

Prof. dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i

Komórkowej w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej  
"Charakterystyka dynamiki strukturalnej i funkcjonalnej genomów RNA aktywnych  
retrotranspozonów LTR"**

Tematem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej są badania retrotranspozonów z klasy LTR (long-terminal repeat). Celem pracy było poznanie struktury RNA tych transpozonów *in vivo* (w komórce). W przedstawionych badaniach zastosowano nowoczesne metody chemicznego próbkowania struktury RNA w połączeniu z analizami bioinformatycznymi.

W skład przedstawionej rozprawy wchodzi trzy publikacje:

- Artykuł przeglądowy Andrzejewska A. et al. *Int. J. Mol. Sci*, 2020.
- Praca doświadczalna Andrzejewska A. et al. *Nucleic Acids Res.*, 2021, opisująca strukturę genomowego RNA retrolementu Ty1.
- Praca doświadczalna Andrzejewska A. et al. *Nucleic Acids Res.*, 2024, opisująca strukturę genomowego RNA retrolementu Ty3.

We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i wniosła wiodący wkład w ich powstanie.

Ocena przedstawionej rozprawy jest w mojej opinii formalnością. Doktorantka opublikowała dwie znakomite prace *Nucleic Acids Research*, które jest obecnie wiodącym pismem w dziedzinie szeroko pojętych badań kwasów nukleinowych. Mgr Andrzejewska-Romanowska kieruje grantem NCN Preludium. Jest też laureatką prestiżowych stypendiów FNP START i L'Oréal-UNESCO dla Kobiet i Nauki. Lektura prac wchodzących w skład rozprawy potwierdza bardzo wysoką jakość badań prowadzonych przez Doktorantkę.

Struktura RNA to bardzo aktualny temat i aktywne pole badań, które stawia przed badaczami wiele wyzwań. Z jednej strony dysponujemy stosunkowo niewielką liczbą określonych doświadczalnie struktur przestrzennych RNA. Z drugiej strony, w odróżnieniu od białek, struktura RNA *in vivo*, ze względu na wpływ środowiska komórki, może znacząco

różnić się od struktury *in vitro* określonej metodami biologii strukturalnej. Dlatego ważne jest opracowywanie nowych metod określenia struktury RNA w jego naturalnym środowisku, czyli w komórce. Wiodącą rolę pełnią tu metody, które łączą użycie substancji chemicznych reagujących różnicowo z grupami 2'-OH RNA w zależności od stopnia ustrukturyzowania odpowiedniego nukleotydu oraz przepisывania tak zmodyfikowanego RNA do DNA z użyciem odwrotnych transkryptaz. W ostatnich latach rozwój tych metod przyniósł przełom w naszym rozumieniu struktury RNA *in vivo*. Doktorantka z sukcesem wdrożyła te metody, w tym ich najnowsze warianty, i zastosowała je do badania struktury genomowego RNA retrotranspozonów. Są to mobilne elementy genetyczne, w namnażaniu których etapem przejściowym jest transkrypt RNA. Aktywność tych transpozonów ma fundamentalne znaczenie w ewolucji, ponieważ ich namnażanie jest jednym z najważniejszych procesów kształtujących architekturę genomów eukariotycznych. Dodatkowo fundamentalne znaczenie biologiczne retroelementów Ty3 polega na tym że to z nich wyewoluowały retrowirusy, np. ludzki wirus niedoboru odporności (HIV). Zrozumienie jak zaszła ta ewolucja jest niezmiernie ciekawe. Warto podkreślić, że RNA retrotranspozonów to bardzo dobrze dobrany obiekt badań. Replikacja tych elementów genetycznych wymaga bowiem powstawania konkretnych elementów funkcjonalnych i regulatorowych w RNA o określonej strukturze. Podsumowując, Doktorantka przeprowadziła, nowoczesne, aktualne i interesujące badania opisane w dwóch bardzo dobrych publikacjach.

Wstęp rozprawy jest dobrze i klarownie napisany i umiejętnie przedstawia zarówno biologię retranspozonów, najważniejsze elementy struktury ich transkryptów, jak i metodologię badania struktury RNA – mapowanie chemiczne i metody obliczeniowe. Dobrze przygotowane ryciny pomagają w zrozumieniu tekstu wstępu.

Pierwszy z przedstawionych artykułów to praca przeglądowa. Opisuje ona dostępne dane dotyczące całogenomowych badań struktury RNA. Napisanie tego artykułu musiało się wiązać z dużym nakładem pracy, ponieważ dane są bardzo złożone, powstały przy użyciu różnych metod doświadczalnych i mogą mieć niespójne konkluzje. Dlatego ich zestawienie, porównanie i próba znalezienia uniwersalnych elementów jest cennym wkładem do dziedziny. Jest to wartościowa praca, która mogła ukazać się w czasopiśmie innej oficyny wydawniczej.

Pierwsza praca doświadczalna (Andrzejewska A et al. *Nucleic Acids Res*, 2021) opisuje badania drożdżowego retrotranspozonu Ty1 w tym pierwszą charakterystykę strukturalną całego genomowego RNA tego transpozonu *in vivo*. Uznanie budzi dobre zaplanowanie badań, w których porównano strukturę RNA Ty1 transkrybowanego *in vitro* (bez czynników komórkowych) oraz *in vivo* po ekspresji w starannie dobranym organizmie modelowym (szczep *S. paradoxus*, który nie posiada własnych retrotranspozonów Ty1). Do tego badania przeprowadzono w warunkach zahamowanej translacji. Od strony metodologicznej cenne w tej pracy jest to, że porównano trzy różne odczynniki modyfikujące grupy 2'-OH. Szczegółowy opis wyników zostanie przedstawiony podczas obrony, jednak główna konkluzja pracy jest taka, że genomowe RNA elementy Ty1 jest mniej ustrukturyzowane *in vivo*. Jest to zgodne z tym, że białka wiążące RNA oraz maszynie odczytujące RNA mogą rozluźniać jego strukturę. Do maszynarii tych należą rybosomy, ponieważ w warunkach zahamowanej translacji RNA Ty1 jest bardziej ustrukturyzowane. Co jednak ważne, elementy, których struktura jest niezbędna to namnażanie retrotranspozonu, takie jak sekwencje odpowiedzialne np. za dimeryzację, cyrkularyzację i pakowanie RNA do cząsteczek wirusopodobnych oraz hybrydyzację tRNA, które działa jako starter zachowują swoją strukturę *in vivo*. Opisująca publikacja jest profesjonalnie przygotowana i zawiera bardzo dużo wyników uzyskanych z zastosowaniem różnych podejść: doświadczalnych i obliczeniowych. W mojej opinii jest ona ciekawa i ważna dla badań struktury RNA i biologii retrotranspozonów.

Druga praca opisuje badania struktury RNA retroelementu Ty3. Warto podkreślić, że grafika związana z tym artykułem została zamieszczona na okładce odpowiedniego numeru *Nucleic Acids Research*. W pracy tej zastosowano nieco inną metodologię. Zamiast analizy fragmentów DNA, które powstają na skutek zatrzymania się odwrotnej transkryptazy na modyfikowanym nukleotydzie za pomocą elektroforezy kapilarnej, wykorzystano zdolność odwrotnej transkryptazy do odczytywania i kopiowania modyfikowanych nukleotydów. To często wiąże się z wprowadzeniem mutacji do cDNA, które można wykryć metodami sekwencjonowania nowej generacji. Dodatkowo, zamiast RNA produkowanego *in vitro* jako próbki referencyjnej użyto RNA uzyskanego *ex vivo* po renaturacji. Wyniki pokazały, że stosunkowo niewielkie różnice strukturze RNA Ty3 między warunkami *in vivo* i *ex vivo*. Istotne dla replikacji transpozonu elementy takie jak miejsce wiązania tRNA, które służy jako

starter w odwrotnej transkrypcji czy kontakty dimeryzacji RNA, w tym nowe zidentyfikowane w tej pracy, miały zachowaną strukturę niezależnie od warunków. Cenną częścią pracy jest porównanie wyników mapowania struktury dla RNA z Ty1, Ty3 i wirusa HIV-1. Tę pracę, podobnie jak poprzednią, oceniam bardzo wysoko.

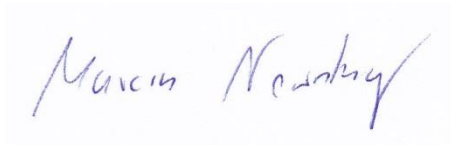
Podczas obrony chciałbym prosić Doktorantkę do odniesienia się do następujących kwestii:

Próbkowanie struktur RNA Ty1 i Ty3 przeprowadzono przy użyciu nieco innych podejść eksperymentalnych. Jak może to wpływać na miarodajność porównań wyników uzyskanych dla różnych RNA? Na przykład RNA Ty1 było badane po transkrypcji *in vitro* a RNA Ty3 po ekstrakcji z komórek. W tym drugim przypadku w RNA mogły zostać wprowadzone modyfikacje chemiczne wpływające na stabilność struktury. Jest to o tyle ważne, że wyniki w przedstawionych pracach wskazują, że RNA Ty1 wykazuje większe różnice struktury między warunkami *in vitro* i *in vivo* niż RNA Ty3 między warunkami *ex vivo* i *in vivo*.

RNA transpozonu przechodzi drogę od transkrypcji przez eksport z jądra, włączanie do retrosomów i wreszcie pakowanie do cząsteczek wirusopodobnych (VLP). W obu pracach pojawiają się odniesienia do tego, że procesy te mogą wpływać na strukturę RNA. Chciałbym prosić o całościowe przedyskutowanie tej kwestii i oraz omówienie możliwych podejść doświadczalnych, które mogłyby pozwolić na zbadanie zmiany struktury RNA podczas jego drogi od transkrypcji do VLP.

Podsumowując, opisane badania są na wysokim poziomie merytorycznym, powstały przy użyciu nowoczesnych metod i dostarczyły istotnych informacji o strukturze genomowego RNA retrotranspozonów Ty3 i Ty1. W mojej opinii 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 Pani mgr Angeliki Andrzejewskiej-Romanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę jakość badań i sukces publikacyjny, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Marcin Nowotny