

Warszawa, 27.10.2022

dr hab. Rafał Tomecki
Pracownia Dojrzewania i Degradacji RNA
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Festiny Zawadzkiej
“Charakterystyka struktury genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 w warunkach
in vitro oraz na wybranych etapach replikacji w drożdżach”.**

Ogólne informacje na temat ocenianej rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Festiny Zawadzkiej została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji Retrotranspozonów pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek, prof. IChB PAN.

Tematyka ocenianej pracy jest związana z analizą molekularnych podstaw replikacji retrotranspozonów LTR i dotyczy w szczególności zmian struktury RNA retrotranspozonów związanych z przemieszczaniem się tych cząsteczek między różnymi przedziałami wewnątrzkomórkowymi w trakcie cyklu replikacyjnego.

Główne cele projektu rozprawy doktorskiej zostały stosunkowo precyzyjnie sformułowane, a zakładały porównanie struktur genomowego RNA (gRNA) retrotranspozonu Ty1 drożdży *Saccharomyces*, które ta cząsteczka przyjmuje *in vitro* oraz *in vivo*, przy czym w drugim przypadku Autorka postanowiła przeanalizować podobieństwa i różnice pomiędzy gRNA Ty1 obecnym w jądrze komórkowym, cząstkach wirusopodobnych oraz w cytoplazmie *S. cerevisiae*. Wspomniane cele szczegółowe zostały osiągnięte.

Trzon rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Festiny Zawadzkiej stanowią trzy publikacje – dwie oryginalne i jedna przeglądowa, które ukazały się w latach 2020-2022 w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych w bazach danych Scopus i Journal Citation Reports. Jedna z prac oryginalnych, w których Kandydatka do stopnia naukowego jest drugą autorką, została opublikowana w prestiżowym *Nucleic Acids Research*. Druga praca oryginalna oraz praca przeglądowa ukazały się natomiast w niselekcyjnych czasopismach kontrowersyjnego wydawcy MDPI (odpowiednio: *Viruses* oraz *International Journal of Molecular Sciences*). Mgr Małgorzata Festina Zawadzka jest pierwszą autorką publikacji w *Viruses* oraz pierwszą równorzędną autorką (wraz z mgr Angeliką Andrzejewską) pracy opublikowanej w *Int. J. Mol. Sci.* Sumaryczny współczynnik wpływu czasopism, w których zostały opublikowane wspomniane prace (zgodnie z rokiem publikacji) wynosi niemal 31, a liczba punktów ministerialnych – 440. Z czysto parametrycznego czy bibliometrycznego punktu widzenia wartości te należy uznać za bardzo dobre w świetle ubiegania się o stopień naukowy doktora. Nieco gorzej wygląda kwestia cytowań opublikowanych prac, szczególnie eksperymentalnych – praca z *Nucleic Acids Research* nie była dotąd cytowana przez autorów spoza IChB PAN, podobnie jak praca z czasopisma *Viruses*. Oczywiście mam świadomość, że publikacje te (w szczególności druga) są obecne w obiegu naukowym od niedawna, więc aspekt cytowalności powinien w przyszłości ulec poprawie. Praca przeglądowa z *Int. J. Mol. Sci.* była



natomiast cytowana 6-krotnie przez autorów z innych laboratoriów od momentu opublikowania dwa lata temu.

Cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską jest spójny tematycznie. W eksperymentalnej pracy nr 1 (*Nucleic Acids Research*, 2021) mgr Zawadzka brała udział w porównaniu struktur gRNA Ty1 *in vitro* oraz *in vivo*. W eksperymentalnej publikacji nr 2 (*Viruses*, 2022), w przypadku której wkład mgr Zawadzkiej był najbardziej znaczący, porównane zostały struktury gRNA Ty1 obecnego w różnych kompartmentach. Praca przeglądowa nr 3 (*International Journal of Molecular Sciences*, 2020) porusza wybrane zagadnienia związane z zależnościami między strukturą a funkcją cząsteczek RNA. Trzeba jednak zauważyć, że ta ostatnia praca ukazała się przed publikacjami oryginalnymi, a zatem nie zawiera krytycznego omówienia wyników własnych Autorki w kontekście badań prowadzonych w innych laboratoriach. Nie znajduję tam nawet zbyt wielu informacji na temat struktury i funkcji retrotranspozonów. Nie mam jednak wątpliwości, że udział w przygotowaniu takiego opracowania pozwolił Autorce przynajmniej w stopniu ogólnym zapoznać się z problematyką wpływu zmian w strukturze RNA na jego funkcje i właściwości (np. stabilność i wykorzystanie jako matrycy do translacji, podatność na modyfikacje i oddziaływanie z białkami wiążącymi RNA). Wpłynął również zapewne na świadomość Autorki dotyczącą możliwych różnic w strukturze transkryptów, w zależności od przedziału wewnątrzkomórkowego w którym cząsteczki RNA się znajdują, co miało kluczowe znaczenie z punktu widzenia formułowania pytań biologicznych dotyczących gRNA Ty1, na które Autorka starała się odpowiedzieć w pracach o charakterze doświadczalnym.

Ocena części rozprawy napisanej w języku polskim

Poza kopiami wspomnianych prac Autorka zamieściła na początku rozprawy krótki wstęp teoretyczny i przedstawiła cel naukowy prac badawczych oraz opisała w syntetyczny sposób wyniki uzyskane w poszczególnych publikacjach w języku polskim, odwołując się do ponad 80 pozycji literaturowych. Zgodnie z wymogami dotyczącymi postępowań w sprawie nadania stopnia doktora wg trybu studiów III stopnia w których uczestniczyła mgr Zawadzka, na końcu rozprawy zostały zamieszczone zgodne oświadczenia Doktorantki oraz Promotorki dotyczące udziału Kandydatki do stopnia naukowego w przygotowaniu poszczególnych publikacji.

We wprowadzeniu, które w miarę dobrze przedstawia zastany stan wiedzy poprzedzający realizację projektu pracy doktorskiej mgr Zawadzkiej, Autorka na początku krótko omówiła historię badań nad elementami transpozycyjnymi, mechanizmy ich propagacji w genomie oraz klasyfikację transpozonów. W moim odczuciu pomocna byłaby ilustracja przedstawiająca różne typy transpozonów, różnice między transpozonami DNA i retrotranspozonami i sposoby ich rozprzestrzeniania się w genomie. W kolejnym podrozdziale Doktorantka zaprezentowała porównanie (w tym graficzne) organizacji genetycznej retroelementów należących wraz z infekcyjnymi retrowirusami do tej samej jednostki taksonomicznej – rzędu *Orterviales*, zwracając uwagę na fakt, że retrotranspozony LTR w odróżnieniu od retrowirusów nie zawierają genu *env*, w następstwie czego cykl replikacji retrotranspozonów LTR odbywa się w obrębie jednej komórki. Dalej omówiony został ogólny mechanizm replikacji retrotranspozonów LTR, po czym w kolejnym podrozdziale Autorka scharakteryzowała dokładniej retrotranspozon Ty1, stanowiący przedmiot prowadzonych przez nią badań, oraz jego cykl replikacyjny. Omówiona została struktura powtórzeń LTR na poziomie DNA, scharakteryzowano transkrypt Ty1, przedyskutowano kwestię obecności kotranskrypcyjnych modyfikacji jego końców oraz wspomniano o mechanizmie eksportu z jądra do cytoplazmy. Wyjaśniono pojęcie retrosomów (ciałek T), wskazując je jako miejsca akumulacji RNA Ty1 i kodowanych przez niego białek przed formowaniem cząstek wirusopodobnych (*ang.* VLPs – virus-like particles). Dalej Doktorantka opisała



poliproteiny powstające na matrycy RNA Ty1, mechanizm molekularny prowadzący do syntezy białka fuzyjnego Gag-Pol, sposób formowania VLPs i ich skład oraz do kolejności proteolitycznych cięć, których efektem jest powstanie dojrzałych białek niezbędnych do prawidłowego przebiegu retrotranspozycji. Ta część wprowadzenia kończy się omówieniem mechanizmu retrotranspozycji i wzmianką o niskiej częstotliwości tego procesu. Opisowi towarzyszy informatywna rycina, tym niemniej mam pewną uwagę krytyczną dotyczącą jej dużego podobieństwa do rysunku zaprezentowanego w publikacji Pachulska i wsp., *Viruses* 2016, przy czym mgr Zawadzka nie podała pierwotnego źródła ilustracji w legendzie do Rysunku 3 i nie wskazała, że jest on zmodyfikowaną wersją opublikowanej wcześniej ilustracji. Dalej Autorka rozprawy omówiła rolę, jaką pełni białko Gag w różnych zjawiskach umożliwiających retrotranspozycję, w tym wspomniała o promowaniu oddziaływań RNA:RNA odpowiedzialnych za dimeryzację i cyklizację gRNA Ty1. Zwróciła jednocześnie uwagę na brak informacji *in vivo*, które dowodziłyby udziału Gag w tych interakcjach, a które zostały uzupełnione w wyniku badań przedstawionych w doświadczałnej pracy nr 2 wchodzącej w skład ocenianej rozprawy. Kolejny rozdział Wprowadzenia został poświęcony szczegółom fragmentów struktury gRNA Ty1 scharakteryzowanym we wcześniejszych badaniach i uwypukleniu funkcji elementów odpowiedzialnych za dimeryzację, cyklizację, przyłączanie startera do odwrotnej transkrypcji oraz formowanie pseudowęzła. Muszę wspomnieć również o Rysunku 4, który przedstawia między innymi sposób parowania startera tRNA^{Met} z sekwencjami PBS, Box0 i Box1 na końcu 5' gRNA Ty1 – tutaj Autorka odwołała się co prawda do publikacji Purzycka i wsp., *Nucleic Acids Research* 2013, ale napisała, że rysunek został przygotowany na podstawie ryciny nr 3 z tej publikacji, podczas gdy w rzeczywistości został z niej praktycznie skopiowany. Ostatni rozdział wprowadzenia koncentruje się na technicznych aspektach podejść metodologicznych do badania struktur RNA, głównie wariacjach metody SHAPE i stosowanych odczynnikach, przy czym Doktorantka podaje kilka przykładów literaturowych wykorzystania tego typu technik, w tym stanowiących kamienie milowe w badaniach strukturalnych RNA. W ostatnim akapicie Autorka starała się uargumentować zasadność podjęcia przez siebie tematyki badawczej związanej z charakterystyką struktur gRNA Ty1 o różnym pochodzeniu, co zasadniczo się Jej udało, natomiast sposób zakończenia tego akapitu, rozdziału i całego Wprowadzenia pozostawia niedosyt. Spodziewałbym się chociażby jednego zdania podsumowania, w którym mogłoby zostać zawarte stwierdzenie, że porównanie struktur gRNA Ty1 z różnych etapów cyklu replikacyjnego jest niezwykle uzasadnione, biorąc pod uwagę informacje literaturowe dotyczące różnych organizmów modelowych, wskazujące na brak klarownych reguł dotyczących różnic pomiędzy cząsteczkami RNA obecnymi w różnych przedziałach wewnątrzkomórkowych.

Pomimo niewielkiej objętości tekstu w języku polskim Autorka rozprawy nie ustrzegła się błędów edytorskich i językowych. Ponadto znaki interpunkcyjne, w szczególności przecinki, stosowane są najczęściej zupełnie przypadkowo. Nie rzutuje to znacząco na jakość rozprawy, ale świadczy o pewnym braku dbałości o szczegóły, którym powinien cechować się kandydat do stopnia naukowego. Z obowiązku recenzenta podaję poniżej wybrane przykłady uchybień i niezręcznych sformułowań zawartych w pracy:

- str. 5 i in.: szyk wyrazów w zwrocie „Ty1 gRNA” jest kalką z języka angielskiego (powinno być „gRNA Ty1”);
- str. 5: struktury makrocząsteczek raczej się nie „otrzymuje”, lecz „bada”, „opisuje”, względnie „rozwiązuje”;
- str. 5: prace przeglądowe nie przyczyniają się do lepszego „rozumienia” zjawisk biologicznych przez ich autorów, lecz do „systematyzowania” opisywanej tematyki;
- str. 7: sądzę, że Autorka mogła pokusić się o odwołanie do artykułów opublikowanych w bardziej rozpoznawalnych periodykach niż *Methods in Molecular Biology* czy *Postępy Biochemii* w odniesieniu do



stwierdzenia dotyczącego istotnej roli elementów transpozycyjnych w tworzeniu genomów wirusów i organizmów;

- str. 8: sformułowanie „cykl życiowy wirusa” jest niefortunne z uwagi na fakt, że wirusy nie są organizmami i nie wykazują funkcji życiowych; rozumiem, że jest to również następstwo bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego; uważam, że bardziej właściwe byłoby jednak pisanie o „cyklu replikacyjnym” czy „propagacji”, ewentualnie ujmowanie zwrotu „cykl życiowy” w cudzysłów;

- str. 9: „Procesy te różnią się jednak w szczegółach u różnych retroelementów” – bardziej właściwe byłoby napisanie „dla różnych retroelementów” albo „w przypadku różnych retroelementów”;

- str. 10: „Pauza umożliwia znajdującemu się w miejscu P tRNA^{UAG}, rozpoznającego (...)” – powinno być „rozpoznającemu”;

- str. 10, 11 i in.: szyk wyrazów w zwrocie „polimeraza RNA II/III” jest również kalką z języka angielskiego (powinno być „polimeraza II/III RNA”);

- str. 11 i in.: kwas nukleinowy (RNA/DNA) w języku polskim jest rodzaju męskiego; w wielu miejscach w rozprawie końcówki przymiotników są natomiast charakterystyczne dla rodzaju nijakiego (np. „(...) a powstałe cDNA wraz z integrasą importowane jest do jądra komórkowego (...)” – powinno być „powstały, importowany”);

- str. 12: słowo „homologia” wskazuje na pokrewieństwo ewolucyjne sekwencji i nie powinno się go używać w zestawieniu z przymiotnikiem „niski”; powinno się mówić raczej o „niskim podobieństwie sekwencji”;

- str. 12: „transkrypty Ty1 akumulują w jądrze komórkowym” – powinno być „transkrypty Ty1 akumulują się w jądrze komórkowym”;

- str. 12: „(...) Gag Ty1 wykazuje aktywność opiekuńczą względem do kwasów nukleinowych (...)” – powinno być „względem kwasów nukleinowych”; ponadto, słowo „aktywność” kojarzy się dość jednoznacznie z enzymami; w tym przypadku bardziej trafne byłoby sformułowanie „Gag Ty1 pełni funkcję opiekuńczą”;

- str. 15: tytuł rozdziału 3.6. *Badanie struktury wirusowych RNA* sugeruje, że opisywane przez Autorkę metody wykorzystuje się wyłącznie do badania struktury RNA wirusów;

- str. 15 i in.: „(...) zaowocowały powstaniem szeregu reagentów modyfikujących (...)”, „(...) w przeciwieństwie jednak do reagentów SHAPE (...)” – po polsku powinno się pisać raczej o „związkach” lub „odczynnikach”;

- str. 15: „Nie mniej jednak (...)” – powinno być „Niemniej jednak (...)”;

- str. 15: „bezwodnik 1-metylo-7-nitroizatowego (1M7)” – powinno być „bezwodnik kwasu 1-metylo-7-nitroizatowego (1M7)”;

- str. 15: „(...) metodami stosowanymi do badania strukturalnych RNA w żywych komórkach, umożliwiając badania struktur zarówno indywidualnych cząsteczek RNA (...)” – konstrukcja zdania powinna być bardziej dopracowana;

- str. 16: „gRNA wirusa żółtaczk (HCV)” – powinno być „gRNA wirusa żółtaczk typu C (HCV)”;

- str. 22: „(...) podróż z miejsca powstania w jądrze komórkowym do docelowego miejsca przeznaczenia (...)” – pleonazm; powinno być „miejsca docelowego” albo „miejsca przeznaczenia”;

- str. 22: „(...) wiedza dotycząca zmian strukturalnych zachodzących podczas cyklu życiowego RNA i jego podróży w komórce jest wiaż znikoma.” – powinno być „wciąż”;

- str. 23: „Przeprowadzone przez nas analizy wskazują, że różnice strukturalne w Ty1 RNA nie wynikają z aktywności rybosomów podczas translacji – brak wzrostu korelacji między stanem jądrowym i cytoplazmatycznym po zablokowaniu translacji” – w drugiej części zdania brakuje czasownika;

- str. 24: „(...) do predykcji modelu struktury (...)” – powinno być „do predykcji struktury” albo „do stworzenia modelu struktury”;

- str. 24: „(...) ilość nukleotydów (...)” – powinno być „liczba nukleotydów”;



- str. 27: „N⁶-methyloadenozyny” – powinno być „N⁶-metyloadenozyny”;
- str. 28: wykaz skrótów jest niekompletny – brakuje m.in. rozwinięcia skrótów MFE i 1M7; ponadto bardziej właściwie byłoby umieszczenie wykazu na początku tekstu, tak jak ma to zazwyczaj miejsce w przypadku publikacji w czasopismach naukowych.

Omówienie osiągnięć Autorki w poszczególnych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Praca nr 1 (oryginalna). Angelika Andrzejewska, Małgorzata Zawadzka, Julita Gumna, David J. Garfinkel, Katarzyna Pachulska-Wieczorek (2021) *In vivo structure of the Ty1 retrotransposon RNA genome. Nucleic Acids Research* 49(5): 2878-2893.

Głównym celem tej pracy eksperymentalnej było scharakteryzowanie różnic pomiędzy strukturą drugorzędową gRNA retrotranspozonu Ty1, którą ta cząsteczka przyjmuje *in vivo*, lokalizując się w głównej mierze w cytoplazmie komórek *Saccharomyces paradoxus* w porównaniu z precyzyjnie ustalonymi warunkami *in vitro*. Metodyka analiz strukturalnych w tej, a także w drugiej pracy oryginalnej, opierała się zasadniczo na wykorzystaniu techniki SHAPE (*ang. selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) w połączeniu z elektroforezą kapilarną (CE) produktów reakcji. Sekcja *Author contributions* wskazuje, że udział mgr Zawadzkiej w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu (wraz z dr Julitą Gumną) próbkowania strukturalnego opartego o SHAPE dla gRNA Ty1 otrzymanego po transkrypcji *in vitro*. Mgr Zawadzka przeprowadziła też (wraz z mgr Angeliką Andrzejewską) wstępne, poboczne doświadczenia oparte o SHAPE-CE, których celem było porównanie reaktywności różnych odczynników do SHAPE *in vivo* w bakterii *Escherichia coli* w porównaniu do drożdży, co było ważne w kontekście prowadzonych równolegle eksperymentów typu SHAPE dla endogennego, cytoplazmatycznego, gRNA Ty1. Doktorantka uczestniczyła też w analizie danych, interpretacji wyników oraz pisaniu manuskryptu. Tak opisany wkład mgr Zawadzkiej jest zgodny z Jej własnym oświadczeniem oraz z oświadczeniem promotora zamieszczonym w rozprawie i nie budzi żadnych wątpliwości.

Uzyskane przez mgr Zawadzką dane SHAPE dla cząsteczki gRNA Ty1 *in vitro* były wysokiej jakości. Doktorantka ustaliła, że większość (~90%) nukleotydów cząsteczki RNA o długości powyżej 5600 nt może uczestniczyć w oddziaływaniach bardzo stabilnych lub o pośredniej stabilności, świadczących o współistnieniu alternatywnych form konformacyjnych, natomiast jedynie około 9% nukleotydów charakteryzowało się wysoką reaktywnością SHAPE, typową dla regionów jednoliciowych. Co istotne, rozkłady reaktywności SHAPE obserwowane dla gRNA Ty1 *in vitro* oraz *in vivo* różniły się znacząco od siebie. W szczególności, Autorka rozprawy wykazała, że około dwukrotnie większa liczba nukleotydów bierze udział w tworzeniu stabilnych struktur w warunkach *in vitro* w porównaniu z sytuacją obserwowaną *in vivo*. Pozwoliło to wyciągnąć wniosek, że gRNA Ty1 jest bardziej stabilny i bardziej homogeny strukturalnie *in vitro* niż *in vivo*. Otrzymane dane liczbowe umożliwiły zaproponowanie struktury drugorzędowej gRNA Ty1 o najniższej energii swobodnej oraz stwierdzenie, że prawie połowa wszystkich nukleotydów jest zaangażowana w tworzenie par zasad *in vitro*. Porównanie z wyznaczoną równolegle strukturą gRNA Ty1 *in vivo* ujawniło niemal 50% różnic między parami zasad tworzącymi się w obrębie analizowanej cząsteczki RNA w tych dwóch różnych warunkach. Zawartość par zasad o wysokim prawdopodobieństwie była znacząco większa w przypadku struktury *in vitro* (68%) niż *in vivo* (38%). Spośród tych par zasad, jedynie 39% było wspólnych dla obydwu struktur i odpowiadały one przede wszystkim oddziaływaniom o krótkim zasięgu. Na tej podstawie



Autorka zasugerowała, że liczba współwystępujących alternatywnych konformacji gRNA Ty1 jest większa w warunkach *in vivo* w porównaniu z sytuacją obserwowaną *in vitro*.

Cenną obserwacją świadczącą o wnikliwości Doktorantki było stwierdzenie obecności 11 regionów charakteryzujących się wysokim poziomem stabilności strukturalnej w warunkach *in vitro*, spośród których 5 pokrywało się w części z fragmentami silnie ustrukturyzowanymi zidentyfikowanymi dla gRNA Ty1 *in vivo*. Co ciekawe, najdłuższy z nich, obecny na końcu 5' cząsteczki obejmował m.in. elementy regulatorowe PAL1/PAL2 oraz CYC5 istotne z punktu widzenia dimeryzacji i cyklizacji gRNA Ty1 *in vivo* oraz sekwencje PBS, BOX0 i BOX1, stanowiące miejsca przyłączania się tRNA^{Met}, pełniące funkcje startera do odwrotnej transkrypcji. Wszystkie te sekwencje regulatorowe są kluczowe dla prawidłowego przebiegu retrotranspozycji. Mimo obecności tych ustrukturyzowanych regionów w modelu opisanym dla gRNA Ty1 *in vitro*, Doktorantka nie znalazła dowodów na dimeryzację czy cyklizację badanej cząsteczki w tych warunkach. Podobnie, nie zauważyła tworzenia motywu pseudowęzła typu H, o którym wiadomo, że wpływa pozytywnie na wydajność retrotranspozycji.

Praca nr 2 (oryginalna). Małgorzata Zawadzka, Angelika Andrzejewska-Romanowska, Julita Gumna, David J. Garfinkel, Katarzyna Pachulska-Wieczorek (2022) **Cell compartment-specific folding of the Ty1 LTR-retrotransposon RNA genome.** *Viruses* 14(9): 2007.

Głównym zamierzeniem tej pracy oryginalnej było porównanie struktury gRNA Ty1 obecnego w jądrze komórkowym do ustalonych w toku wcześniejszych badań struktur *in vivo* tych transkryptów występujących głównie w cytoplazmie oraz w cząstkach wirusopodobnych, a także do struktury charakterystycznej dla gRNA Ty1 uzyskanego w transkrypcji *in vitro*. Uważam, że pomimo znacznie niższej rangi czasopisma, w którym zostały opublikowane wyniki tych analiz w porównaniu z poprzednią pracą oryginalną, stanowią one z biologicznego punktu widzenia bardziej istotne osiągnięcie Doktorantki, gdyż można je uznać za nowy wgląd w molekularny mechanizm replikacji retrotranspozonu. Udział mgr Zawadzkiej w powstaniu tej pracy obejmował przeprowadzenie wstępnych testów wydajności modyfikacji jądrowych RNA w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* przez odczynniki do SHAPE na przykładzie U1 snRNA, wykonanie próbkowania strukturalnego opartego o SHAPE dla gRNA Ty1 akumulującego się w jądrze komórkowym, analizę i interpretację danych wraz ze współautorami oraz pisanie manuskryptu. Pewne wątpliwości może budzić jedynie oświadczenie o współudziale w planowaniu przebiegu prac badawczych – w sekcji *Author contributions* Doktorantka nie jest wymieniona obok Promotorki, dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek oraz dr Julity Gumnej jako współtwórczyni koncepcji badań. Z drugiej strony, oświadczenia Doktorantki oraz Promotorki zamieszczone w rozprawie doktorskiej są pod tym względem zgodne, więc zapewne świadczy to jedynie o drobnym niedopatrzeniu podczas konstruowania sekcji *Author contributions* w publikacji. Niezależnie od tego, wiodący udział mgr Zawadzkiej w różnych etapach powstawania tej pracy oryginalnej jest bezdyskusyjny, czego odzwierciedleniem jest samodzielna pozycja pierwszego autora.

Ustalenie struktury jądrowego gRNA Ty1 było możliwe dzięki wykorzystaniu unikatowego szczepu *Saccharomyces paradoxus*, w którym – z uwagi na pewne modyfikacje sekwencji nukleotydowej – wyrażany z plazmidu gRNA Ty1 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym, a w przypadku przedostania się do cytoplazmy ulega degradacji za pośrednictwem cytoplazmatycznego systemu kontroli jakości mRNA eliminującego transkrypty zawierające przedwczesny kodon terminacyjny (*ang.* NMD – nonsense-mediated decay). Podobnie, jak w przypadku cząsteczki gRNA Ty1 *in vitro*, jakość danych strukturalnych dla jądrowego



gRNA Ty1 była bardzo dobra. Rozkład reaktywności SHAPE przy mapowaniu z wykorzystaniem bezwodnika kwasu 1-metyloizatoinoowego (NMIA) był podobny pomiędzy jądrowym i cytoplazmatycznym gRNA Ty1, a jednocześnie w obydwu przypadkach odbiegał od tego, który obserwowano w przypadku gRNA Ty1 *in vitro* albo upakowanego do VLPs. Niezależnie od przedziału komórkowego, w którym znajdowała się większość cząsteczek gRNA Ty1 *in vivo*, wartości reaktywności SHAPE były wyższe niż dla transkryptu syntetycznego, co sugerowało generalnie mniejszy stopień ustrukturyzowania gRNA Ty1 w komórce w porównaniu z warunkami *in vitro*. Dalsze analizy porównawcze wykonane przez Doktorantkę doprowadziły do wykazania znaczących różnic w reaktywności SHAPE dla gRNA Ty1 cytoplazmatycznego, upakowanego do VLPs oraz jądrowego. Te wyniki uważam za szczególnie ważne i wartościowe z naukowego punktu widzenia, gdyż świadczą o tym, że gRNA Ty1 ulega istotnym rearanżacjom strukturalnym w trakcie cyklu replikacyjnego, podczas przechodzenia przez różne przedziały wewnątrzkomórkowe. Ponadto, Autorka rozprawy wskazała 11 stosunkowo rozległych obszarów (o długości powyżej 100 nukleotydów), które cechowała największa zmienność reaktywności SHAPE między gRNA Ty1 w jądrze komórkowym w porównaniu do transkryptów cytoplazmatycznych. Z uwagi na fakt, że zmienność ta dotyczyła około 20% cząsteczki, Autorka wywnioskowała, że proces zwijania czy też fałdowania tego RNA zachodzi w odmienny sposób w obydwu kompartmentach. Jako element dyskusji tych wyników mgr Zawadzka zauważyła, że różnice wynikające ze specyficznych modyfikacji nukleotydów lub wiązania się w różny sposób z białkami albo oddziaływania z innymi zestawami białek powinny ujawniać się raczej w postaci bardziej subtelnych zmian o charakterze lokalnym.

Podobnie jak w przypadku pierwszej pracy oryginalnej, Autorka zaproponowała na podstawie danych liczbowych model struktury drugorzędowej gRNA Ty1 o najniższej energii swobodnej. Porównanie struktur gRNA Ty1 pochodzących z różnych przedziałów komórkowych oraz syntetycznych ujawniło, że pomimo podobnej liczby nukleotydów biorących udział w tworzeniu par zasad w różnych warunkach, około 40% par zasad obecnych w strukturze jądrowego gRNA Ty1 ulega przemodelowaniu w następstwie jego eksportu do cytoplazmy – dotyczyło to głównie oddziaływań dalekiego zasięgu, podczas gdy pary zasad występujące zarówno w jądrowej i cytoplazmatycznej formie gRNA Ty1 reprezentowały przede wszystkim interakcje wewnątrzcząsteczkowe o krótszym zasięgu. Zawartość par zasad o wysokim prawdopodobieństwie była niższa w przewidzianej strukturze jądrowego gRNA Ty1 (~30%) niż dla cytoplazmatycznego (~40%) czy syntetycznego gRNA Ty1 (~65%), a spadek udziału procentowego takich par w pierwszym przypadku dotyczył w dużej mierze oddziaływań dalekiego zasięgu.

Kolejnym krokiem analogicznym do wykonanego w poprzedniej publikacji eksperymentalnej było wskazanie rejonów struktury jądrowego gRNA Ty1 o szczególnie wysokim stopniu organizacji strukturalnej. Spośród 11 takich zidentyfikowanych obszarów, większość z nich pokrywała się ze strukturą cytoplazmatycznego gRNA Ty1, a 4 także ze strukturą syntetycznego transkryptu, przy czym najdłuższy znajdował się na końcu 5', obejmującym elementy istotne funkcjonalnie z punktu widzenia przebiegu retrotranspozycji. Jednocześnie Autorka zauważyła, że jądrowy gRNA Ty1 może przyjmować większą liczbę współistniejących konformacji w porównaniu z cytoplazmatycznym odpowiednikiem.

Za szczególnie interesujący i wartościowy uważam ostatni rozdział wyników tej publikacji, w którym Doktorantka próbowała ustalić rolę białka Gag w promowaniu oddziaływań RNA-RNA kluczowych dla retrotranspozycji. W celu realizacji tego przedsięwzięcia, mgr Zawadzka porównywała wyniki doświadczeń opartych o mapowanie SHAPE dla struktur gRNA Ty1 otrzymanych: 1) dla jądrowego gRNA ze szczepu drożdży pozbawionych białka Gag; 2) w cząstkach wirusopodobnych, gdzie wiadomo, że dochodzi do dimeryzacji i cyklizacji gRNA oraz przyłączenia startera do odwrotnej transkrypcji w postaci tRNA^{Met} do trójczłonowego



miejsca obejmującego motywy PBS, BOX0 i BOX1; 3) dla syntetycznego transkryptu, o którym na podstawie wcześniej uzyskanych wyników wiadomo było, że tego typu oddziaływania nie występują. Te analizy porównawcze doprowadziły do stwierdzenia, że w przypadku nieobecności białka Gag w profilu reaktywności SHAPE dla jądrowego gRNA Ty1 nie obserwuje się danych, które świadczyłyby o cyklizacji, dimeryzacji, przyłączaniu startera do odwrotnej transkrypcji czy powstawaniu pseudowęzła w pobliżu końca 5' gRNA Ty1. Tym samym Doktorantka wykazała, że brak białka Gag hamuje formowanie interakcji RNA-RNA niezbędnych dla właściwego przebiegu retrotranspozycji.

Praca nr 3 (przeglądowa). Angelika Andrzejewska*, Małgorzata Zawadzka*, Katarzyna Pachulska- Wieczorek (2020) **On the way to understanding the interplay between the RNA structure and functions in cells: a genome-wide perspective.** *International Journal of Molecular Sciences* 21(18): 6670.

Tematem tej pracy, w której mgr Zawadzka występuje na pierwszym miejscu listy autorów wraz z mgr Angeliką Andrzejewską, był przegląd informacji dotyczących wpływu struktury RNA na funkcje transkryptów w komórkach. Nie mam zastrzeżeń do oświadczeń Doktorantki co do jej udziału w powstaniu tej publikacji – obejmował on analizę literatury, współuczestnictwo w pisaniu tekstu, przygotowaniu rycin oraz tabel.

Autorki zwróciły uwagę na ważną rolę badań strukturalnych RNA *in vivo*, w tym szczególnie w skali całogenomowej, w kontekście analizy funkcji, jaką różne transkrypty pełnią w komórce oraz udziału tych cząsteczek w różnych procesach, takich jak oddziaływania z maszyną translacyjną, białkami wiążącymi RNA, czy wpływu struktury na podatność na degradację (kwestia stabilności RNA) i pewne modyfikacje chemiczne. Na wstępie omówiono metodologię badań struktury RNA *in vivo*, ze zwróceniem uwagi na ograniczenia zastosowania niektórych odczynników do modyfikacji transkryptów oraz podkreśleniem potencjału wykorzystania niektórych technik w skali globalnej, wynikającego z wdrożenia wysokoprzepustowego sekwencjonowania jako końcowego etapu przygotowania próbki do dalszych analiz. Dalej przedstawione zostały wzajemne złożone zależności między strukturą RNA i translacją, gdzie z jednej strony udział rybosomu może remodelować fragmenty struktury transkryptu kodującego białka, a z drugiej struktury drugorzędowe w mRNA mogą wpływać na wydajność translokacji rybosomu podczas syntezy białka. Omówiono różne przykłady wpływu struktur obecnych zarówno w regionach nieulegających translacji (UTR), jak i w otwartych ramach odczytu na wydajność translacji. W podobny sposób współautorki pracy odniosły się do wpływu struktur, które mogą tworzyć się w różnych regionach mRNA, na stabilność transkryptów, zwracając na końcu uwagę, że nie tylko struktura drugorzędowa, ale nawet sama sekwencja cząsteczki może wpływać na ich skłonność do ulegania degradacji ze względu na zawartość mniej lub bardziej optymalnych kodonów w sekwencjach kodujących. W kolejnym rozdziale poruszono zagadnienia związane ze zróżnicowanym potencjałem cząsteczek RNA do interakcji z białkami wiążącymi RNA w zależności od stopnia komplikacji struktury transkryptu. Za szczególnie cenne uważam podkreślenie roli nowego mechanizmu regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym, związanego z obserwacją, że silnie ustrukturyzowane cząsteczki RNA wykazują tendencję do oddziaływania z większą liczbą białek i często kodują białka regulatorowe uczestniczące w dużej liczbie procesów komórkowych, czy zaangażowane w większą liczbę sieci oddziaływań międzybiałkowych w porównaniu z transkryptami, których struktura przestrzenna jest mniej skomplikowana. Ostatnim zagadnieniem przedstawionym w tej pracy była kwestia współzależności modyfikacji posttranskrypcyjnych i struktury RNA, przedyskutowana głównie na przykładzie N⁶-metyloadenozyny powszechnie obecnej w eukariotycznych mRNA. Zwrócono uwagę, że obecność



metylowanej adenozynej może pełnić funkcję przełącznika strukturalnego, powołując się na porównania struktur ustalonych w oparciu o SHAPE dla transkryptów zawierających zmodyfikowane adenozyne w porównaniu z kontrolnymi cząsteczkami RNA, gdzie obecność modyfikacji skutkowała tendencją do destabilizacji struktur drugorzędowych. Wskazano także przykłady wzajemnych powiązań pomiędzy statusem metylacji adenozynej w określonych obszarach RNA, strukturą tych rejonów i zdolnością do oddziaływania z białkami wiążącymi RNA.

Opracowanie uważam za cenne, choć może nie na poziomie eksperckim, bo mam wrażenie, że niektóre fragmenty zostały potraktowane dość powierzchownie i bez odpowiedniej dozy krytycyzmu i dyskusji własnej. Z pewnością praca może okazać się wartościowa z punktu widzenia badaczy i studentów spoza ścisłej dziedziny badań strukturalnych RNA, którzy poszukują ogólnych i aktualnych informacji na temat związku między strukturą transkryptów i różnymi procesami, w których one uczestniczą.

Ocena innych aspektów działalności Doktorantki

Poza trzema publikacjami stanowiącymi rozprawę doktorską, mgr Zawadzka jest również współautorką trzech innych prac. Uczestniczyła także jako wykonawca w trzech projektach finansowanych ze środków NCN oraz prezentowała wyniki swoich badań w formie plakatów i wystąpień ustnych na 10 konferencjach, głównie o zasięgu krajowym, ale także w trakcie najważniejszej konferencji dotyczącej szeroko pojętej biologii RNA tj. *RNA meeting*, która w 2019 roku odbyła się w Krakowie. Mimo że z ustawowego punktu widzenia te aspekty aktywności kandydata do stopnia naukowego nie muszą być oceniane, moja opinia na temat tych ważnych obszarów działalności młodego pracownika nauki jest jednoznacznie pozytywna i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do dalszej pracy naukowej.

Zagadnienia i pytania do dyskusji podczas publicznej obrony rozprawy

W trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej poproszę Kandydatkę do stopnia naukowego o ustosunkowanie się do następujących pytań i zagadnień:

- 1) Omawiając pracę opublikowaną w *Nucleic Acids Research* Autorka konkluduje, że wciąż dostępnych jest niewiele analiz porównawczych dla innych wirusowych, a także komórkowych cząsteczek RNA. Rozumiem, że tym samym Doktorantka uważa, że porównywanie struktur transkryptów uzyskanych w wyniku syntezy *in vitro* z ich odpowiednikami wyizolowanymi z komórek czy też poszczególnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, w których te RNA funkcjonują wnoszą istotne informacje na temat ich funkcji. Jakież? Spytałabym nieco prowokacyjnie – czy nie jest przypadkiem tak, że badacze nie zadają sobie trudu dokładnego badania struktur transkryptów syntetycznych, zdając sobie sprawę, że tak naprawdę wartość uzyskanych informacji jest, delikatnie mówiąc, ograniczona z biologicznego punktu widzenia?
- 2) Kontynuując powyższy wątek – w jaki sposób zostały dobrane warunki/skład buforu do zwijania/fałdowania transkryptu gRNA Ty1? Czy zamysłem Autorów była próba imitacji warunków charakterystycznych dla cytoplazmy drożdży? Czy można w jakiś sposób manipulować składem buforu do przygotowania transkryptu *in vitro* w taki sposób, aby ograniczyć liczbę alternatywnych konformacji, a tym samym zwiększyć wiarygodność próbkowania strukturalnego metodą SHAPE?
- 3) Również w nawiązaniu do przygotowania syntetycznego substratu – z prac opublikowanych przez innych autorów w *Nucleic Acids Research* wiadomo, że w trakcie transkrypcji *in vitro* powstają



zanieczyszczenia dsRNA, których można pozbyć się dzięki oczyszczaniu z wykorzystaniem odpowiednich kolumn do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (Mu i wsp. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46:5239–5249; Sikorski i wsp. The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48:1607–1626). W opisie metod w pracach eksperymentalnych włączonych w skład rozprawy nie odnalazłem wzmianki na temat zastosowania tego kroku oczyszczania. Czy Doktorantka może skomentować potencjalny wpływ obecności tego typu zanieczyszczeń, gdzie w trakcie procedury zwijania/fałdowania transkryptu mogłoby dochodzić do hybrydyzacji nici pochodzących z tego typu zanieczyszczeń z różnymi miejscami w obrębie badanej sekwencji, na jakość wyników próbkowania strukturalnego?

- 4) Doktorantka słusznie zauważa, że Jej badania przyczyniły się do opisanego po raz pierwszy pełnej struktury gRNA retrotranspozonu LTR. Na czym zatem polegał postęp metodologiczny, który to umożliwił i dokonał się w ciągu 8 lat od zaproponowania modelu struktury regionu 5'-końca gRNA Ty1 w pracy Purzycka i wsp. *Nucleic Acids Research* 2013?
- 5) W omówieniu prac z udziałem Doktorantki ani w pracy przeglądowej nie odnalazłem krytycznego omówienia zalet i wad poszczególnych metod umożliwiających eksperymentalną analizę struktur RNA. Czy Autorka mogłaby wyjaśnić, dlaczego zdecydowała się na wykorzystanie metody SHAPE w połączeniu z elektroforezą kapilarną (a nie z sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym, jak w odmianie SHAPE-MaP, biorąc pod uwagę, że wydajność modyfikacji RNA przez NMIA i 1M7 podczas analiz własnych Autorki była porównywalna)?
- 6) Czy wykorzystywanie tylko jednej metody do analiz strukturalnych RNA jest powszechną praktyką? Czy Doktorantka spodziewa się, że zastosowanie innej techniki, bazującej na nieco innym odczynniku i podejściu eksperymentalnym (np. SPLASH) doprowadziłoby do uzyskania podobnych wyników? Czy metoda SPLASH mogłaby okazać się bardziej informatywna w kontekście mapowania oddziaływań dalszego zasięgu?
- 7) Doktorantka używa w paru miejscach rozprawy pojęcia „środowiska (kompartamentu) komórkowego”. Co się w tym pojęciu zawiera? Omawiając różnice w strukturze cytoplazmatycznego i jądrowego gRNA Ty1, mgr Zawadzka stwierdza na stronie 24: „(...) Obserwacja ta przemawia za specyficznym dla kompartamentu zwijaniem się Ty1 RNA, ponieważ różnice wynikające z odmiennego oddziaływania z białkami czy występowania modyfikacji RNA indukują raczej dużo mniejsze, bardziej lokalne zmiany”. Skoro oddziaływania z różnymi białkami czy też odmienne oddziaływania z tymi samymi białkami nie definiują w głównej mierze różnic między „środowiskiem cytoplazmatycznym” i „środowiskiem jądrowym” wpływających na strukturę gRNA Ty1, to jakie są główne czynniki różniące te „środowiska”; parametry fizykochemiczne (pH, stężenie soli, stężenie kationów metali)?
- 8) Czy istnieją jakiegokolwiek dane literaturowe, albo czy Doktorantka byłaby skłonna do spekulowania, w którym momencie dochodzi do przemodelowania struktury gRNA Ty1 *in vivo*? Czy dopiero, gdy transkrypt znajdzie się na terenie cytoplazmy? Czy też przynajmniej częściowo ten proces może zachodzić podczas „podróży” RNA między przedziałami wewnątrzkomórkowymi?
- 9) Bardzo doceniam wstępny eksperyment przeprowadzony w drugiej pracy doświadczalnej, który miał na celu ustalenie wydajności modyfikacji jądrowego transkryptu przez odczynnik do SHAPE na przykładzie U1 snRNA, którego struktura była wcześniej dobrze poznana. Warto jednak zauważyć, że U1 snRNA jest 10-krotnie krótszy niż gRNA Ty1. Czy jest możliwe, że przepuszczalność otoczki jądrowej dla NMIA jest znacznie niższa w porównaniu z przepuszczalnością błony komórkowej, co



jednak może w jakimś stopniu przekładać się na mniejszą wydajność modyfikacji RNA jądrowych w porównaniu z cytoplazmatycznymi w przypadku dłuższych cząsteczek; czy to z kolei może wpływać na jakość danych SHAPE, czego akurat można byłoby nie uchwycić, analizując strukturę krótkich transkryptów?

- 10) Na stronie 23. Doktorantka pisze: „Przeprowadzone przez nas analizy wskazują, że różnice strukturalne w Ty1 RNA nie wynikają z aktywności rybosomów podczas translacji – brak wzrostu korelacji między stanem jądrowym i cytoplazmatycznym po zablokowaniu translacji”. W kontekście pracy przeglądowej, której współautorką jest mgr Zawadzka, gdzie podkreślana jest wzajemna zależność między strukturą RNA i syntezą białka oraz innymi procesami regulującymi ekspresję genów – czy możliwe byłoby sprawdzenie różnic w poziomie translacji transkryptu Ty1 o różnych strukturach? Czy remodelowanie struktury gRNA Ty1 po eksporcie z jądra do cytoplazmy może wpływać na wydajność produkcji poliprotein na matrycy tego transkryptu? Czy różnice w strukturach „jądrowego” i „cytoplazmatycznego” gRNA Ty1 mogą w jakimś stopniu stanowić adaptację do obecności konkretnych nukleaz w różnych przedziałach wewnątrzkomórkowych i np. zapewniać większą stabilność tych cząsteczek RNA?
- 11) Czy brak sekwencji retrotranspozonu Ty1 w genomie *Saccharomyces paradoxus* daje jakąś przewagę ewolucyjną nad innymi gatunkami *Saccharomyces*?
- 12) Gdyby Doktorantka miała możliwość kontynuacji prac zapoczątkowanych w toku realizacji rozprawy, to jakie byłyby potencjalne kierunki dalszych badań?

Wniosek końcowy

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Festiny Zawadzkiej oceniam pozytywnie. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dotyczącego charakterystyki strukturalnej genomowego RNA retrotranspozonu Ty1 w różnych warunkach. Opracowanie świadczy o ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki do stopnia naukowego w reprezentowanej dziedzinie badań oraz o posiadaniu predyspozycji do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w przyszłości. Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych doświadczeń, udokumentowaną współautorstwem publikacji w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (w tym w szczególności pracą oryginalną opublikowaną w *Nucleic Acids Research*) oraz znaczenie dokonanych odkryć dla rozwoju dyscypliny stwierdzam, że oceniana praca spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim.

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.



Signed by /
Podpisano przez:

Rafał Tomecki

Date / Data:
2022-10-28
10:44