

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań, 15.01.2025 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Józwiak pt.:  
„Rola helikaz RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie  
mikroRNA u roślin”**

**Tematyka i cele rozprawy**

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Józwiak powstała w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pracy jest Pan prof. dr hab. Artur Jarmołowski, a promotorem pomocniczym – Pan dr Mateusz Bajczyk. Praca ta doskonale wpisuje się w tematykę badawczą prowadzoną przez Panów Promotorów, którzy mają znaczące osiągnięcia w badaniach procesu biogenezy mikroRNA w roślinach.

Podjęta tematyka badawcza dotyczy udziału helikaz z rodziny DEAD-box w biogenezie mikroRNA w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*. Chociaż od dawna znamy koncepcję funkcjonowania miRNA i jesteśmy świadomi ich istotności u wielu organizmów, nadal jesteśmy jeszcze daleko od zrozumienia molekularnych detali tego procesu. Piszę o tym aby podkreślić, że tematyka wybrana przez Doktorantkę i Jej Promotorów jest w pełni oryginalna, a zaplanowane i wykonane przez mgr Monikę Józwiak doświadczenia odpowiadają na ważne biologiczne pytania.

**Ocena formalna rozprawy**

Rozprawa doktorska stanowi obszerne, liczące ponad 150 stron opracowanie. Układ pracy jest przejrzysty, a lekturę ułatwiają ryciny. Pod względem formalnym rozprawa jest przedstawiona poprawnie i nie mam poważniejszych zastrzeżeń do jej zawartości.

Cała praca jest napisana bardzo dobrze, bardzo ładnym naukowym językiem. Streszczenie jest bardzo dobrze napisane i podsumowuje obszerne wyniki pracy w sposób zwięzły, ale jednocześnie nie pomija żadnej ważnej obserwacji. W kolejnym rozdziale czytelnik zostaje wprowadzony w szczegółowe zagadnienia dotyczące roli miRNA w roślinach, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w stresie niedoboru fosforanów oraz białek zaangażowanych w ich biogenezę. Ten rozdział również czyta się bardzo przyjemnie, ze względu na dobrą i gruntowną znajomość literatury przez Doktorantkę. Rozdział jest dobrze zilustrowany rycinami z wyczerpującymi podpisami.

Następnie Doktorantka podała cel pracy, definiując go w pierwszej kolejności jako „opisanie roli helikaz RNA DRH1, RH46 i RH40 w powstawaniu miRNA u roślin”,

a w drugiej kolejności podała szczegółowe zadania, których realizację obrała, aby ten cel zrealizować.

Kolejny rozdział pracy omawia zastosowane metody i tutaj mam **jedną uwagę, do której proszę o komentarz podczas obrony rozprawy:**

- Rozdziały Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA oraz Sekwencjonowanie małych RNA są dość skąpo przedstawione w porównaniu ze szczegółowym omówieniem pozostałych metod. Nie umiałam w prosty sposób znaleźć informacji jasno wskazującej czy kontrolą do siewek zmutowanych hodowanych w temperaturze 22°C były siewki rośliny dzięki hodowane w tej samej temperaturze (podobnych informacji zabrakło dla 16°C). Nie ma też informacji o ilości przygotowanych bibliotek do sekwencjonowania, jak i parametrów sekwencjonowania (zwłaszcza głębokości, o której pisze Pani również na str. 98, wskazując na niski poziom prekursorów miRNA jako skutku głębokości sekwencjonowania).

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Rozprawa doktorska Pani Moniki Józwiak jest ciekawą i skuteczną próbą wglądu w biogenezę mikroRNA w Arabidopsis. Doktorantka zaplanowała swoją rozprawę w sposób bardzo staranny, tutaj widać dużą wiedzę, rzetelność i skrupulatność przy planowaniu eksperymentów: zawsze są kontrole, wstępne testy, potwierdzenie nietypowych obserwacji. Cele odpowiadają wynikom uzyskanym w pracy. Praca stanowi obszerny opis różnych aspektów biogenezy mikroRNA: udziału helikaz, ich partnerów białkowych, poziomu miRNA, ich prekursorów i docelowych mRNA w mutantach i stresie temperaturowym - i niewątpliwie dostarcza informacji, które mogą zostać wykorzystane dla dalszych działań dotyczących molekularnych, komórkowych i fizjologicznych aspektów funkcjonowania miRNA w roślinach.

Realizacja badań wymagała od Doktorantki wykonania wielu eksperymentów, rozpoczynając od tych najbardziej podstawowych, wymaganych do skonstruowania odpowiednich zmutowanych roślin. Pani Magister skonstruowała i scharakteryzowała mutant Arabidopsis pozbawionego helikaz DRH1, RH46 i RH40 oraz roślinę transgeniczną eksprymującą helikazę DRH1 w tle potrójnego mutantu. Stosując protoplasty roślin i wykorzystując metodę FRET-FLIM wykazała, że helikazy DRH1, RH46 i RH40 oddziałują z SERRATE, a wyniki immunoprecypitacji dostarczyły nowych danych o oddziaływaniach AGO1-DRH1 (ale nie AGO1-HYL1) oraz RNA Pol II-DRH1. Ta część wyników jest dobrze i przejrzysto zaprezentowana w postaci doskonałych fotografii z analiz mikroskopowych. Pomimo, że wyników jest naprawdę sporo, graficzna prezentacja pomaga w tych istotnych obserwacjach.

Z kolei etap pracy dotyczący poziomów miRNA, ich docelowych mRNA i struktury prekursorów Doktorantka rozpoczęła od przygotowania bibliotek RNA-seq, smallRNA-seq i DMS-Map-seq. Analiza danych z wysokoprzepustowych sekwencjonowań wyłoniła mRNA i miRNA, których ekspresja jest zmieniona w potrójnym mutancie. **W tym rozdziale brakuje mi kilku informacji i proszę Doktorantkę o komentarz do następujących pytań i uwag:**

- Jakie były ogólne wyniki sekwencjonowania, tj. ile uzyskiwano odczytów, ile z nich koresponowało z genomem Arabidopsis (ta część w roślinach potrafi być dość problematyczna)?

- Dla różnicujących na poziomie transkrypcji genów zaprezentowano jedynie analizy ich funkcji z pomocą terminologii GO. Moja ciekawość naukowa nie pozwala mi nie zadać pytania które konkretnie mRNA ulegały podwyższonej i obniżonej ekspresji (nie chodzi mi o zaprezentowanie pełnych wyników, ale np. „top ten”) oraz które z nich były unikatowe dla zmutowanych roślin hodowanych w obniżonej i optymalnej temperaturze.
- Podobna jak wyżej uwaga dotyczy zidentyfikowanych mikroRNA. Zaprezentowano diagramy wskazujące na ilość miRNA ulegających obniżonej oraz podwyższonej ekspresji w potrójnym mutancie w odniesieniu do roślin kontrolnych (ryc. 35 i 36) i z nich jasno wynika, że na pewno na szczególną uwagę zasłużyłyby trzy miRNA wykazujące znaczący (powyżej 10-krotny) wzrost ekspresji w temperaturze 22°C oraz kolejne trzy (inne? te same?) – w 16°C. Proszę o zaprezentowanie tych miRNA (nazwa, potencjalny cel) podczas obrony rozprawy doktorskiej. Ponadto, w dalszej części rozprawy dyskutuje Pani poziom mRNA docelowego dla miRNA 408 – istotna byłaby informacja gdzie na ryc. 35 i/lub 36 znajduje się ten mikroRNA.
- Jaki był rozkład długości miRNA? Czy zmieniał się w roślinach pozbawionych helikaz bądź pod wpływem obniżenia temperatury?
- Na jakiej zasadzie wyselekcjonowano prekursor miRNA do weryfikacji ich ekspresji metodą ilościowego PCR?
- Wysokoprzepustowe analizy struktury drugorzędowej prekursorów miRNA wskazały, że ich struktura ulegała zmianie, ale jedynie w rejonach górnej części spinki. Czy sądzi Pani, że takie zmiany mogą nieść konsekwencje w postaci zmienionej ekspresji miRNA?

Podsumowując, ta „wysokoprzepustowa” część wyników, pomimo nieidealnego udokumentowania umożliwiła obserwacje istotnych różnic w biogenezie miRNA, strukturze ich prekursorów i poziomach docelowych mRNA. To jest zdecydowanie duży wkład w istniejącą wiedzę.

Wszystkie przedstawione powyżej komentarze w najmniejszym stopniu nie mają na celu umniejszania wartości merytorycznej pracy. Moje uwagi mają raczej charakter polemiczny i są podyktowane chęcią dyskusji. Naukowa wartość niniejszej rozprawy pozostaje wysoka i bardzo cenię tę część, w której Doktorantka opisuje dyskusję nad uzyskanymi wynikami. Ta polemika z danymi uzyskanymi przez innych oparta jest na dobrze dobranej literaturze naukowej i wskazuje, że Pani mgr Monika Józwiak znakomicie zna literaturę naukową poświęconą tematyce pracy.

### **Wnioski końcowe**

Rozprawę doktorską mgr Moniki Józwiak oceniam bardzo dobrze, uważam za wartościową naukowo i przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Autorka przedstawiła w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe, które dostarczają nowej wiedzy na temat powiązania helikaz z rodziny DEAD-box z biogenezą miRNA w roślinach. Wartość naukową pracy najlepiej obrazuje fakt, że uzyskane przez Panią

Magister wyniki dotyczące HYL1 zostały już opublikowane w artykule, który ukazał się w uznanym czasopiśmie naukowym *Plant and Cell Physiology*.

Oceniana praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Moniki Józwiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Kamille Grzywacz*

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN