



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

Poznań, 17.06.2023

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek zatytułowanej „Rola aktywnych sygnałów chloroplastowych w zależnej od miRNA odpowiedzi roślin na stres świetlny”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana w Instytucie Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Marcin Filipecki, który od lat zajmuje się molekularnymi i fizjologicznymi aspektami odpowiedzi roślin na stesy biotyczne i abiotyczne. Niemniejsza praca doktorska wpisuje się w główny nurt badawczy promotora i dotyczy zmian mikrotranskryptomu *Arabidopsis thaliana* pod wpływem stresu silnego światła. Doktorantka postawiła następujące hipotezy badawcze: (1) mikrotranskryptom *Arabidopsis* odpowiada na stres silnego światła, (2) informacja na temat stresu świetlnego jest przekazywana z części nadziemnej rośliny do korzeni, (3) w odpowiedzi na silne światło sygnał retrogradowy z chloroplastów przekazywany jest do jądra gdzie wpływa na ekspresję poszczególnych genów mikroRNA, a także na poszczególne etapy biogenezy mikroRNA. W moim przekonaniu Doktorantka przeprowadziła szereg doświadczeń, z których wyciągnęła wnioski odnoszące się do wszystkich elementów postawionych hipotez. Pragnę jednak zaznaczyć, że hipoteza zakładająca, że mikrotranskryptom odpowiada na stres silnego światła była odkrywcza jeszcze kilka lat temu, lecz stosunkowo niedawno tego typu obserwacje zostały już w *Arabidopsis* opisane przez innych (Tewari et al. 2021 *Frint in Plant Sci*; Li et al. 2021, *Cell and Developmental Biology*).

Praca doktorska ma klasyczny układ i rozpoczyna się streszczeniem, po nim następuje przegląd literatury, postawienie hipotezy badawczej, materiały i metody, wyniki i dyskusja. Nie mam uwag do konstrukcji pracy doktorskiej. Przegląd literatury jest ciekawie napisany, nie jest przeciążony szczegółami przez co zajmująco się go czyta. Mam pewne uwagi co do tej części pracy doktorskiej. Mianowicie opisując biogenezę mikroRNA Autorka jako główny model eksportu mikroRNA z jądra do cytoplazmy przedstawia udział białka HSTY –



głównego eksportera, natomiast dopiero na zakończenie dodaje, iż od jakiegoś czasu wiadomo, że głównym eksporterem tych cząsteczek do cytoplazmy jest białko Argonaute1 (Ago1), zawierające w swojej strukturze sygnały NLS i NES. Uważam, że skoro już wiadomo, że to nie białko HSTY (które obecnie uważa się, iż bierze udział w bardzo wczesnych etapach biogenezy mikroRNA), a Ago1 jest eksporterem mikroRNA to należało ten wątek wbudować w główny nurt opisu biogenezy mikroRNA, zostawiając już białko HSTY w spokoju.

Niejasny wydaje mi się również fragment mówiący o tym, że to Mediator ściąga do promotorów genów *MIR* Polimerazę RNA II. Tak naprawdę jest nim jeden z podstawowych czynników transkrypcyjnych TFII (TFIIB). Natomiast Mediator jest odpowiedzialny za oddziaływanie podstawowej maszyny transkrypcyjnej z czynnikami wiążącymi się z dalekimi elementami promotorowymi. Oczywiście znam pracę opisującą rolę Mediatora w rekrutowaniu RNA Pol II do loci *MIR* ale nie należy zapominać o głównej roli TFIIB.

Przegląd literatury wprowadza czytelnika zarówno w świat biogenezy mikroRNA jak i w odpowiedź rośliny na stres silnego światła. Na tej drugiej części rozprawy doktorskiej znam się zdecydowanie słabiej więc jedynie stwierdzam, że jest ciekawie i przystępnie napisana. Hipoteza badawcza i sposoby jej potwierdzenia/obalenia zostały jasno w pracy opisane.

Część metodyczna jest momentami dość zdawkowa. Wynika to z faktu, że Kandydatka jest pierwszą autorką dwóch prac opublikowanych w *BMC Plant Biology* i *IJMS* i często odwołuje się do tych prac gdy chodzi o szczegóły zastosowanych technik. To nie do końca jest właściwe podejście przy pisaniu rozprawy doktorskiej – Kandydatka mogła zdecydować się na napisanie jedynie streszczenia i zamieszczenia obu prac jako doktoratu, natomiast jeśli zdecydowała się już na pisanie rozprawy, to według mnie należało część metodyczną opisać dokładnie. Dodatkowo Kandydatka nie zamieszcza opublikowanych prac jako dodatku na końcu pracy.

Najważniejsza jest jednak część dotycząca wyników. W pierwszym etapie pracy Kandydatka wykazała, że warunki przeprowadzanego doświadczenia rzeczywiście indukują stres świetlny co objawia się fotoinhibicją fotosyntezy i uszkodzeniem fotosystemu II, a także indukcją ekspresji genów będących markerami stresu oksydacyjnego. Następnie Kandydatka



zsekwencjonowała mikrotranskrypty roślin hodowanych w warunkach kontrolnych i stresu świetlnego. Rośliny z warunków słabego światła przenoszono do warunków silnego światła, co wywoływało stres świetlny, który trwał dwie godziny, a następnie rośliny powracały do warunków kontrolnych, słabego światła. Analiza wyników sekwencjonowania sRNA wykazała, że zmiana poziomu mikroRNA w warunkach stresu świetlnego dotyczyła jedynie 21 mikroRNA, w tym siedmiu poziom był podwyższony, a czternastu obniżony. Należy również dodać, że zmiany poziomu były raczej niewielkie, aczkolwiek statystycznie istotne. Poziom kilku wybranych mikroRNA został przetestowany metodą TT-RT qPCR i potwierdzono zaobserwowane w wynikach sekwencjonowania sRNA zmiany. Do dalszych analiz wybrano dwie cząsteczki mikroRNA – bardzo dobrze zbadany miR163 i miR840. Poziom obu cząsteczek wzrastał pod wpływem stresu silnego światła. Swój wybór Kandydatka uzasadnia badaniami przeprowadzonymi przez innych badaczy, z których wynikało, że miR163 ulega indukcji pod wpływem światła w deetiolownych siewkach, a miR840 był opisany jako cząsteczka odpowiadająca na promieniowanie gamma. Można zatem stwierdzić, że pierwsza postawiona hipoteza badawcza została potwierdzona przez wyniki eksperymentalne, przeprowadzone przez Doktorantkę. Natomiast chętnie usłyszałabym komentarz Pani mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek na temat porównania zestawu mikroRNA, które ulegały zmianom w warunkach Pani eksperymentu z wynikami dwóch prac opisujących zmiany mikrotranskryptomu Arabidopsis pod wpływem silnego światła. Kolejną testowaną hipotezą było założenie, że sygnał związany ze stresem silnego światła jest przenoszony do korzeni. Aby zweryfikować postawioną hipotezę Kandydatka przeprowadziła sekwencjonowanie sRNA korzeni roślin poddanych stresowi i kontrolnych. Udało się zidentyfikować 22 mikroRNA, których poziom zmieniał się, w tym 17 miało podwyższoną akumulację, a 5 obniżoną. Nie wszystkie te wyniki zostały potwierdzone RT-qPCR. Pewne potwierdzenie wyników analizy sRNA udało się pokazać jedynie dla czterech mikroRNA. Aby upewnić się, że sygnał odpowiedzialny za zaobserwowane zmiany w poziomie mikroRNA rzeczywiście pochodził z rozety liściowej Arabidopsis wykonano doświadczenie, w którym odseparowano korzeń od rozety i dopiero wówczas zastosowano stres silnego światła. Wyniki



analizy poziomu mikroRNA, które ulegały zmianom gdy stres był zastosowany do całych roślin, a dokładnie do części nadziemnej, czyli rozety liściowej nie potwierdził tych zmian w odciętych korzeniach roślin poddanych stresowi silnego światła. Wynik ten zdecydowanie pokazuje, że sygnał związany ze zmianą poziomu mikroRNA przemieszczał się z rozety liściowej do korzenia. Ta część doktoratu wydaje mi się bardzo ciekawa i warta przyszłościowo rozwinięcia celem zidentyfikowania cząsteczki sygnalizacyjnej, przemieszczającej się z rozety liściowej do korzenia.

Analiza poziomu pri-miR163 pri-miR840 z poziomem dojrzałych cząsteczek mikroRNA nie korelowała satysfakcjonująco ze sobą sugerując inne niż transkrypcyjny mechanizmy regulacji poziomu mikroRNA. W pierwszym podejściu Autorka zastosowała doświadczenie immunoprecypitacji chromatyny stosując przeciwciała na „całkowitą” polimerazę II RNA i badała obecność RNA PolII w obrębie loci genów *MIR163* i *MIR840*. Autorka nie stwierdziła istotnych różnic ilościowych pomiędzy ilością RNA PolII w obrębie genów w warunkach kontrolnych i silnego światła. Zastanawiam się jednak czy przebieg krzywych ilości RNA PolII w poszczególnych miejscach genów nie jest mocno uśredniony. Raz, że widzimy tylko całkowitą polimerazę RNA II, a nie ufosforylowaną na Ser2 (elongacja) lub Ser5 (inicjacja). Ponadto polimeraza RNA II transkrybuje z prędkością od 1,5 – 3,5kb nt/min. Gen *MIR163* jest krótki (około 700 pz), a z rysunku 25C wynika, że gen *MIR840* jest być może nawet krótszy. Czy rozdzielczość techniki CHIP pozwala na zaobserwowanie ewentualnych różnic obsadzenia RNA PolII wzdłuż genu by wnioskować o pauzowaniach/przyspieszeniach enzymu? Jestem ciekawa zdania Doktorantki na ten temat. Wątpliwości dodatkowo wzbudza wynik aktywności promotora *MIR163* w fuzji z GUS, gdzie wyraźnie widać indukcję aktywności promotora pod wpływem silnego światła. Wynik ten bardziej odzwierciedla obserwacje wysokiego poziomu pri-miR163 i miR163 pod wpływem silnego światła. Szkoda trochę, że nie ma zamieszczonej obserwacji roślin z aktywnością promotora *MIR163* po przeniesieniu ponownym roślin do warunków słabego światła.

W kolejnym doświadczeniu wykonanym przez Doktorantkę przeprowadzono analizę stabilności prekursorów miRNA stosując klasyczną technikę hamowania aktywności RNA PolII przez kordycepinę i monitorowanie poziomu transkryptu w warunkach kontrolnych i



silnego światła. Wykazano, że w przypadku pri-miR163 warunki silnego światła nieznacznie zwiększają stabilność pri-miR163, natomiast nie pri-miR840. Trudno mi się odnieść do zaprezentowanych wyników gdyż nie ma policzonej istotności statystycznej poziomu pri-miR w badanych punktach czasowych. W tego typu doświadczeniach warto pamiętać, że kordycepina hamuje również aktywność polimerazy poli(A) co też może wpływać na obserwowane wyniki.

W kolejnym doświadczeniu Autorka postanowiła sprawdzić czy biogeneza obu miR163 i miR840 zależy od białka Hyl1, jednego z rdzeniowych komponentów roślinnego mikroprocesora. Potwierdziła, że białko Hyl1 ma istotne znaczenie w biogenezie miR163, natomiast odkryła, że biogeneza miR840 jest od tego białka niezależna. Mało tego, poziom pri-miR840 w mutancie *hyl1-2* nie ulega zmianie, a poziom miR840 gwałtownie wzrasta. To przyznam się jest bardzo ciekawym wynikiem i wartym głębszego zbadania wyjaśniającego uzyskane wyniki.

Wiadomo od kilku lat, że w warunkach stresu cieplnego sygnałem retrogradowym wędrującym z chloroplastów do jądra jest PAP, który na terenie jądra hamuje aktywność Xrn2 co chroni pri-miRNA przed degradacją. Czy PAP kumuluje się również w warunkach silnego światła i wpływa na biogenezę mikroRNA chyba dotychczas nie było badane, choć nie śledzę tej literatury tak dokładnie. Natomiast Kandydatka przeanalizowała poziom badanych pri-miR163 i 840 w mutancie z podwyższonym poziomem PAP. Czy wiadomo, że w tym mutancie *alx8* PAP kumuluje się w jądrze? Wyniki są niejednoznaczne i wskazują na inne zachowanie pri-miR163 i pri-miR840 jak i dojrzałych cząsteczek mikroRNA.

W kolejnym doświadczeniu Autorka postanowiła przeanalizować poziom DCL1 w warunkach słabego i silnego światła. Według Autorki nie ma różnic w poziomie DCL1 w porównywanych warunkach. Natomiast ja bałabym się na podstawie takiego „westernu” jak zaprezentowany na rycinie 30 wyciągać takie wnioski. Wręcz przeciwnie, uważam, że w warunkach HL widać nieco więcej DCL1. Ale bez ponownego powtórzenia tego doświadczenia to są tylko spekulacje.

W kolejnych doświadczeniach Autorka postanowiła zidentyfikować sygnał retrogradowy, który byłby odpowiedzialny za zmiany w poziomie pri- i mikroRNA pod wpływem silnego światła. Przepadała wpływ statusu plastochinonu (PQ, pula zredukowana versus pula utleniona) oraz wpływ ilości plastochinonu (dwa mutanty genów *SIN7* i *SID2*) na poziomy pierwotnych transkryptów i dojrzałych mikroRNA. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że sygnał retrogradowy nie płynie z poziomu PQ.

Skoro stan utlenienia/redukcji PQ wpływał tak samo na poziomy badanych cząsteczek Kandydatka założyła, że sygnał retrogradowy może być generowany w PSII, gdzie powstaje tlen singletowy 1O_2 . Jego potencjalną rolę jako induktora sygnalizacji retrogradowej przeprowadzono w tle mutantów, w których kumuluje się singletowy tlen. Szczególnie przebadane zostały mutanty dwóch genów białek jądrowych EX1 i EX2, które są zaangażowane w przekaz sygnału związany z tlenem singletowym. Wyniki badań poziomów badanych cząsteczek miR163 i miR840 na poziomie prekursorów wykazały, że i ta ścieżka nie odpowiada za swoiste zmiany poziomu prekursorów obu cząsteczek mikroRNA w warunkach silnego naświetlenia.



Inną ścieżką przekazu sygnału od tlenu singletowego jest rozpad β -karotenu do małych, lotnych związków chemicznych w tym β -cyklocitralu (β -CC), który indukuje ekspresję całej grupy genów przykładowo, *DRP* i *MBS1*, działających „poniżej” β -CC. Badania przeprowadzono działając bezpośrednio β -CC na rośliny jak i w tle mutantów wymienionych wyżej genów. Pod wpływem β -CC poziom pri-miR163 i pri-miR840 znacząco wzrastał, a poziom dojrzałych cząsteczek spadał, co dawało obiecujące wyniki gdy chodzi o udział β -CC w przekazywaniu informacji od tlenu singletowego, powstającego w warunkach silnego naświetlenia rośliny. W tle mutantu *mbs1* poziom pri-miR163 silnie się kumulował czego nie zaobserwowano w przypadku pri-miR840. Autorka tłumaczy uzyskane wyniki albo obecnością jeszcze innej ścieżki przekazu sygnału od tlenu singletowego, albo obecnością białka MBS2, które może w przypadku pri-miR840 pełnić rolę podobną jak MBS1 dla pri-miR163.

Podsumowując część wynikową chciałabym podkreślić, że wyniki uzyskane przez mgr inż. Anne Barczak-Brzyżek są bardzo ciekawe i otwierają perspektywę ciekawych badań na przyszłość. Doktorantce udało się zidentyfikować prawdopodobną ścieżkę przekazu sygnału od tlenu singletowego poprzez β -CC. Ponadto bardzo intrygujący jest proces dojrzewania dwóch wybranych do badań mikroRNA – miR163 i miR840. Jeden z nich stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną, a drugi jest kodowany w rejonie 3'UTR genu *PPR* i nakłada się z 3'UTR genu *WHIRLY3* usadowionego na nici przeciwnej DNA. mRNA obu genów, jak pisze Autorka, są przypuszczalnymi sekwencjami docelowymi dla miR840. Nie bardzo rozumiem jak obie cząsteczki mRNA, kodowane na niciach przeciwnych mogą być docelowe dla jednego miRNA840. Czyba że sekwencja docelowa jednego z nich jest w innym miejscu mRNA *PPR*? Czy też może obie cząsteczki miR840 i miR840* mogą być brane pod uwagę? Intryguje mnie też, że oba przypadki analizowanych genów *MIR* pod kątem poziomu transkryptu i dojrzałego mikroRNA zachowują się najczęściej w sposób odwrotny. Uważam, że przesłedzenie biogenezy miR840 byłoby bardzo ciekawym zadaniem badawczym samym w sobie.

Uważam, że bardzo jest prawdopodobne, że miR840 stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną, nakładającą się z genem *PPR*. Warto byłoby sprawdzić czy tak rzeczywiście jest.

Dyskusja pracy jest napisana ładnym językiem, logiczna i nierozwlekła, omawiająca wyniki pracy na tle dostępnej literatury przedmiotu, którą Doktorantka dobrze zna.

Podsumowując całość pracy uważam, że niesie ona ze sobą spory ładunek nowości naukowej, wyniki zostały opublikowane w dwóch publikacjach, w których Kandydatka jest pierwszą Autorką. Uwagi i pytania jakie zawarłam w mojej ocenie rozprawy doktorskiej nie wpływają na moją ogólnie pozytywną ocenę tej pracy.

Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW o dopuszczenie mgr inż. Anny Barczak-Brzyżek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia Szwejkowska-Kulińska