



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 4.05.2020

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod opieką dr hab. Romana Szczęsnego. Praca została przedstawiona w języku angielskim jako zbiór trzech tematycznie powiązanych publikacji, w których mgr Anna Kotrys jest pierwszą autorką. Dwie prace są pracami doświadczalnymi, a jedna jest pracą przeglądową. Prace te są wieloautorskie, zatem obok prac znajdują się oświadczenia części współautorów. Z podanych przez innych współautorów informacji jasno wynika główna rola Kandydatki w doświadczeniach opisanych jako Jej wkład w daną publikację, a ponadto w przygotowaniu manuskryptów i odpowiedziach dla recenzentów. Prace ukazały się w bardzo dobrych czasopismach naukowych – Nucleic Acids Research (wiodące czasopismo dla badań nad kwasami nukleinowymi), Methods in Molecular Biology i praca przeglądowa - w Cells.

Praca dotyczy badania regulacji metabolizmu RNA w mitochondriach człowieka i bardzo frapującej obserwacji, że w pewnych przypadkach zaburzenia w replikacji DNA mitochondrialnego nie wpływają na poziom transkryptów. Odkrycie to sugerowało, że muszą istnieć mechanizmy kompensujące brak mtDNA, polegające albo na zwiększonej wydajności transkrypcji albo na zwiększonej stabilności mitochondrialnych RNA. To stwierdzenie stało u podstawy założonej hipotezy badań. W serii eleganckich doświadczeń Kandydatka zidentyfikowała białko, którego ekspresja jest indukowana stresem hamowania replikacji mtDNA, scharakteryzowała jego budowę, lokalizację i częściowo funkcje. O ile sama identyfikacja białka została przeprowadzona jeszcze na etapie pracy magisterskiej mgr Anny Kotrys, to jego charakterystyka została przedstawiona w pracy doktorskiej.



Pierwszy z przedstawionych eksperymentów opisuje schemat doświadczenia, które doprowadziło do identyfikacji białka C6orf203 (później nazwanego MTRES1). W doświadczeniach przedstawionych na rysunku 2 pracy zabrakło mi kontroli mierzenia poziomu mtDNA i RNA, zakładam, że taki eksperyment był rutynowo przeprowadzany, jak to pokazano w publikacji? Na ile stosowane stężenie EtBr hamowało replikację mtDNA, a na ile jądrowego? Czy identyfikując „ciekawe” białka kierowała się Pani ich lokalizacją, opisaną/sugerowaną funkcją? Przykładowo, czy identyfikowała Pani PGC1 α jako białko zmieniające poziom w warunkach stresowych, albo czy obserwowała Pani spadek POLRMT i TFAM? Z Dyskusji Pani wyników dowiedziałam się, że wyselekcjonowany został również uniporter jonów Ca⁺² wewnętrznej błony mitochondrialnej, a konkretnie jego dwie podjednostki regulatorowe. Czy wg Pani jeszcze jakieś inne interesujące białka powinny być również brane pod uwagę gdy chodzi o przyszłe badania?

Analiza bioinformatyczna białka C6orf203/MTRES1 wykazała, że białko to jest kodowane w genomie jądrowym, ma sygnał lokalizacji mitochondrialnej, znajduje się w bazie mitochondrialnych białek MitoCarta 2.0, a także, że ma domenę wiążącą RNA typu S4. Przeprowadzone doświadczenie nad lokalizacją białka w fuzji EGFP potwierdziło, że białko to znajduje się w mitochondriach, a w eleganckim doświadczeniu z izolacją mitochondriów, mitoplastów i obtrawianiu proteinazą K udowodniła, że białko to znajduje się w matriks mitochondrialnej. W opisie rysunku 3 zabrakło informacji, że proteinazą K obtrawiano mitochondria i mitoplasty przed zastosowaniem detergentów Triton X-100 i digitonina. Opis taki znajduje się w Materiałach i Metodach opublikowanej pracy.

W kolejnym doświadczeniu Kandydatka sprawdzała właściwości wiązania RNA przez badane białko C6orf203/MTRES1. W tym celu immunoprecypitowała usieciowane kompleksy rybonukleoproteinowe C6orf203/MTRES1-EGFP i samo EGFP jako kontrola, a następnie stosując RT-qPCR wykazała, że w pierwszych kompleksach identyfikuje szereg RNA mitochondrialnych, bez szczególnej preferencji wiązania



jakiegoś RNA. Bezpośredniego dowodu na wiązanie RNA dostarczył eksperyment typu EMSA, w którym udowodniono wiązanie 7SRNA przez C6orf203/MTRES1. Kolejne doświadczenia rzuciły światło na rolę białka C6orf203/MTRES1 w odpowiedzi komórek na zahamowanie replikacji. Kandydatka uzyskała stabilne linie komórkowe z wyciszonym genem *C6orf203/MTRES1* poprzez indukowany sztuczny mikroRNA, a także linie z nadekspresją tego genu, przy czym nadekspresjonowano wariant białka w tle linii niosącej indukowaną kasetę ze sztucznym mikroRNA, ale gen białka *C6orf203/MTRES1* niósł mutacje synonimiczne, uniemożliwiające wydajne wiązanie mikroRNA i hamowanie ekspresji genu. Tak zaprojektowany eksperyment pozwala na ocenę, czy obserwowane zjawiska pod wpływem wprowadzonego sztucznego mikroRNA nie są przypadkiem efektem działania mikroRNA na inne docelowe mRNA poza mRNA *C6orf203/MTRES1*. Bardzo podoba mi się tak skonstruowana kontrola dla wyeliminowania możliwości niepożądanych efektów sztucznego mikroRNA. W wyniku przeprowadzonego i zanalizowanego doświadczenia typu RNAseq wykazano, że w warunkach normalnych wyciszenie genu *C6orf203/MTRES1* obniża jedynie poziom transkryptów z rejonu kontrolnego NCR, przede wszystkim 7SRNA. 7SRNA jest zaangażowany z syntezę startera replikacji mtDNA, a także jest negatywnym regulatorem transkrypcji mtDNA. Czy obserwowała Pani zaburzenia replikacji mtDNA, w komórkach hodowanych w kontrolnych warunkach, będące skutkiem obniżenia poziomu 7SRNA? Co można też powiedzieć o poziomie innych transkryptów w aspekcie obniżonego poziomu 7SRNA? Czy tak naprawdę niezmienny poziom pozostałych transkryptów może być wtórnym efektem obniżonego poziomu 7SRNA? Tym ciekawsza jest obserwacja, w której dokonano tych samych analiz w przypadku nadekspresji *C6orf203/MTRES1*. Okazało się, że nadekspresja przywraca normalny poziom 7SRNA. Rysunek 3C pokazuje w lewym panelu 7SRNA, którego poziom wydaje się być taki sam w komórkach linii rodzicielskiej (293) jak i w liniach z nadekspresją *C6orf203/MTRES1*, niezależnie czy mamy do czynienia z wersją wiążącą RNA czy nie. Nie rozumiem,



czemu w warunkach kontrolnych gdy brak *C6orf203/MTRES1* widzimy obniżenie 7SRNA, a gdy dodamy nadmiar zmutowanego *C6orf203/MTRES1*, niewiążącego RNA, w warunkach kontrolnych mamy taką samą ilość transkryptu jak w WT? Czy mechanizm działania *C6orf203/MTRES1* w przypadku 7SRNA jest inny i nie wymaga zaangażowania domeny wyznaczonej jako wiążąca RNA? Problem ten jest skwitowany w dyskusji pracy jednym zdaniem, a ja chętnie podyskutowałabym na ten temat. Z kolei w warunkach podania EtBr, gdy mamy zahamowaną replikację/transkrypcję, wyraźnie widać pozytywny efekt nadekspresji dzikiego wariantu *C6orf203/MTRES1* na poziom 7SRNA, podczas gdy zmutowana wersja białka, nie mogąca wiązać RNA, tego efektu nie daje.

Wykorzystując opracowaną przez siebie i innych współautorów technikę ilościowego pomiaru transkrypcji w pojedynczej komórce przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej udało się mgr Annie Kotrys dokonać kolejnych ciekawych obserwacji na temat funkcji białka *C6orf203/MTRES1*. Wykorzystując inhibitory transkrypcji, których mechanizmy działania różnią się (aktynomycyna D, EtBr i kordycepina) wykazała, że za każdym razem efekt opiekuńczy badanego białka był widoczny. W swoim komentarzu do prac Autorka ogólnie pisze, że mechanizm działania badanego białka jest bardziej ogólny, niezależny od etapu hamowania transkrypcji. Ciekawe jest to stwierdzenie, aczkolwiek trzeba też pamiętać, że kordycepina, jako inhibitor inkorporacji nukleotydów do rosnącego łańcucha RNA, hamuje również polimerazy poliA. Przypuszczam, że mt poliA polimerazę hamuje również, a to już będą efekty nie tylko samej transkrypcji zależnej od DNA, ale też efekty potencjalnej wydajności degradacji. W swoim komentarzu Autorka pisze, że badała również stabilność transkryptów w warunkach podwyższonej ekspresji *C6orf203/MTRES1* i nie widać pozytywnego wpływu białka na stabilność transkryptów. Te doświadczenia nie zostały jednak lepiej przedstawione w komentarzu do publikowanych prac. Niemniej jednak, wynikiem tych doświadczeń jest stwierdzenie, że *C6orf203/MTRES1* działa na etapie transkrypcji, a nie na etapie potranskrypcyjnym. Wiarygodności tym



dowodowi dodaje kolejne doświadczenie, w którym Autorka wykonała koimmunoprecypitację dla białka C6orf203/MTRES1-EGFP i zidentyfikowała wśród białek współimmunoprecypitowanych mitochondrialną polimerazę RNA (POLRMT) i mt czynnik transkrypcyjny TFAM. Co ciekawe, Autorka pokazała, że oddziaływania C6orf203/MTRES1 z POLRMT są niezależne od RNA, a czynnika transkrypcyjnego TFAM – zależą od obecności RNA. Jako że oba białka oddziałujące z C6orf203/MTRES1 są już obecne w kompleksie preinicjującym transkrypcję, można zaryzykować stwierdzenie, że C6orf203/MTRES1 działa na etapie inicjacji transkrypcji. Co więcej, oddziaływania są obecne zarówno w komórkach traktowanych jak i nietraktowanych EtBr. To z kolei sugeruje, że nie te oddziaływania są odpowiedzialne za różnice we wpływie C6orf203/MTRES1 na poziom 7SRNA w warunkach kontrolnych i stresowych. Zastanawiam się jaki był proces dedukcji który doprowadził do identyfikacji akurat POLRMT i TFAM jako białek maszynierii inicjującej transkrypcję oddziałujących z C6orf203/MTRES1. Czy sprawdzono też inne białka tej maszynierii i w dodatku nie tylko inicjującej transkrypcję? W pracy przetestowano jedynie ewentualność oddziaływania C6orf203/MTRES1 z wybranymi białkami mito- rybosomów, a wynik był negatywny. Czy wykonano doświadczenie typu IP z wykorzystaniem przeciwciał anti-EGFP i przeprowadzono analizę białek ko-immunoprecypitujących stosując spektrometrię mas? A jeśli tak to czy zidentyfikowano również inne białka oddziałujące z badanym?

Na koniec omawiania tej części doktoratu mam jeszcze jedno pytanie: czy sprawdzała Pani poziom mtDNA pod wpływem nadekspresji C6orf203/MTRES1 w warunkach podania EtBr?

Osobnego komentarza wymaga opracowanie techniki pomiaru wydajności transkrypcji lub pomiaru stabilności transkryptu *in cellulo*, z rozdzielczością do pojedynczej komórki. Krótko podsumowując to osiągnięcie – Kandydatka wraz ze współautorami pracy przygotowała protokół takiej techniki, która opiera się na włączaniu do transkryptu BrU, a następnie wykorzystaniu przeciwciał anti-BrU i



drugorzędowych przeciwciał wyznakowanych fluoroforem i skierowanych na przeciwciała szczura, do wizualizacji włączonego analogu nukleotydu urydynowego. Można w ten sposób mikroskopowo obliczyć i porównać wydajność transkrypcji w poszczególnych komórkach, a przy zastosowaniu inhibitorów transkrypcji – badać stabilność RNA. To bardzo ciekawa technika, z pewnością warta polecenia.

Wreszcie w skład pracy doktorskiej wchodzi bardzo interesująca praca przeglądowa, omawiająca najnowsze dane na temat regulacji ekspresji genów w mitochondriach człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem tych mechanizmów, w które zaangażowane są cząsteczki RNA i białka wiążące RNA.

Całość rozprawy doktorskiej jest opatrzona ciekawym wstępem. Znalazłam w nim pewną niezręczność, mianowicie pada tam zdanie „Moreover, all subunits of mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) are also imported into mitochondria”.

Myślę, że Autorce chodziło o białka podjednostek rybosomowych, które są importowane do mitochondriów. Czytanie wstępu wyindukowało we mnie następujące pytanie: jaki jest stosunek mtRNA/mtDNA w stanie zdrowia, a także jak mocno zmienia się ten stosunek przy obniżeniu liczby kopii mtDNA w różnych chorobach? Część wynikowa jest opracowana bardzo dobrze, zrozumiale i znakomicie opisuje dane zawarte w publikacjach. Część poświęcona dyskusji wyników jest również interesująco napisana, prezentuje też model oparty o wyniki własne jak może działać C6orf203/MTRES1. Dyskusja nad rolą badanego białka z kolei sprowokowała mnie do zadania kolejnego pytania, na które nie znalazłam odpowiedzi w pracy: Co wiadomo na temat ekspresji MTRES1 podczas rozwoju u ssaków? Czy jest to białko ekspresjonowane w czasie embriogenezy?

Na koniec chciałabym by Pani mgr Anna Kotrys odpowiedziała na pytanie jak widzi dalsze etapy prac nad głębszym zrozumieniem roli C6orf203/MTRES1 w metabolizmie mitochondrialnego RNA.

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest w moim przekonaniu wybitnym osiągnięciem mgr Anny Kotrys. Autorka wyjaśniła funkcje badanego białka stosując



całą paletę technik biochemicznych, biologii molekularnej i bioinformatycznych. O jakości uzyskanych wyników, ich znaczeniu dla rozumienia funkcjonowania mitochondriów świadczą najlepiej czasopisma w których zostały opublikowane uzyskane dane. Jeszcze raz napiszę, że we wszystkich tych pracach mgr Anna Kotrys jest pierwszą autorką. Warto podkreślić, że dorobek naukowy Pani mgr Anny Kotrys nie ogranicza się do tych trzech prac wchodzących w skład doktoratu. Jest jeszcze współautorką trzech prac, które ukazały się w Molecular Cell, Stem Cell Rev. Rep. i PLoS One. Warto nadmienić, że mgr Anna Kotrys jest laureatką programu Etiuda w NCN.

Z całym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Anny Kotrys do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wyjątkową jakość i oryginalność uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.


Zofia Szweykowska-Kulińska