

Poznań, 25.05.2020

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN

Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Kotrys zatytułowanej
„Analiza funkcjonalna białka C6orf203, nowego czynnika zaangażowanego
w metabolizm RNA w mitochondriach człowieka”

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Promotorem pracy jest dr hab. Roman Szczesny.

Rozprawa doktorska obejmuje trzy prace opublikowane w 2019 roku, w tym publikację eksperymentalną, metodyczną i przeglądową. We wszystkich pracach Pani mgr Anna Kotrys jest pierwszą autorką. Publikacja eksperymentalna pt. *“Quantitative proteomics revealed C6orf203/MTRES1 as a factor preventing stress-induced transcription deficiency in human mitochondria”* została opublikowana w czasopiśmie Nucleic Acids Research o współczynniku IF 10,727; praca metodyczna pt. *“High-throughput measurement of mitochondrial RNA turnover in human cultured cells”* została zaakceptowana do druku w Methods in Molecular Biology, natomiast praca przeglądowa pt. *“Mitochondrial gene expression and beyond- novel aspects of cellular physiology”* w Cells (IF 5,656). Poza tym, Pani mgr Anna Kotrys jest współautorką trzech publikacji, w tym jednej w prestiżowym czasopiśmie Molecular Cell (IF 15).

Tematyka badawcza przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wpisuje się w zagadnienia realizowane w zespole Promotora, dotyczące szeroko rozumianego metabolizmu RNA mitochondrialnego. Mitochondria należą do najistotniejszych organelli komórkowych, których główną funkcją jest produkcja energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Pod wieloma względami są to organelle wyjątkowe i ciekawe, otoczone podwójną błoną i posiadające własny genom powstały prawdopodobnie na drodze endosymbiozy bakterii z pierwotną komórką eukariotyczną.

Zdecydowana większość białek mitochondrialnych jest kodowana w genomie jądrowym, w związku z tym homeostaza mitochondriów uzależniona jest od prawidłowej komunikacji pomiędzy tymi kompartmentami komórkowymi. Mitochondrialny proteom składa się z ok. 1500 białek, a funkcja wielu z nich jest wciąż nieznana. Wykorzystując hodowle komórek ludzkich oraz technikę proteomiki ilościowej zespół Promotora zidentyfikował szereg białek potencjalnie zaangażowanych w metabolizm RNA w mitochondriach. Pani Anna Kotrys uczestniczyła w tych badaniach w ramach pracy magisterskiej, a następnie kontynuowała je podczas doktoratu.

Praca napisana w języku angielskim rozpoczyna się standardowo od streszczenia, spisu treści, wykazu skrótów oraz listy publikacji. Po krótkim, 6 stronicowym wprowadzeniu teoretycznym do tematyki rozprawy doktorskiej opisany jest cel pracy, oraz wyniki badań z podziałem na trzy aspekty, odpowiadające wymienionym wyżej publikacjom. Opisowi każdej publikacji towarzyszy oświadczenie Autorki o jej roli w przeprowadzonych eksperymentach i przygotowaniu manuskryptów. Kolejne części rozprawy to podsumowanie wraz z dyskusją, kopie publikacji i oświadczenia współautorów o ich udziale w przygotowaniu publikacji. Na uwagę zasługuje wysoka jakość rozprawy w aspekcie edytorskim i językowym (dbałość o detale, przejrzystość, wysoka jakość rycin).

We wstępie Autorka wprowadza nas w temat biologii mitochondriów, ich pochodzenia, budowy i funkcji. Krótko charakteryzuje genom i proteom mitochondrialny oraz regulację ekspresji genów mitochondrialnych w warunkach stresu. Wstęp jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy i uzasadnia celowość przeprowadzonych badań. Drobną uwagę: tytuł rozdziału 1.2 (Mitochondrial genome) nie do końca odpowiada zawartości, która dotyczy w dużej mierze transkrypcji. Choć znane są podstawowe etapy i czynniki biorące udział w procesie transkrypcji mitochondrialnego RNA wciąż wiele aspektów wymaga wyjaśnienia, np. etap terminacji oraz regulacja transkrypcji w warunkach stresu. Wcześniejsze badania wskazują na to, że istnieją mechanizmy kompensacyjne, wpływające na zachowanie odpowiedniego poziomu transkrypcji ważnych genów mitochondrialnych przy obniżonej liczbie kopii mtDNA w warunkach stresu. Jednym z białek mogących brać udział w tego typu regulacji jest C6orf203.

Głównym celem badań Doktorantki była charakterystyka funkcjonalna białka C6orf203, określenie jego potencjalnego udziału w metabolizmie mitochondrialnych kwasów nukleinowych, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów aktywowanych w warunkach stresowych. Kolejne dwa cele badań dotyczą opracowania wysokoprzepustowej metody pomiaru wydajności transkrypcji w mitochondriach oraz podsumowanie stanu wiedzy na temat ekspresji genów mitochondrialnych. Drobną uwagę/rozbieżność: choć zbiór prac stanowi, bez wątpienia, spójną tematycznie całość, dosyć szczegółowy tytuł pracy obejmuje w zasadzie tylko pierwszy cel pracy i publikację nr 1.

W przypadku badań opisanych w publikacji nr 1 Autorka wyodrębniła szereg celów szczegółowych/wątków badawczych: określenie lokalizacji subkomórkowej białka C6orf203, zdolność wiązania RNA, wpływ wyciszenia i nadekspresji białka C6orf203 na metabolizm mtRNA, funkcja białka w warunkach zatrzymania transkrypcji, wpływ zdolności wiązania RNA przez białko C6orf203 na jego funkcje oraz współdziałanie C6orf203 z maszyną transkrypcyjną.

Białko C6orf203 zostało wybrane do dalszych badań w wyniku analiz proteomiki ilościowej po uprzednim traktowaniu komórek ludzkich czynnikiem stresującym. Tu pojawia się kilka pytań: jakie efekty wywołuje bromek etydyny w komórce? Czy generuje mutacje w DNA mitochondrialnym (autorzy zaobserwowali wzrost ekspresji białka EXOG zaangażowanego w naprawę mtDNA, co może świadczyć o uszkodzeniach DNA)? Na jakiej podstawie autorzy wyselekcjonowali białko C6orf203 do dalszych analiz spośród 4 białek kandydatów o podwyższonym poziomie w warunkach zaburzonej ekspresji mtDNA? Jak jest uzasadnienie do wykorzystania komórek nowotworowych A549 w tego typu badaniach? Szkoda, że we wstępie rozprawy brak informacji o czynnikach GRSF1, SLIRP, LRPPRC, związanych z metabolizmem mitochondrialnych kwasów nukleinowych, co ułatwiłoby interpretację ryciny w części 3.1.

Analizy mikroskopowe pozwoliły na potwierdzenie mitochondrialnej lokalizacji białka C6orf203 (macierz mitochondrialna). Autorka wykazała bezpośrednie oddziaływanie C6orf203 z transkryptami mitochondrialnymi *in vitro* oraz *in vivo*, wykorzystując szereg metod takich jak EMSA, transkrypcja *in vitro*, nadekspresja białka w systemie bakteryjnym, hybrydyzacja typu Western, northern, hodowle komórkowe oraz koimmunoprecypitacja kompleksów RNP. Poprzez wprowadzenie mutacji w domenę wiążącej RNA potwierdziła kluczową rolę tej domeny w oddziaływaniu z transkryptami mitochondrialnymi.

W celu zbadania funkcji C6orf203, Doktorantka przygotowała szereg konstruktów i zmodyfikowanych linii komórkowych z indukowanym wyciszeniem ekspresji endogennego C6orf203 na drodze RNAi oraz z nadekspresją C6orf203. Co dokładnie kryje się pod pojęciem „kaseta miRNA”? Analizy RNAseq wykazały niewielkie zmiany transkryptomu mitochondrialnego po wyciszeniu C6orf203, dotyczące jedynie transkryptów powstających z regionu regulatorowego mtDNA. Doktorantka wykazała również ochronny charakter C6orf203 w stosunku do kilku transkryptów mitochondrialnych w warunkach stresowych zależny od zdolności wiązania RNA. W kolejnych eksperymentach Doktorantka wykazała, że C6orf203 wiąże się *in vivo* z POLRMT i TFAM, co może sugerować jego aktywność na etapie inicjacji transkrypcji. Na tej podstawie autorzy zaproponowali nową nazwę białka C6orf203 – MTRES1 (Mitochondrial Transcription Rescue Factor 1). Podsumowując, publikacja stanowi logiczny i dobrze przemyślany ciąg eksperymentów zmierzający do wyjaśnienia funkcji białka C6orf203 w metabolizmie RNA mitochondrialnego. Zgodnie z

oświadczeniem Doktorantka wykonała wszystkie doświadczenia opisane w publikacji oraz miała istotny udział w projektowaniu eksperymentów, analizie wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Publikacja nr 2 dotyczy opracowania wysokoprzepustowej metody do badania powstawania i stabilności (ang. turnover) RNA mitochondrialnego w pojedynczej komórce. Polega ona na znakowaniu nowopowstających transkryptów w komórce przy pomocy bromouracydyny, utrwaleniu komórek, detekcji transkryptów przeciwciałami anti-BrU i ilościowej analizie sygnału przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Metoda może być wykorzystana do badania wpływu różnych czynników na stabilność transkryptów w komórce lub do poszukiwania nowych białek regulujących ekspresję genów mitochondrialnych. Została wykorzystana w pracy nr 1 do badania stabilności transkryptów mitochondrialnych *in vivo* po zastosowaniu 3 inhibitorów transkrypcji.

Publikacja przeglądowa nr 3 to bogaty zbiór informacji (ponad 200 pozycji literaturowych) na temat biologii mitochondriów, m.in. procesu transkrypcji, potranskrypcyjnej regulacji mtRNA oraz roli niekodujących RNA w indukcji odpowiedzi interferonowej. Pani mgr Anna Kotrys miała istotny wkład w przygotowaniu manuskryptu, co z pewnością stanowiło bardzo cenne doświadczenie, jak również pozwoliło spojrzeć na badania realizowane w ramach pracy doktorskiej z nieco szerszej perspektywy.

W kolejnej części pracy zatytułowanej Podsumowanie i Dyskusja Autorka przedstawia możliwy mechanizm działania MTRES1 w procesie inicjacji transkrypcji. Proponuje dalsze eksperymenty, pozwalające na wyjaśnienie tego mechanizmu. W dalszej części uzasadnia użycie bromku etydyny jako czynnika zaburzającego ekspresję mitochondrialnego DNA. Rzeczywiście nie jest to typowy czynnik stresowy działający na komórki ludzkie. Czy znane są bardziej „naturalne” warunki, w których może dochodzić do zatrzymania transkrypcji mitochondrialnego DNA (stalled transcription)? Czy mechanizmy prowadzące do zatrzymania transkrypcji/zatrzymania polimerazy RNA mają związek z redukcją poziomu/liczby kopii mtDNA? Czy wiedza dotycząca wpływu stresu na zaburzenia/blokadę transkrypcji genomowego DNA może być tu pomocna, czy też mechanizmy regulacji ekspresji mtDNA vs gDNA są inne? Czy MTRES1 może brać udział w naprawie mtDNA?

Co ciekawe, część wyników badań przedstawionych w publikacji nr 1 została potwierdzona przez innych autorów, badających MTRES1 w kontekście jego udziału w translacji. Wykazali oni, że MTRES1 wiąże się z dużą podjednostką rybosomu mitochondrialnego w sposób zależny od RNA, a jego wyciszenie wpływa na zahamowanie translacji i defekty wzrostu komórek. Doktorantka dyskutuje podobieństwa i różnice warunków eksperymentalnych, mogących wpływać na obserwowane wyniki badań. Opisuje również potencjalny udział innych kandydatów wyłonionych w badaniach proteomiki ilościowej w regulacji ekspresji mtDNA w warunkach stresu. Ciekawa i wnikliwa

dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Rozdział ten czyta się z dużą przyjemnością, znajdując odpowiedzi na wiele pytań pojawiających się podczas analizy pracy.

Podsumowując, stwierdzam że recenzowana praca doktorska Pani mgr Anny Kotrys pt. **„Analiza funkcjonalna białka C6orf203, nowego czynnika zaangażowanego w metabolizm RNA w mitochondriach człowieka”** oraz publikacje naukowe będące jej podstawą stanowią istotny wkład w rozwój badań nad biologią mitochondriów. Biorąc pod uwagę zarówno oryginalność wyników badań jak i sposób przygotowania rozprawy stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca w pełni odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Anny Kotrys do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoki poziom naukowy przedstawionych badań, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.



Marta Olejniczak