

Prof. dr hab. Jacek Jemielity
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 11.09.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej
p.t. „Charakterystyka dynamiki strukturalnej i funkcjonalnej genomów RNA aktywnych
retrotranspozonów LTR”**

Retrotranspozony to mutagenne jednostki zdolne do przemieszczania się w obrębie genomu szeroko rozpowszechnione w genomach eukariotycznych. Pomimo ich potencjalnie szkodliwych skutków, retrotranspozony pełnią ważne funkcje genomowe, a także przyczyniają się do adaptacji genomu w zmieniającym się środowisku. Retrotranspozony są również zaawansowanymi narzędziami do retrospektywnych i prospektywnych badań *in vivo*. Ze względu na ich zdolność do integracji i modyfikacji genomów, retrotranspozony wniosły wyjątkowy wkład w analizę filogenetyczną i inżynierię genetyczną. W miarę jak lepiej rozumiemy interakcje retrotranspozonów z genomem, jesteśmy w stanie lepiej wykorzystywać aktywność retrotranspozonów jako narzędzia badawcze i terapeutyczne *in vivo*. Nowe osiągnięcia technologiczne rzucają nowe światło na znaczenie retrotranspozonami dla genomów różnych organizmów, sugerując ich różnorodną rolę w ewolucji, rozwoju organizmów i ich wpływ na różnorodne stany chorobowe.

Praca mgr inż. Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej wykonana pod kierunkiem Prof. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek w Zakładzie Struktury i Funkcji RNA w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu dotyczy badań struktury genomowego RNA aktywnych retrotranspozonów LTR (long terminal repeat). W badaniach swych wykorzystywała modelowe retrotransozomy Ty1 i Ty3 naturalnie występujące w genomie drożdży (*Saccharomyces servisiae*).

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr inż. Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej została przygotowana w formie cyklu 3 publikacji opatrzonych 27 stronicowym komentarzem w którym zacytowanych jest 107 pozycji literaturowych. Na zbiór prac, składa się praca przeglądowa (*International Journal of Molecular Sciences* IF = 4.9); oraz 2 oryginalne prace eksperymentalne obydwie opublikowane w prestiżowym *Nucleic Acids Research* (IF = 16.6). Należy podkreślić, że we wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszą autorką. Cykl prac składających się na rozprawę doktorską rozpoczyna praca zatytułowana „On the Way to Understanding the Interplay between the RNA Structure and Functions in Cells: A Genome-Wide Perspective” opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* wydawnictwa MDPI. Choć czasopisma tego wydawcy w środowisku naukowym cieszą się nienajlepszą opinią, co ma czasem związek z jakością procesu ewaluacji tam publikowanych artykułów, to wydaje się, że w przypadku pracy przeglądowej ma to mniej istotne znaczenie. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat zależności pomiędzy strukturą RNA *in vivo*, a cechami istotnymi biologicznie takimi jak translacja, stabilność i degradacją mRNA, oddziaływania z białkami i potranskrypcyjne modyfikacje RNA. Należy podkreślić, że to zagadnienie skomplikowane, ze względu na dużą dynamikę strukturalną cząsteczek RNA. A wnioski na temat tej zależności są możliwe dzięki rozwojowi coraz bardziej precyzyjnych metod pozwalających na badania transkryptomów u różnych organizmów, w tym ssaków, drożdży, roślin i bakterii. Jestem pewien, że przygotowanie tego manuskryptu i zapoznanie z cytowaną w nim literaturą było znakomitym wstępem do realizacji pracy eksperymentalnej.

Na część eksperymentalną rozprawy składają się dwie prace opublikowane w *Nucleic Acids Research*. Jest to znakomite czasopismo, doskonale mi znane zarówno od strony autora jak i recenzenta i wiem, że przestrzegane są w nim najwyższe standardy, jeśli chodzi o procesy recenzencki. To w dużym stopniu zwalnia mnie z obowiązku weryfikacji poprawności zastosowanych metod oraz adekwatności wyciąganych konkluzji w świetle danych eksperymentalnych, gdyż jestem przekonany, że zostało to zrobione przez najwyższej klasy specjalistów, recenzujących ten manuskrypt i bardzo doświadczonych edytorów *Nucleic Acids Research*. Skupie się więc na osiągnięciach Doktorantki i współpracowników opisanych we wspomnianych publikacjach. Z oświadczeń Doktorantki oraz Promotorki jednoznacznie wynika wiodący wkład mgr Andrzejewskiej-Romańskiej w przeprowadzeniu badań eksperymentalnych, analizie wyników, przygotowaniu materiału do publikacji a także istotny wkład w planowanie badań. Pierwsza ze wspomnianych prac jest zatytułowana „*In vivo* structure of the Ty1 retrotransposon RNA genome”. W pracy przedstawiono pierwszy model struktury drugorzędowej RNA w całym genomie dla LTR-retrotranspozonu w żywych komórkach. Autorzy wykorzystując sondowanie SHAPE, zbadali strukturę drugorzędową genomu RNA retrotranspozonu drożdżowego Ty1 w jego natywnym stanie *in vivo* oraz w określonych warunkach *in vitro*. Metoda SHAPE bazuje na reagentach chemicznych specyficznie acylujących grupę 2' hydroksylową

nukleotydów RNA w zależności od odpowiedniej konformacji/dostępności nukleotydów uwarunkowanych strukturą drugorzędową RNA. W swych badaniach Doktorantka stosowała bezwodnik kwasu N-metyloizotawowego (NMIA). Trochę zabrakło mi uzasadnienia dla zastosowania tego właśnie czynnika i prosiłbym o odniesienie do tej kwestii podczas publicznej obrony. Analiza porównawcza wyników wskazuje na silny wpływ środowiska komórkowego na strukturę RNA Ty1 (5652 nt). In vivo, genomowy RNA Ty1 jest znacznie mniej ustrukturyzowany i bardziej dynamiczny, ale zachowuje specyficzne, dobrze ustrukturyzowane regiony zawierające regulatorowe elementy cis. Rybosomy uczestniczą w rozwijaniu i przebudowie RNA Ty1, a hamowanie inicjacji translacji stabilizuje strukturę RNA Ty1. Badania potwierdziły podwójną rolę genomowego RNA Ty1 jako matrycy do syntezy białek i odwrotnej transkrypcji. Badanie to przyczynia się również do lepszego zrozumienia, w jaki sposób złożony, wielofunkcyjny genom RNA składa się in vivo. W drugiej pracy zatytułowanej "Mapping the structural landscape of the yeast Ty3 retrotransposon RNA genome" Doktorantka wraz ze współautorami wykorzystała nowszą metodę chemicznego mapowania SHAPE-MaP tym razem do ustalenia struktury drugorzędowej RNA drożdżowego retrotranspozonu Ty3 (5052 nt) w natywnym stanie in vivo oraz w warunkach pozakomórkowych. Tym razem korzystając z innego czynnika acylującego NAI (imidazolid kwasu 2-metylonikotynowego). Wyniki badań wskazują na dynamikę strukturalną genomowego RNA Ty3 i ustrukturyzowany rdzeń, tworzący się niezależnie od środowiska komórkowego. W oparciu o szczegółową mapę struktury Ty3 gRNA, scharakteryzowano kontekst strukturalny sekwencji elementów regulatorowych cis zaangażowanych w odwrotną transkrypcję i przesunięcie ramki odczytu. Ponadto zidentyfikowano nową sekwencję funkcjonalną jako potencjalny inicjator dimeryzacji Ty3 gRNA. Strukturę Ty3 porównano z ewolucyjnie powiązаныmi z dwoma innymi retroelementami, takimi jak HIV-1 i Ty1, wskazując na podobieństwa między nimi i różnice.

Jeśli chodzi o sam komentarz do publikacji, to jest on dość oszczędny lecz moim zdaniem wystarczający. Autorka w klarowny sposób wprowadza czytelnika najpierw przedstawiając obiekty badawcze, czyli retrotranspozony drożdżowe Ty1 i Ty3. Następnie przedstawia metodologię badań struktury RNA, opisując metody SHAPE, analizę bioinformatyczną danych eksperymentalnych, by w końcu opisać interpretacje modeli struktury drugorzędowej RNA. Na koniec opisuje wyzwania w badaniach strukturalnych RNA zestawiając to z sytuacją w badaniach struktury innych ważnych makrocząseczek jakimi są białka. Generalnie komentarz przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Trochę zabrakło mi w nim bardziej ogólnego obrazu, pokazującego znaczenie retrotranspozonów i wynikającej z tego motywacji do ich badania. Może podczas publicznej obrony Doktorantka zechce nieco szerzej podzielić się swoimi przemyśleniami na ten temat.

Moim zdaniem rozprawa wnosi bardzo istotny wkład w metodologię badań nad strukturą drugorzędową RNA in vivo, a w szczególności badań nad powiązaniem między strukturą, a

własnościami RNA drożdżowych retrotranspozonów LTR. Dorobek publikacyjny Doktorantki stanowi łącznie 6 publikacji naukowych w czasopismach o obiegu międzynarodowym, z czego dwie prace eksperymentalne będące podstawą ubiegania się Pani mgr Andrzejewskiej-Romanowskiej o stopień doktora, opublikowane w *Nucleic Acids Research*, są zdecydowanie najważniejszym efektem jej pracy badawczej. Wyniki swoich prac Doktorantka prezentowała na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych, głównie w postaci prezentacji posterowych, choć ma również w dorobku jedną prezentację ustną. Doktorantka za swe osiągnięcia naukowe była nagradzana, co odzwierciedlają liczne nagrody i wyróżnienia (w tym m. in. stypendia START FNP oraz L'Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki). Warto również podkreślić, że kieruje ona projektem PRELUDIUM NCN oraz była wykonawcą w kilku projektach kierowanych przez innych badaczy.

W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, że 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 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter przedstawionych badań objawiający się wykorzystaniem metod badania struktury genomów RNA aktywnych retrotranspozonów LTR i powiązania jej z chechami funkcjonalnymi RNA wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani magister inżynier Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej.