

**Prof. dr. hab. Hanna Janska**

**hanna.janska@uwr.edu.pl**

Wrocław, 22.06.2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek zatytułowanej „Chloroplast retrograde control of miRNA expression in response to high light stress. Rola retroaktywnych sygnałów chloroplastowych w zależnej od miRNA odpowiedzi roślin na stres świetlny”**

Komunikacja na drodze chloroplasty-jądro komórkowe (ang. retrograde signaling), występuje gdy chloroplasty, zwłaszcza w warunkach stresowych takich jak np. wysokie natężenie światła, przekazują informacje o swoim stanie do jądra, indukując w ten sposób szeroki zakres adaptacji komórkowych. W odpowiedzi na sygnały chloroplastowe ekspresja genów jądrowych jest modulowana, między innymi genów kodujących małe, regulatorowe cząsteczki RNA (miRNA). Główną funkcją małych, niekodujących miRNA jest postranskrypcyjna regulacja ekspresji genów poprzez oddziaływanie z mRNA. Lepsze poznanie uczestników tej kaskady sygnałowej i powiązań między nimi ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia odporności roślin na stres, odporności na szybko zmieniające się środowisko.

Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek została wykonana w Instytucie Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Jej promotorem jest prof. dr hab. Marcin Filipecki, a promotorem pomocniczym dr inż. Piotr Gawroński. Celem pracy była analiza zmian w ekspresji miRNA wywołanych ekspozycją rośliny na krótkotrwały stres wysokiego natężenia światła jak również poszukiwanie, która ze znanych dróg sygnalizacji wstecznej, czyli sygnalizacji od chloroplastu do jądra, uczestniczy w uruchomieniu zmian w populacji jądrowo kodowanych miRNA pod wpływem stresu świetlnego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku angielskim, stosunkowo krótka, bo licząca 109 stron, z czego Wstęp stanowi 35 stron, Materiały i metody 11 stron, Wyniki 19 stron, a Dyskusja 7 stron. Ponadto, praca zawiera wymagane Streszczenia



w języku polskim i angielskim oraz Spis treści, Spis skrótów, Hipotezy, Cele pracy, Wnioski, Tabele, Figury dodatkowe i Piśmiennictwo. W pracy zamieszczono również informacje o finansowaniu badań opisanych w rozprawie. Były to dwa projekty NC, typu Preludium kierowanym przez doktorantkę oraz typu OPUS kierowanym przez promotora. W pracy podano również dane bibliograficzne dwóch publikacji, które zawierają wyniki opisane w rozprawie. Wstęp napisany jest zwięźle, choć porusza szeroki zakres zagadnień związanych z tematyką pracy, co świadczy o umiejętności autorki do syntezy i analizy informacji.

Najwięcej informacji dotyczy biogenezy miRNA i przekazywania informacji o stresie, wewnątrz komórki, pomiędzy komórkami i w komunikacji na duże odległości. Dowiadujemy się, że znane są badania wskazujące, że światło jest ważnym regulatorem biogenezy miRNA oraz że istnieje kilka dróg komunikacji retroaktywnej pomiędzy chloroplastem a jądrem. Innymi słowy autorka zwięźle i umiejętnie przedstawia podłoże literaturowe potrzebne do zrozumienia celu pracy i późnej opisanych wyników. W związku z moimi zainteresowaniami roślinnymi mitochondriami chciałabym się dowiedzieć czy rola Sal1 w mitochondriach, enzymu kierowanego do dwóch kompartmentów, jest podobna do tej opisanej dla chloroplastowej izoformy? Z rysunku 6 wynika, że cząsteczki PAP nie są transportowane do mitochondriów, czy to możliwe?

Większość wyników przedstawionych w ocenianej pracy było już pozytywnie recenzowana przez specjalistów ponieważ rozprawa doktorska obejmuje doświadczenia opisane w dwóch opublikowanych artykułach naukowych. Jeden z nich pt. "Exposure to high-intensity light systemically induces micro-transcriptomic changes in *Arabidopsis thaliana* roots" ukazała się w roku 2019 w *International Journal of Molecular Science*, a drugi pt. „Plastid retrograde regulation of miRNA expression in response to light stress” został opublikowany w *BMC Plant Biology* w roku 2022. Należy podkreślić, że w obu pracach Pani Barczak-Brzyżek jest pierwszym autorem. Co więcej, z informacji podanych w publikacjach wynika, że jej wkład w wymienianych pracach nie polegał tylko na wykonywaniu eksperymentów, ale uczestniczyła ona również w tworzeniu planu badań, formułowaniu hipotez, pisaniu publikacji. We współczesnej nauce współpraca z innymi jest niezbędną umiejętnością, ale z opisów w rozprawie doktorskiej nie było dla mnie jasne, które doświadczenia wykonywała sama Doktorantka, a które ze współpracującymi osobami. Zazwyczaj publikacje zawierają mniej informacji niż rozprawa doktorska, w ocenianej pracy doktorskiej jest odwrotnie. Autorka sugeruje poszukiwanie szczegółów dotyczących materiałów i metod czy wyników w publikacjach. Taka strategia nie ułatwiała mi czytania rozprawy.

W większości opis materiałów i metod był dla mnie jasny i wystarczający, ale mam pytania związane z biblioteką miRNA, która była zlecona do wykonania firmie Genomed. Interesuje mnie całkowita liczba odczytów w bibliotekach, nie tylko liczba odczytów różnicujących. Innymi słowy jak głębokie były otrzymane biblioteki i jaki procent stanowiły sekwencje różnicujące? Czy w bibliotekach mogą występować sekwencje małych RNA pochodzenia chloroplastowego czy mitochondrialnego, myślę tu o tzw. cosRNA powstających w wyniku ochrony mRNA przed nukleolityczną degradacją przez białka wiążące RNA (RBP)?

Badania rozpoczęto od potwierdzenia, że zastosowane warunki doświadczeń czyli 2-godzinna ekspozycja roślin na wysokiej intensywności światło (HL) wywołuje stres. Weryfikację przeprowadzono na poziomie fizjologicznym (fotoinhibicja) i molekularnym (ekspresja markerów stresu oksydacyjnego). W rozprawie doktorskiej materiałem w badaniach ekspresji genów były całe rośliny lub rozety (nie jest to jednoznacznie opisane), natomiast w publikacji eksperymenty przeprowadzono tylko dla korzeni po ich odcięciu od rośliny poddawanej stresowi. We wszystkich przypadkach obserwowano zmiany transkrypcyjne świadczące o odpowiedzi rośliny na stres świetlny, ale w przypadku genów *CAT2* i *RRTF1* zmiany ekspresji były w innym kierunku w zależności od materiału biologicznego. Prosiłabym o komentarz do tej obserwacji.

Pozostałe badania w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek są oparte o analizę wyników uzyskanych z sekwencjonowania mikrotranskryptomu rozet lub korzeni *Arabidopsis*. Wbrew moim oczekiwaniom, zmiany w miRNA ekspresji w korzeniach i rozetach pod wpływem krótkiego stresu HL zarówno pod względem liczby jak i zakresu nie były duże. Należy podkreślić, że zmiany były weryfikowane metodami opartymi na qPCR i nie dla wszystkich weryfikacja okazała się pozytywna. Jak opisano w pracy niektóre z zidentyfikowanych miRNA były już znane z literatury, ale mnie nurtuje pytanie, czy udało się znaleźć miRNA nie opisane dotychczas. Interesujący i inspirujący wynik otrzymano gdy korzenie oddzielono od rozet i naświetlano HL. W tym przypadku nie obserwowano zmian w puli miRNA. Wynik ten świadczy, że sygnał indukujący zmiany powstaje w rozecie i jest przekazywany do korzenia. Do dalszych badań wybrano dwa indukowane światłem miRNA: 163 i 840. Wykazano, że poziom ich prekursorów również ulega indukcji, ale zakres zmian nie są odzwierciedleniem tych określonych dla dojrzałych miRNA. Autorka po serii doświadczeń konkluduje, że niespójność w poziomach ekspresji wynika głównie ze zmian w stabilności i dojrzewaniu miRNA w stresie intensywnego światła, choć nie wyklucza również udziału różnic w efektywności transkrypcji. Należy dodać, że wyniki efektywności transkrypcji były nie jednoznaczne. Wynik z immunoprecyptacji chromatyny (nie ma różnic w wiązaniu się PolII

do *MIR* genów) był odmienny od wyniku uzyskanego z analizy aktywności promotora pri-miR163 z wykorzystaniem barwienia GUS (znacznie mocniejsze zabarwienie w warunkach stresu). Jednoznaczne natomiast wyniki osiągnięto wyznaczając czas półtrwania pri-miRNA używając kordycepiny jako inhibitora transkrypcji. Dla obu badanych pri-mRNA obserwowano spadek stabilności. Analizując dane z rysunku 27 zwraca uwagę zadziwiająco długi czas półtrwania pri-miR840 w warunkach kontrolnych. Prosiłabym o komentarz jakie czynniki/cechy struktury powodują taką nietypową stabilność? Biogenezę miRNA 163 i 840 badano również w dwóch mutantach charakteryzujących się zaburzeniami w tym procesie: *hyl1* mutant pozbawiony składnika kompleksu mikroprocesora zaangażowanego w dojrzewanie miRNA oraz *alx8* u którego jest zahamowana aktywność egzonukleazy 1 (XRN2) degradującej pri-miRNA. Zauważyłam pewną niezgodność pomiędzy rysunkami 28 i 29 w poziomie pri-miR163 w mutancie *hyl1* w stosunku do kontroli. Na rysunku 28 brak różnic podczas gdy na rysunku 29 jest widoczny i statystycznie ważny wzrost. W tekście jest odniesienie do porównywalnego poziomu pri-miR163 w mutantach *hyl1* (str.61). Proszę o wyjaśnienie.

Pozostałe rozdziały „Rezultatów” opisują wyniki doświadczeń mających na celu określenie, która ze znanych dróg komunikacji retroaktywnej bierze udział w przenoszeniu sygnału wysokiego natężenie światła w kierunku chloroplast-jądro zmieniając poziom ekspresji miRNA. Badania te prowadzono z zastosowaniem inhibitorów jak i odpowiednich mutantów rzodkiewnika. Zastosowanie dwóch strategii eksperymentalnych do odpowiedzi na to samo pytanie jest bardzo wartościowe, daje pełniejszy obraz i stwarza możliwość odrzucenia efektów niespecyficznych. Testowano następujące sygnały komunikacji retroaktywnej w roślinach po ich ekspozycji na wysokie natężenie światła: stan redox plastochinonu, drogi zależne od tlen singletowego i drogę zależną od PAP (stosując tylko mutanty *alx8*). Niezbyt rozumiem dlaczego rozdział 5.8 nie znalazł się jako podrozdział rozdziału 5.10. Podobny charakter zmian obserwowany na poziomie pri-miRNA niezależnie od stanu redoks plastochinonu sugerował, że sygnał stresowy ma źródło wyżej w łańcuchu fotosyntetycznym i dlatego skupiono się na fotosystemie II w którym generowany jest tlen singletowy pod wpływem HL. Okazało się, że tylko jedna z dróg retroaktywnych uruchamianych przez tlen singletowy ma wpływ na ekspresję miRNA, a mianowicie droga w której uwalnia się  $\beta$ -cyklocytral ( $\beta$ -CC) w wyniku utleniania karotenoidów, a następnie sygnał przenoszony jest do jądra z udziałem białka MSB1. Potraktowanie roślin  $\beta$ -CC skutkowało akumulacją pri-miR163 i pri-miR840. Kluczową rolę tego szlaku sygnałowego w regulacji ekspresji miRNA w stresie HL potwierdzają również badania z mutantami *msb1*.

Dyskusja jest intensywna i ciekawie napisana. Tylko w niewielu miejscach podane informacje przeniosłabym do wstępu. Czytając ją uzyskałam odpowiedź na wiele pytań, jakie zadawałam sobie w czasie czytania wyników. Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek znakomicie skonfrontowała uzyskane przez siebie wyniki z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych autorów. Dodatkowo rozważane są aspekty, które nie były eksperymentalnie testowane w pracy np. modyfikacje pri-miRNA. Pozytywnie zaskoczył mnie ostatni podrozdział dyskusji w którym kontynuowana jest historia miR163, a dokładnie jaka może być jego funkcja biologiczna. Wyselekcjonowano przy zastosowaniu odpowiedniego programu bioinformatycznego mRNA, które mogą łączyć się z miR163. Wśród nich jest chloroplastowa proteaza DEG2 uczestnicząca w degradacji składników fotosystemu II. Autorka rozprawy konkluduje, że ekspresja tej proteazy może być negatywnie regulowana przez miR163 poprzez hamowanie translacji i epigenetycznie w wyniku DNA metylacji.

Podsumowując, w pracy doktorskiej mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek przedstawiono nowe i oryginalne obserwacje naukowe. Szeroka gama eksperymentów jest oparta o niezbędne kontrole co świadczy o jakości i solidności wyników. Nie tylko dokumentacja, ale interpretacja uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. Fakt opublikowania wyników potwierdza tę opinię. Bardzo mi się podobało, że w pracy pojawiło się wiele estetycznych i informatywnych rysunków.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek pt. „Chloroplast retrograde control of miRNA expression in response to high light stress. Rola retroaktywnych sygnałów chloroplastowych w zależnej od miRNA odpowiedzi roślin na stres świetlny” spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668, z późn. zm.). Wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Hanna Jańska

