



UNIwersytet Warszawski

Wydział Biologii



Dr hab. Marta Koblowska, prof. ucz
Zakład Biologii Systemów
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 26.01.2025

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Józwiak
„Rola helikaz RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie mikroRNA u roślin”
Wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Artura Jarmołowskiego oraz dr. Mateusza Bajczyka
w Zakładzie Ekspresji Genów
Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Helikazy RNA pełnią ważne funkcje w molekularnych mechanizmach podstawowych dla biologii komórki, uczestnicząc w rozwijaniu dwuniciowych struktur RNA/RNA oraz hybryd RNA/DNA. Oprócz tego są zdolne do modulowania składu kompleksów RNA/białko (rybonukleoprotein, RNP), wpływając na ich funkcje. Aktywność helikaz RNA jest niezbędna dla przebiegu wielu fundamentalnych procesów komórkowych, takich jak transkrypcja czy splicing. Przestrzenna struktura RNA, modyfikowana przez helikazy, odgrywa kluczową rolę w decydowaniu o losach różnych rodzajów cząsteczek RNA, regulując ich interakcje i formowanie kompleksów rybonukleoproteinowych.

Praca mgr Moniki Józwiak w przekonujący sposób pokazuje, że jednym z procesów silnie związanych z aktywnością helikaz RNA jest biogeneza miRNA. MiRNA to małe, niekodujące cząsteczki RNA, które odgrywają istotną rolę w regulacji genów. Ich główna funkcja polega na kierowaniu białek Argonaute do transkryptów o komplementarnej sekwencji, co skutkuje obniżeniem poziomu ekspresji docelowych genów przez degradację ich mRNA lub represję translacyjną. MiRNA zalicza się do kluczowych regulatorów genetycznych, a ich biogeneza jest precyzyjnie kontrolowana przez kompleks mikroprocesora, którego rdzeń tworzą białka DCL1, HYL1 i SE. Interakcje mikroprocesora z prekursorowymi formami miRNA, są ściśle uzależnione od skomplikowanej struktury przestrzennej RNA, która determinuje miejsca precyzyjnego cięcia pri-miRNA przez mikroprocesor. Dynamiczny charakter struktury RNA czyni ją kluczowym elementem regulatorowym w biogenezie miRNA, a enzymy, które modyfikują tę strukturę, takie jak helikazy RNA, odgrywają w tym procesie fundamentalną rolę.

W kontekście badań prowadzonych w Zakładzie Ekspresji Genów nad białkiem SERRATE, podstawowym składnikiem mikroprocesora, odkryto potencjalne oddziaływanie z tym białkiem trzech helikaz RNA z rodziny DEAD-box. Rola helikaz DRH1, RH46 i RH40, zidentyfikowanych w ramach wspomnianych badań, stanowi centralny element analiz przedstawionych w recenzowanej dysertacji.

Praca mgr Moniki Józwiak w kompleksowy sposób podejmuje temat funkcji tych helikaz w biogenezie miRNA, łącząc dogłębne analizy molekularne z kontekstem biologicznym, a uzyskane przez Doktorantkę

wyniki znacząco wzbogacają naszą wiedzę na temat zaangażowania helikaz RNA z rodziny DEAD-box w regulację ekspresji genów u roślin.

Przedstawiona dysertacja charakteryzuje się klasyczną i przejrzystą strukturą. Wstępna część pracy zawiera podziękowania, listę publikacji, których współautorką jest mgr Monika Józwiak, wykaz skrótów i symboli, spis treści oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Streszczenie jasno i zwięźle przedstawia podstawy postawionej hipotezy, kluczowy cel badań, skrótowy opis zastosowanych podejść badawczych oraz główne wnioski wynikające z uzyskanych rezultatów.

Po Wstępie w pełni wprowadzającym czytelnika w tematykę pracy, znajduje się podrozdział definiujący cel naukowy pracy oraz listę podjętych szczegółowych zadań badawczych prowadzących do zrealizowania głównego zamierzenia pracy. Kolejne części dysertacji obejmują materiały i metody zastosowane podczas realizacji badań, co pozwala na odtworzenie procedur eksperymentalnych.

Najistotniejszy rozdział pracy – Wyniki – został przedstawiony w sposób czytelny i uporządkowany. Zawiera ponad 50 rycin, które dobrze ilustrują uzyskane dane, znacząco ułatwiając ich interpretację. Końcowe części dysertacji obejmują krótką i klarowną dyskusję, w której Autorka prezentuje uzyskane wyniki na tle literatury, potem następuje zwięzłe podsumowanie. Pracę wieńczy obszerny i starannie przygotowany spis literatury. W mojej ocenie dysertacja została napisana w sposób wyczerpujący i z zachowaniem odpowiedniego poziomu szczegółowości.

Najważniejszy rozdział poświęcony wynikom przedstawia dobrze zaplanowane doświadczenia, które jednoznacznie wskazują na zaangażowanie badanych helikaz z rodziny DEADbox w biogenezę miRNA. Wykonane eksperymenty oparte były zarówno o podstawowe metody biologii molekularnej, techniki mikroskopowe jak i wysokoprzepustowe badania proteomiczne i transkryptomyczne na poziomie długich transkryptów i miRNA. Kluczem do ustalenia roli badanych helikaz w regulacji pri-miRNA było zastosowanie przez Doktorantkę zaawansowanej metody DMS-MaPseq (dimethyl sulfate mutational profiling with sequencing), która służy do badania drugorzędowej struktury RNA. Doktorantka prowadziła badania na dzikich roślinach kontrolnych, pojedynczych oraz skonstruowanych przez Autorkę wielokrotnych mutantach insercyjnych Arabidopsis. Uzyskane wyniki zostały dobrze opisane i zobrazowane. Imponuje wielość wykorzystanych technik badawczych i integracja uzyskanych danych.

W pierwszej kolejności Doktorantka udowodniła, że helikazy DRH1, RH46 oraz RH40 bezpośrednio oddziałują z białkiem SERRATE, które jest podstawową podjednostką kompleksu mikroprocesora kluczowego dla biogenezy miRNA. Autorka pokazała, że badane helikazy kolokalizują z SE w jądrach komórek Arabidopsis oraz za pomocą metody FRTE-FLIM ustaliła bezpośrednie oddziaływania między białkami.

Czy według Autorki bezpośrednie oddziaływanie np. DRH1-SE powinno mieć odzwierciedlenie w regulowanej puli miRNA i w efekcie w regulowanych genach, czy można to ustalić?

Otrzymanie takiego wyniku wzmocniłoby znaczenie stwierdzonego oddziaływania i wskazało wspólną ścieżkę regulacyjną dla obu białek.

Wykonane analizy fenotypowe mutantów insercyjnych wskazują, że badane helikazy mogą się zastępować. Nie zaobserwowano zmian fenotypowych w pojedynczych i podwójnych mutantach, ani w warunkach kontrolnych ani w warunkach stresu chłodu. Dopiero wyłączenie ekspresji wszystkich trzech helikaz (DRH1, RH46, RH40) znalazło odbicie w fenotypie rośliny i to jedynie w warunkach chłodu. Otrzymanego i scharakteryzowanego potrójnego mutantu Arabidopsis Doktorantka wykorzystwała do nadekspresji fuzji białkowej DRH1-GFP, jednej z badanych helikaz. Ekspresja DRH1-GFP kompensowała fenotyp potrójnego mutantu w warunkach chłodu. Tak otrzymaną roślinę transgeniczną Autorka wykorzystwała do identyfikacji białek, które potencjalnie oddziałują z helikazą DRH1. To bardzo dobre

podejście eksperymentalne, które często otwiera przed badaczem nowe ścieżki i wskazuje wielość procesów, w które mogą być zaangażowane analizowane cząsteczki. Stało się tak i w tym przypadku. Wśród potencjalnych interaktorów była liczna grupa białek zaangażowanych w biogenezę miRNA, w tym wcześniej analizowane białko SERRATE, co doskonale wsparło uzyskane wcześniej wyniki. Co bardzo interesujące znalazły się także czynniki splicingowe i białka kluczowe dla transkrypcji jak jedna z podjednostek pol II RNA. Wymieniam tylko niektóre. Co należy podkreślić w przedstawianej pracy pokazano bezpośrednie oddziaływanie DRH1 z domeną CTD RNAP II, co wraz z wynikami proteomicznymi silnie wskazuje na potencjalne zaangażowanie DRH1 w regulację transkrypcji. Bardzo ważnym białkiem, które także współwytrącało się z helikazą DRH1 było ARGONAUT 1- najważniejszy białkowy składnik kompleksu RISC. Dodatkowo Doktorantka pokazała, że helikaza DRH1 i AGO1 bezpośrednio ze sobą oddziałują, co może być istotne w formowaniu kompleksu RISC i właściwym wypełnianiu funkcji regulatorowych przez ten kompleks.

Zidentyfikowane białka i bezpośrednie oddziaływania wskazują na istotność DRH1 w biogenezie miRNA na różnych jej poziomach, potencjalnie od transkrypcji prekursorów miRNA aż do kluczowego etapu w wykonywaniu funkcji regulatorowej - wiązania z cząsteczki miRNA z białkiem AGO1.

Ciekawi mnie zdanie Autorki, czy wykazane w pracy za pomocą RNA-seq zmiany w transkryptomie potrójnego mutantu helikazowego w warunkach kontrolnych i w stresie chłodu wynikają wyłącznie z zaburzeń w biogenezie miRNA, czy może także z odrębnej roli DRH1 w regulacji genów kodujących białka? Czy możliwe jest rozróżnienie tych funkcji?

Wiadomo, że struktura drugorzędowa prekursorów miRNA decyduje o wydajności i precyzji produkcji miRNA. Doktorantka badała związek helikaz DRH1, RH46 i RH40 ze strukturą tych cząsteczek i biogenezą miRNA. Przeprowadziła analizę sRNA-seq w celu ustalenia zmian w globalnym składzie małych RNA w potrójnym mutancie helikazowym, także w warunkach stresu chłodu. Dodatkowo zastosowała nowoczesną technikę badawczą do analizy struktury RNA - DMS-MaPseq co pozwoliło na identyfikację zaburzeń w drugorzędowej strukturze pri-miRNA przy braku badanych helikaz. Zidentyfikowane zmiany w poziomach dojrzałych miRNA oraz obecne zaburzenia w pri-miRNA wskazują na bezpośredni związek badanych helikaz na biogenezę miRNA.

Czy możliwa jest identyfikacja bezpośrednio regulowanych cząsteczek RNA przez badane helikazy? Czy istnieje, albo czy można sobie wyobrazić system reporterowy, który pozwoliłby na badanie aktywności helikaz RNA względem struktury regulowanej cząsteczki?

W ostatniej części pracy Doktorantka zaobserwowała także ukierunkowane zmiany w poziomach miRNA związanych odpowiedzią na niedobór fosforanów, nie miało to jednak wpływu na zmiany w poziomie ich docelowych transkryptów. **W roślinach głównym mechanizmem regulacji przez miRNA jest degradacja mRNA, ale może warto ocenić ilości białek dla docelowych mRNA w badanych warunkach? Czy można inaczej wytłumaczyć brak takiej zmiany?**

Praca napisana jest wartkim językiem, bardzo dobrze się ją czyta. Wyniki są dobrze udokumentowane, choć zabrakło w mojej ocenie potwierdzenia danych po RNA-seq i sRNA-seq metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Mam też pewien niedosyt związany z analizą wyników RNAseq. Obecnie przyjęło się wykonywać analizę wzbogaceń np. w oparciu o bazę GO odrębnie dla genów o wyższej i niższej ekspresji w porównaniu do kontroli. To pozwala, oczywiście w przybliżeniu, poznać procesy i funkcje, które będą aktywowane i hamowane w badanym organizmie. Ale także przy porównaniu z transkryptomami innych mutantów

istotne jest spojrzenie na kierunkowość zmian poziomu mRNA

Warto byłoby sprawdzić, czy w mutancie zmienia się poziom transkryptów innych helikaz typu DEADbox i/lub czynników splicingowych? Może istnieje mechanizm kompensujący braki w badanych białkach?

Ciekawi mnie także czy możliwe jest ustalenie nadreprezentowanych procesów biologicznych lub funkcji molekularnych w oparciu o zestaw genów o zmienionym splicingu w potrójnym mutancie względem kontroli.

Uwagi techniczne:

Byłoby wygodniej gdyby w opisach figur dotyczących analiz wysokoprzepustowych umieszczone były informacje o przyjętych odcięciach (krotność zmiany i istotność statystyczna). Nie znalazłam także informacji w opisie analizy transkryptomicznej o przyjętych odcięciach oraz liczbie odczytów uzyskanych po RNAseq. Niektóre figury mają niewyraźne podpisy.

Na koniec recenzji chcę podkreślić, że praca doktorska pani mgr Moniki Józwiak bardzo mi się podoba. Podjęty temat badawczy jest ważny i dotyczy cząsteczek miRNA kluczowych dla regulacji genów. Zaproponowane w pracy podejścia badawcze były bardzo dobrze dobrane, a uzyskane wyniki zdecydowanie poszerzają wiedzę o biogenezie miRNA. W związku z tym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Moniki Józwiak pt. „**Rola helikaz RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie mikroRNA u roślin**” spełnia wymogi ustawowe z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani Moniki Józwiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką jakość pracy i wyniki, które zdecydowanie poszerzyły naszą wiedzę na temat procesu biogenezy miRNA wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej odpowiednią nagrodą.



Marta Kobłowska