

Poznań, 27.01.2025r.

dr hab. Agnieszka Fiszer  
Zakład Biotechnologii Medycznej  
ICHB PAN w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Józwiak p.t.:**  
**Rola helikaz RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie miRNA u roślin**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką Prof. dr. hab. Artura Jarmołowskiego oraz Dr. Mateusza Bajczyka.

Cząsteczki mikroRNA (miRNA), zidentyfikowane u roślin ponad dwie dekady temu, stanowią nadal przedmiot intensywnych badań w kontekście sieci regulowanych przez nie genów, czy samego powstawania miRNA, czyli ich biogenezy. W niniejszej rozprawie Doktorantka badała udział w tym procesie trzech wybranych helikaz RNA, tj. DRH1, RH46 i RH40, które charakteryzują się zbliżoną budową. Podstawą do prowadzonych badań były wyniki uzyskane wcześniej w Zakładzie Ekspresji Genów, wskazujące na oddziaływanie niniejszych helikaz z białkiem SERRATE (SE), które jest jednym z trzech białek tworzących rdzeń Mikroprocesora – kompleksu odpowiedzialnego za powstawanie miRNA. Do badań zastosowano roślinę modelową *Arabidopsis thaliana*.

Rozprawa ma klasyczną budowę. Wstęp składa się z siedmiu podrozdziałów, w których zostały ujęte podstawowe informacje o biogenezie roślinnych miRNA. Omówione zostały również wybrane aspekty, które mają szczególne znaczenie dla podjętej tematyki badań, tj. przedstawiono charakterystykę wybranych helikaz RNA oraz opisano znaczenie struktur prekursorów pierwotnych miRNA (pri-miRNA) dla powstawania dojrzałych cząsteczek. Ta część pracy posiada prawie sto odnośników literaturowych, które zostały starannie dobrane.

Następnie przedstawiony jest Cel Badań i podział jego realizacji na pięć zadań. Cel został jasno określony i dotyczył opisanie roli trzech helikaz RNA: DRH1, RH46 i RH40 w powstawaniu miRNA u roślin. Aby osiągnąć ten cel, zaplanowano potwierdzenie bezpośrednich oddziaływań wybranych helikaz z SE, otrzymanie i scharakteryzowanie fenotypu roślin pozbawianych tych białek, oraz określenie ich wpływu na przyjmowaną strukturę drugorzędową pri-miRNA. Ponadto, dla helikazy DRH1 postanowiono określić białkowy interaktom i bardziej szczegółowo zbadać oddziaływanie z polimerazą RNA II.

Materiały i Metody zostały obszernie i wyczerpująco opisane. Doceniam w tej części bardzo jasny i precyzyjny sposób przedstawiania informacji, np. bardzo przejrzysty opis stosowanych wektorów, z podaniem kluczowych ich elementów, czy umieszczenie w tabelach z oligonukleotydami celu, do którego były stosowane. Tak opracowany dział Materiałów i Metod może być z powodzeniem źródłem informacji dla następnym badaczy.

Doktorantka opisała Wyniki swoich badań w dziewięciu podrozdziałach. W pierwszym etapie badano oddziaływanie wybranych trzech helikaz RNA z SE metodą FRET-FLIM. Przeprowadzone pomiary fluorescencji

sugerują bliskie, prawdopodobnie bezpośrednie oddziaływanie wszystkich analizowanych helikaz z SE. Dobrze byłoby umieścić więcej przykładowych zdjęć (Ryc. 7), tak aby pełniej prezentowały interpretację opisaną w tekście. Zaobserwowano wyraźną różnicę – w kontrolach sygnał SE był rozproszony, a w przypadku nadekspresji z DRH1, RH46 oraz RH40 - bardziej skupiony i wykazujący podobny wzór jak badane helikazy. Dodatkowo, w przypadku kotransfekcji wektora kodującego SE z wektorami kodującymi DRH1 i RH46, SE zaczynało lokalizować w jąderku.

Istotnym zadaniem w realizacji celu rozprawy było uzyskanie mutantu *A. thaliana* pozbawionego helikaz DRH1, RH46 i RH40. Uzyskano szereg mutantów, w wariantach pojedynczych, podwójnych oraz potrójnym. Żadna z roślin nie wykazywała zmian fenotypowych w standardowych warunkach hodowli (22°C). Natomiast w warunkach obniżonej temperatury hodowli (16°C) tylko potrójny mutant wykazywał zmiany fenotypowe, i były one bardzo silne, rośliny były znacznie mniejsze i miały inną barwę liści. Potwierdzono konieczność nieobecności trzech badanych helikaz dla wywołania tego fenotypu w eksperymencie, w którym przewrócono ekspresję *DRH1* i zaobserwowano normalny fenotyp rośliny hodowanej w 16°C. Czy określono, chociaż w przybliżeniu, jaki jest poziom nadekspresji *DRH1* w wyselekcjonowanej linii? Na przedstawionym na Ryc. 16 wyniku analizy poziomu białka pokazany jest wynik z rośliny wt (dla której zakładam, że mógłby być widoczny sygnał od endogennego białka DRH1). Być może jednak membrana była inkubowana z przeciwciałem anti-GFP (jak w przypadku membrany na Ryc. 18), a nie anti-DRH1? Nie znalazłam takiej informacji (też nie znalazłam spisu stosowanych przeciwciał w Materiałach i Metodach). Rozumiem, że celem analizy przedstawionej na Ryc. 16 było głównie porównanie poziomu GFP-DRH1 między liniami. Wiedza na temat poziomu nadekspresji *DRH1* względem endogenu byłaby cenna też z tego względu, że linia ta została wykorzystana w dalszych eksperymentach. Znaczący poziom nadekspresji *DRH1* był zapewne niezbędny do przeprowadzenia immunoprecypitacji i identyfikacji oddziałujących białek. W tym eksperymencie zidentyfikowano szereg białek uczestniczących w metabolizmie RNA, które mogły zarówno oddziaływać bezpośrednio jak i pośrednio z DRH1 aby móc zostać z tym białkiem współwytrącone. Intrygująca była obserwacja białek zaangażowanych w translację. Stąd mam pytanie czy Doktorantka zakłada, że na identyfikacje tych białek mogły mieć na to wpływ jakieś czynniki techniczne, np. obecność GFP-DRH1 po nadekspresji również w cytoplazmie w analizowanych tkankach, czy wysoki poziom białek zaangażowanych w translację w komórkach i niespecyficzne ich wytrącenie? Jeśli to oddziaływanie ma faktycznie miejsce, jakie hipotezy na jego temat można by postawić?

W kolejnych eksperymentach z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i techniki FRET-FLIM, potwierdzono bliskie oddziaływanie DRH1 z AGO1, jak i z domeną CTD RNA polimerazy II (przy czym wykazano, że domena WW białka DRH1 nie uczestniczy w tym oddziaływaniu), oraz wykazano brak bliskiego oddziaływania dla DRH1 z HYL1. To ważne wyniki dla lepszego zrozumienia oddziaływań w kompleksach białkowych zaangażowanych w przetwarzanie RNA.

Następnie, dla uzyskanego mutantu pozbawionego helikaz DRH1, RH46 i RH40 przeprowadzono analizę transkryptomu, dla roślin hodowanych w 16°C i 22°C. Uzyskane odczyty dla mutantu hodowanego w poszczególnych temperaturach odniesiono do odczytów z roślin typu dzikiego, hodowanych w tych samych temperaturach. Ten sposób analizy dostarczył informacji o zmienionej ekspresji genów w mutancie w dwóch warunkach hodowli. Dla temperatury 16°C i 22°C było to odpowiednio 3782 i 2877 genów. Pamiętając, że mutant w 16°C wykazywał silne zmiany fenotypowe jest to wynik zrozumiały, a być może nawet można by spodziewać się większej liczby genów o zmienionej ekspresji, w porównaniu do roślin hodowanych w 22°C. Spośród genów o zmienionej ekspresji 959 było wspólnych dla mutantów w obu temperaturach. Prezentacja wyników na diagramie Venna (Ryc. 29) jest niezgodna

z zasadami dla tego typu wykresu, tzn. od wartości 2877 i 3782 powinno zostać odjęte 959 (jeśli dobrze zrozumiałam prezentowane dane). Do prezentacji wyników mogły być załączone wykresy całościowo prezentujące wyniki transkryptomyczne (wykresy rozrzutu, FC do padj), jak i przedstawione klastrowanie 4 analizowanych rodzajów próbek (czyli 12 próbek łącznie, uwzględniając powtórzenia biologiczne). Analizy *Gene Ontology* (GO) wykazały, że geny zmienione w przypadku mutantu hodowanego w standardowych warunkach temperaturowych były związane w dużej mierze z procesami związanymi z fotosyntezą, natomiast dla mutantu hodowanego w obniżonej temperaturze, znacząco zostały zaburzone procesy związane z odpowiedzią na poziom składników odżywczych. Jak można wytłumaczyć tak odmienne profile dla tej samej mutacji w różnych temperaturach? Czy Doktorantka próbowała przeprowadzić analogiczne analizy GO dla 959 genów zidentyfikowanych w części wspólnej (jako że zmiana ich ekspresji była powiązana z brakiem helikaz niezależnie od temperatury hodowli)?

Uzyskane dane transkryptomyczne zostały także wykorzystane do analizy zmian w splicingu pre-mRNA w mutantach pozbawionych trzech helikaz. W przypadku obu mutantów (hodowanego w 16°C i 22°C) około połowa zmian (względem roślin wt hodowanych w tych samych temperaturach) została skategoryzowana jako zatrzymanie intronów. Czy omówione zatrzymanie intronu w mRNA AT3G55910 było jedną wspólną obserwowaną zmianą w obydwu mutantach (spośród około 50 zmian zidentyfikowanych w każdym z nich)? Zapewne słuszną jest przedstawiona w Dyskusji interpretacja Doktorantki, że wiele transkryptów podlegających zmienionemu splicingowi mogło podlegać szybkiej degradacji i stąd tych zmian nie wykryto dużo.

Dla mutantów pozbawionych helikaz DRH1, RH46 i RH40 przeprowadzono również globalną analizę poziomu krótkich RNA, skupiając się na dojrzałych miRNA. Zaobserwowano kilkadziesiąt miRNA o zmienionym poziomie (41 i 69 dla mutantu hodowanego w odpowiednio 22 i 16°C). Dla wybranych miRNA analizowano poziom ich pierwotnych prekursorów i wykazano, że rzadko można powiązać zmieniony poziom miRNA ze zmienionym poziomem prekursora. Dla wybranych miRNA wykazano zmiany w poziomie ekspresji genów, które regulują.

Następnym ambitnym zadaniem w przedstawionych badaniach, była analiza struktur wybranych transkryptów w analizowanych mutantach, z wykorzystaniem zaawansowanej metody celowanego DMS-MaPseq, umożliwiającej wnioskowanie na temat struktur obecnych w żywych komórkach. W tym rozdziale Wyników Doktorantka bardzo klarownie wyjaśnia założenia metodyczne i uzasadnia uzyskanie wyników dla części z początkowo planowanych cząsteczek. Zmiany w strukturze drugorzędowej RNA udało się wykazać dla pięciu cząsteczek prekursorów dla mutantu pozbawionego trzech helikaz, hodowanego w 16°C i 22°C. Uzyskane wyniki są bardzo różnorodne jeśli chodzi o regiony struktur prekursorów, w których obserwowano zmiany (region pętli, trzon zawierający miRNA czy część dolna spinki) i tym samym intrygujące w kontekście roli jako białek opiekuńczych RNA i wpływu zmian strukturalnych w prekursorach na poziom dojrzałych miRNA. W tej części wyników Doktorantka odnosi się do badań Wang'a i współpracowników – czy udało się potwierdzić opisane przez nich struktury, i czy też wynik powtórzenia eksperymentu dostarczył podobnych wyników?

W ostatniej części badań Doktorantka analizowała potencjalny udział badanych trzech helikaz w mechanizmach odpowiedzi na niedobór fosforanów. To ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań zaangażowania DRH1, RH46 i RH40 w regulacji odpowiedzi na różne stresy.

Zawarta w Rozprawie Dyskusja jest obszerna i zawiera pogłębioną interpretację uzyskanych wyników oraz propozycje następnych eksperymentów. Doktorantka dyskutuje skład i dynamikę kompleksów zaangażowanych w przetwarzanie RNA, w tym Mikroprocesora. Formułowane wnioski i odniesienia do opublikowanych badań świadczą

o dużej dojrzałości naukowej mgr Moniki Józwiak. Odniesienia do literatury w Dyskusji są liczne i wskazują na bardzo dobre rozeznanie Doktorantki w tematyce badań. Głównym celem pracy było badanie roli trzech wybranych helikaz w biogenezie miRNA. W tekście rozprawy są opisane dodatkowe funkcje tych i innych białek zaangażowanych w biogenezę miRNA, tzn. ich udział w metabolizmie RNA na różnych jego etapach, m.in. na etapie splicingu RNA czy jego transkrypcji, jak i degradacji. Stąd realizacja badań ma zdecydowanie szerszy kontekst.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uwagi (nie wymagające odnoszenia podczas obrony, ale może przydatne dla Doktorantki):

- w streszczeniu brakowało mi nazwy gatunku rośliny, na której zostały przeprowadzone badania,
- nie zawsze kompletnie wprowadzane są skróty, tzn. z podaniem angielskiej nazwy kursywą poprzedzone „ang.” i, tam gdzie to jest zasadne, podaniem polskiego odpowiednika/tłumaczenia; np. TREX na stronie 20 (na tej samej stronie kompleks NEXT ma skrót opisane prawidłowo), czy w spisie skrótów – wszystkie skróty pochodzące z jęz. angielskiego powinny mieć podane rozwinięcie w języku obcym, dla wybranych podane powinno być tłumaczenie w języku polskim (tymczasem część ma tylko polskie tłumaczenie, angielskie odpowiedniki nie są pisane kursywą),
- na Rycinie 1 przedstawiono schemat powstawania miRNA u roślin – chyba zbędnie zaprezentowano białko HASTY jako uczestniczące w eksporcie miRNA z jądra do cytoplazmy, ponieważ w tekście opisano, że w późniejszych badaniach (zakładam, że dokładniejszych dzięki dostępnym obecnie metodom) wykazano inne czynniki uczestniczące w eksporcie miRNA (również pokazane na tej rycinie),
- w tabelach z podawanymi sekwencjami oligonukleotydów (Materiały 3.9) należy umieszczać informacje, że sekwencja jest podawana od końca 5' do 3' (zakładam, że tak standardowo zostały podane, w jednej z tabel jest ta informacja),
- warto w podpisie ryciny umieszczać informację o liczbie powtórzeń biologicznych czy liczbie pomiarów, na podstawie których zostały opracowane wyniki, np. dla Ryc. 6 (informacje te są zawarte w opisie metody, ale tu też mogłyby mieć miejsce – jako informacja kluczowa dla rozpatrywania uzyskanego wyniku),
- strona 89, ostatnie zdanie, zamiast „podwyższony” powinno być „obniżony”,
- Rycina 38, nie oznaczono zmian istotnych statystycznie, które są zasugerowane w tekście opisującym te wyniki (ostatnie zdanie na stronie 99),
- paragraf tekstu pod ryciną 39 (str. 101) jest powtórzeniem informacji ze strony 96,
- w określaniu modelowanych struktur wskazana jest precyzja czy jest mowa o pre-miRNA czy pri-miRNA – badane w rozdziale 5.8 są fragmenty pri-miRNA obejmujące pre-miRNA i dolną część trzonu spinki,
- porównanie uzyskanych modeli czterech struktur dla każdego z prekursorów, z mojego punktu widzenia, ułatwiła by prezentacja ich wszystkich obok siebie (np. w układzie poziomym ryciny na stronie aby nie tracić na rozdzielczości)

Opisane badania zostały wykonane w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w tym w ramach projektu własnego Doktorantki, tj. Preludium. Mgr Monika Józwiak jest współautorką 3 publikacji naukowych, które ukazały się w 2023 roku, w tym pierwszą autorką pracy przeglądowej w prestiżowym *Trends in Plant Science* (IF 17.4). Zawarte w rozprawie doktorskiej wyniki mają bardzo dobry potencjał publikacyjny, przy wykonaniu odpowiednich powtórzeń eksperymentów, o konieczności których jest wspomniane przez Doktorantkę.

W końcowych wnioskach chciałabym podkreślić, że z przygotowaną przez mgr Monikę Józwiak rozprawą zapoznawałam się z dużym zaciekawieniem, co wynikało nie tylko z intrygującego tematu badawczego, ale też było umożliwiające przez Doktorantkę poprzez bardzo dobre formułowanie celów eksperymentów, klarowne opisywanie

wyników badań, czytelne opracowanie graficzne i jasne formułowanie wniosków. Doktorantka wykazała się sprawnym wykorzystaniem wielu zaawansowanych technik badawczych i wykonaniem eksperymentów, które dostarczyły ciekawych odkryć.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Józwiak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza uzyskaną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tak więc, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20.07.2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Moniki Józwiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fiszer".