki mogą wpływać na obniżenie skuteczności działania rybozemu HH?
- Czym można wytłumaczyć różnice w wydajności obniżenia białka matR pomiędzy matRz1 i matRz2 (Ryc. 20), podczas gdy obniżenie poziomu transkryptu matR jest podobne w przypadku matRz1 i matRz2 (Ryc. 19)?

- Czy Autor mógłby zaproponować mechanizm, który prowadzi do obniżenia poziomu transkryptu matR w przypadku zastosowania AS-ON, zwłaszcza, że największy efekt na poziom transkryptu matR jest obserwowany gdy poziom AS-ON uległ obniżeniu?

Autor w ciekawy sposób opisuje wyniki swoich badań w rozdziale „Dyskusja”. Ten rozdział rozprawy potwierdza znajomość literatury tematu oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych. Co ważne, w dyskusji zostały uwzględnione prace, które kwestionują istnienie transportu RNA do mitochondriów komórek ludzkich (np. Gammage, 2018). Autor słusznie zwraca uwagę, że zagadnienie importu kwasów nukleinowych do mitochondriów wymaga dalszych badań.

Część wyników zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, co podkreśla znaczenie omawianych w recenzji badań. Mgr inż. Paweł Głodowicz jest współautorem jeszcze czterech innych publikacji. W żadnej z publikacji nie jest autorem wiodącym. Dorobek naukowy Kandydata oceniam jako dobry.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. inż. Pawła Głodowicza oceniam pozytywnie. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, którego pełne opracowanie miałyby duże znaczenia dla innych badań dotyczących biologii mitochondriów oraz potencjalnego rozwoju strategii terapeutycznej chorób mitochondrialnych. Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych badań oraz znaczenie dla rozwoju dziedziny stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. inż. Pawła Głodowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Roman Szczyński