

Recenzja pracy doktorskiej mgr Agnieszki Mickiewicz-Piotrowskiej

dr hab. Witold Rudnicki, prof. UWB
Instytut Informatyki, Uniwersytet w Białymstoku,
ul. Konstantego Ciołkowskiego 1M, 15-245 Białystok,
tel. +48 85 738 8276
e-mail: W.Rudnicki@uwb.edu.pl

Skierniewice, 7-09-2021

Ocena pracy doktorskiej pt. „*Analiza strukturalnych uwarunkowań wybranych etapów biogenezy matrycy regulatorowych RNA u Arabidopsis thaliana*” przygotowanej przez mgr Agnieszka Mickiewicz-Piotrowską, pod opieką prof. dr hab. Marty Szachniuk i dr Joanny Sarzyńskiej, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.

Omówienie rozprawy

Rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim. Została ona przygotowana na podstawie materiału z pięciu artykułów opublikowanych wcześniej w międzynarodowych czasopismach. W dwóch z tych artykułów doktorantka była pierwszą autorką a w jednym drugą.

Praca składa się z pięciu rozdziałów, poza tym w pracy umieszczone są: spis skrótów używanych w pracy, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografia oraz załączniki. Pierwszy rozdział zawiera wstęp opisujący problematykę krótkich regulatorowych sekwencji RNA. W drugim rozdziale autorka przedstawiła cel pracy. Rozdział trzeci poświęcony jest opisowi materiałów i metod stosowanych w pracy. W rozdziale czwartym znalazły się wyniki wraz z dyskusją a rozdział piąty jest poświęcony podsumowaniu wyników. Dość nietypowo, streszczenia pracy znalazły się po pięciu rozdziałach stanowiących zasadniczą część pracy. Po streszczeniach została umieszczona bibliografia, pracę zamyka pięć załączników zawierających wybrane materiały i wybrane wyniki pracy.

Rozdział pierwszy zajmuje 19 stron i jest poświęcony wyczerpującemu opisowi różnych mechanizmów wyciszania RNA (RNA silencing) ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów występujących u roślin. Autorka przedstawiła różne rodzaje miRNA, a także procesy molekularne wiodące do ich generowania wraz z uczestniczącymi w tych procesach białkami. Znacząca część rozdziału została poświęcona szczegółowemu opisowi białek typu Dicer - ich funkcji i strukturze.

Rozdział drugi ma jedną stronę i przedstawia cel pracy. Cel jest sformułowany dość ogólnie, tak by objąć dwa projekty opisywane w rozprawie pod wspólnym parasolem. Jest sformułowany jako „poznanie strukturalnych uwarunkowań biogenezy roślinnych małych regulatorowych RNA na przykładzie wybranych białek oraz cząsteczek RNA pochodzących z rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*”. Rozdział zawiera jego uzasadnienie oraz mapowanie na zadania badawcze opisywane w projekcie.

Rozdział trzeci „Materiały i metody” jest krótki - liczy dwanaście stron. Podrozdział materiały zawiera opis podstawowych materiałów: sekwencji RNA, struktury białek a także listę programów komputerowych użytych w badaniach. Podrozdział metody opisuje na ogólnym poziomie metody stosowane w badaniach: przewidywanie struktur drugorzędowych RNA, dopasowywanie sekwencji aminokwasowych, modelowanie struktury białek, dynamikę

molekularną, a także eksperymentalne metody użyte do weryfikacji działania programu amiRNA Designer.

Rozdział czwarty „Wyniki i dyskusja” jest najobszerniejszy w pracy - liczy 65 stron i zawiera szczegółowy opis badań zrealizowanych w projekcie. Jest podzielony na dwa podrozdziały „ami RNA Designer” i „Modelowanie AtDCL4”. Każdy z tych podrozdziałów zawiera kompletny opis badań zrealizowanych w projekcie, łącznie z pogłębionym opisem metodologii, wynikami i ich dyskusją.

Rozdział piąty zawiera krótkie, dwustronicowe podsumowanie uzyskanych wyników.

Kolejne dwa rozdziały to streszczenie rozprawy w języku polskim (rozdział szósty) i angielskim (rozdział siódmy).

W rozdziale ósmym przedstawiona jest bibliografia obejmująca około 250 pozycji.

Jako załączniki doktorantka umieściła w rozprawie:

1. listę sekwencji miRNA używanych w badaniach,
2. wybrane sekwencje genów ulegających ekspresji w *A. thaliana*
3. sekwencje kodujące genów AGB1 i IMM1
4. Drzewo filogenetyczne 43 białek DCL
5. MSA 43 sekwencji białek DCL

Ocena rozprawy

W rozprawie przedstawione są dwa powiązane ze sobą tematyką biologiczną, ale niezależne różniące się metodologią projekty badawcze - opracowanie narzędzia do generowania amiRNA: amiRNA Designer oraz modelowanie przestrzennej struktury białka AtDCL4.

Projekty były realizowane na przestrzeni wielu lat, pierwsza publikacja stanowiąca podstawę pracy ukazała się w roku 2010, ostatnia w roku 2017.

Artykuły stanowiące podstawę pracy zostały w większości opublikowane w czasopiśmie międzynarodowych średniej klasy za wyjątkiem przeglądowej publikacji poświęconej białkom typu Dicer, opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acid Research*.

Rozbieżności tematyczne, oraz odległość w czasie między publikacją pierwszej pracy niewątpliwie stanowiły duży problem przy tworzeniu rozprawy i odbiły się na jej konstrukcji.

W związku z tym w ocenie rozprawy oddzielnie zajmę się dwoma wchodzącymi w jej skład projektami oraz kompozycją rozprawy.

Pierwszy z opisanych w rozprawie projektów badawczych to opracowanie i weryfikacja laboratoryjna narzędzia do projektowania sztucznych sekwencji miRNA służących do regulacji genów. Przeprowadzone badania były interdyscyplinarne - wymagały wykorzystania wiedzy z biologii, chemii fizycznej, bioinformatyki. W ramach projektu przeprowadzono badania podstawowe, opracowano narzędzie programistyczne i zweryfikowano jego skuteczność w praktyce w eksperymencie laboratoryjnym.

Schemat działania programu amiRNA Designer (4.1) pokazuje 15 etapów. Każdy z tych etapów wymagał przeprowadzenia odpowiednich badań, dobrania parametrów i weryfikacji.

Doktorantka szczegółowo opisała przeprowadzone badania wykazując dogłębną znajomość tematyki.

Weryfikacja teoretyczna opracowanego narzędzia wskazuje, że przynajmniej część zaprojektowanych sekwencji amiRNA wykazuje właściwą specyficzność - powinowactwo do sekwencji docelowej i brak powinowactwa do innych sekwencji. Specyficzność została również zweryfikowana eksperymentalnie przez konstrukcję odpowiedniego amiRNA, wprowadzenie go do rośliny, zbadanie ekspresji i usunięcie targetu.

Z punktu widzenia bioinformatyka był to wręcz wzorcowo przeprowadzony projekt bioinformatyczny.

Niestety niezbyt szczęśliwie wybrano miejsce publikacji. Przy całym szacunku dla redakcji Acta Biochemica Polonica i publikujących w tym czasopiśmie autorów nie jest ono bardzo prestiżowe. Moim zdaniem projekt tej klasy powinien być opublikowany w czołowym czasopiśmie branżowym zajmującym się badaniami nad kwasami nukleinowymi (np. Nucleic Acid Research) lub czołowym czasopiśmie bioinformatycznym. Oddźwięk tego projektu w świecie naukowym jest znacznie poniżej jego potencjału. Oczywiście nie jest to zarzut do doktorantki.

Moja jedyna uwaga do tej części rozprawy dotyczy prezentacji wyników. Najciekawszy z mojego punktu widzenia wynik - czyli eksperymentalne potwierdzenie skuteczności działania programu - został bardzo głęboko ukryty na zbiorczej ilustracji, w dolnym rogu strony, z podpisem przeniesionym na drugą stronę.

Drugi opisany w rozprawie projekt dotyczył modelowania struktury przestrzennej białka AtDCL4. Doktorantka szczegółowo i fachowo opisała procedurę budowy modelu przestrzennego białka z wykorzystaniem całego szeregu narzędzi bioinformatycznych. W opisie widać głęboką wiedzę potrzebną do zbudowania modeli, w szczególności wiedzę na temat funkcji i struktury białek pokrewnych. Zbudowane modele przestrzenne zostały użyte do budowy modelu kompleksu RNA z białkiem a następnie przeprowadzono symulacje metodami dynamiki molekularnej co pozwoliło wyciągnąć wnioski na temat mechanizmów działania tych białek.

Wyniki uzyskane w tym projekcie nie zostały bezpośrednio zweryfikowane eksperymentalnie, należy je potraktować jako dobrze uzasadnione hipotezy, które wymagają dalszych badań.

Przeprowadzone w tym projekcie badania wymagały zastosowania bardzo szerokiego wachlarza metod bioinformatycznych i modelowania molekularnego. Przedstawiony przez doktorantkę opis wykonanych badań wskazuje na głęboką znajomość metodologii i umiejętność jej zastosowania w praktyce.

O ile nie mam uwag do jakości przedstawionych badań i uzyskanych wyników, to mam zastrzeżenia do kompozycji rozprawy i do sposobu prezentacji wyników. Przedstawiona rozprawa mieści się w spektrum możliwych i dopuszczalnych sposobów prezentacji wyników badań naukowych, ale jest daleka od ideału.

Każdy z opisanych w rozprawie projektów niezależnie mógłby być podstawą dla przedstawienia rozprawy doktorskiej. Ich połączenie w jednej rozprawie sprawia, że jest ona dość skomplikowana. Niestety struktura pracy utrudnia jej czytanie ze zrozumieniem. Umieszczenie streszczenia pracy na końcu jest rzadko spotykaną praktyką i szczególnie w tym wypadku jest uchybieniem utrudniającym zrozumienie pracy. Podobnym utrudnieniem jest

Umieszczenie celu rozprawy po wstępie - lektura wstępu wskazuje, że autorka ma szeroką i głęboką wiedzę, ale czytelnik nieprzygotowany wstępem i znajomością celu pracy łatwo gubi się w wielu rodzajach miRNA, i szczegółach struktury białek Dicer.

Podobne wrażenie sprawia lektura opisu metod - samo wymienienie użytych metod i narzędzi wskazuje na szeroką wiedzę i imponującą wszechstronność doktorantki, jednak brakuje w opisie nadania wewnętrznej struktury i powiązania samego opisu metod z ich rolą w projekcie. Szczegółowy opis metod znalazł się natomiast w rozdziale czwartym, w ramach narracji przedstawiającej uzyskane wyniki.

Generalnie wewnętrzna struktura rozdziałów pierwszego i trzeciego nie odzwierciedla dobrze samej struktury badań co bardzo utrudnia lekturę i zrozumienie rozprawy.

Jedynie rozdział czwarty odzwierciedla rzeczywistą strukturę prowadzonych badań co sprawia, że jest najłatwiejszy w odbiorze.

Tym niemniej nawet lektura rozdziału czwartego, zwłaszcza w sekcji poświęconej modelowaniu struktury przestrzennej białek jest nużąca - jest to w dużej mierze katalog chronologiczny prowadzonych badań i uzyskanych wyników bez uszeregowania według ich znaczenia i roli. Przebrnięcie przez ten katalog, zrozumienie znaczenia poszczególnych wyników i umieszczenie ich w kontekście projektu było trudne dla recenzenta nie będącego ekspertem w zakresie oddziaływań białek z rodziny DCL z RNA.

W dużej mierze problem wynika z przyjętej struktury pracy. Rozdział 3 jest bardzo tylko bardzo ogólnym omówieniem materiałów i metod, które są szczegółowo omawiane w rozdziale 4 w ramach chronologicznego opisu wykonanych badań. Cały ciężar rozprawy w istocie skupia się w tym bardzo długim rozdziale. Dużo lepszym moim zdaniem rozwiązaniem byłoby oddzielne i mocno ustrukturyzowane omówienie obu projektów, z wyraźnym podziałem na materiały, metody, wyniki, dyskusję i połączenie omówienia projektów we wspólnym wstępie i wspólnym podsumowaniu. Wybrane przez autorkę rozwiązanie jest dopuszczalne, ale znacząco utrudniło lekturę rozprawy.

Inne uwagi.

W rozprawie nie znalazły się zestawienia, które nie są niezbędne, ale jednak bywają przydatne - spis ilustracji, spis tablic.

Pod względem językowym praca jest przygotowana bardzo dobrze. Mimo tego autorka nie ustrzegła się kilku drobnych zgrzytów stylistycznych, głównie wynikających z zastosowania kalki z języka angielskiego, na które zwróciłem uwagę w trakcie lektury rozprawy. Jako przykład na stronie 19 autorka użyła sformułowania „... grzybowe patogeny mogą ją również indukować”. Zgrabniejsze byłoby n.p. sformułowanie „... może być ona indukowana również przez patogeny grzybowe.” (w tym wypadku chodzi o odpowiedź immunologiczną).

Są to jednak drobne uchybienia nie wpływające na ostateczną ocenę pracy.

Podsumowanie

Doktorantka jest pierwszą autorką w dwóch pracach opublikowanych w międzynarodowych czasopismach specjalistycznych a także współautorką i dwóch komunikatów wygłoszonych na międzynarodowych konferencjach naukowych i opublikowanych w recenzowanych materiałach konferencyjnych.

Artykuły stanowiące podstawę pracy zostały w większości opublikowane w czasopismach międzynarodowych średniej klasy za wyjątkiem przeglądowej publikacji poświęconej białkom typu Dicer, opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie Nucleic Acid Research.

Doktorantka wykazała bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu, udokumentowaną poprawnym i obszernym wyborem cytowanych źródeł.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Mickiewicz-Piotrowskiej „*Analiza strukturalnych uwarunkowań wybranych etapów biogenezy małych regulatorowych RNA u Arabidopsis thaliana*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki. Jest ona również świadectwem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W mojej ocenie rozprawa wypełnia stopniu zadowalającym wymagania ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie pani Agnieszki Mickiewicz-Piotrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Witold Rudnicki, prof. UwB

Witold Rudnicki