



dr hab. Mikołaj Olejniczak, prof. UAM

Pracownia Biochemii RNA

27 sierpnia 2021, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**mgr Barbary Szutkowskiej zatytułowanej**  
**„Struktura drugorzędowa vRNA wirusa grypy typu A**  
**w warunkach biologicznych”**

Praca doktorska Pani mgr Barbary Szutkowskiej została wykonana pod opieką Pani prof. dr hab. Elżbiety Kierzek w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Celem pracy jest poznanie struktury genomowego RNA wirusa grypy typu A. Aby to osiągnąć Doktorantka analizowała podatność wirusowego RNA na modyfikację odczynnikami chemicznymi w izolowanych wirionach, w komórkowym modelu infekcji oraz w lizatach z zainfekowanych komórek modelowych. Porównanie uzyskanych profili modyfikacji w tych różnych warunkach może pozwolić na wskazanie szczególnie stabilnych strukturalnie regionów genomowego RNA, a tym samym pomóc w wyjaśnieniu znaczenia struktury wirusowych RNA w procesach biologicznych związanych z replikacją wirusa grypy typu A.

We wprowadzeniu do pracy Doktorantka przystępnie omówiła budowę oraz cykl replikacyjny wirusów grypy, szczególnie zwracając uwagę na rolę cząsteczek RNA na poszczególnych jego etapach oraz na oddziaływania, w których one uczestniczą. Wiedza ta jest niezbędna dla ukazania możliwych kontekstów strukturalnych, w których mogą się znajdować cząsteczki wirusowego RNA. Możemy się spodziewać innej struktury i innej dostępności poszczególnych regionów cząsteczki RNA, np. wtedy gdy znajduje się ona w kapsydie dojrzałego wirionu, wtedy gdy podlega transkrypcji na komplementarną cząsteczkę RNA w zainfekowanej komórce, oraz gdy uczestniczy w procesie składania wirionu potomnego. Doktorantka podsumowała także dotychczasowe badania nad strukturą genomowego RNA wirusa grypy, w tym obszerne badania zespołu, w którym wykonywała swoją pracę doktorską. Ponadto przedstawiła metody służące do badania



struktury drugorzędowej kwasów rybonukleinowych, a szczególnie podejścia eksperymentalne pozwalające na próbę zbadania struktury cząsteczek RNA znajdujących się w żywej komórce lub w wirionie. W podsumowaniu tej części pracy Doktorantka przedstawiła także koncepcje strategii terapeutycznych przeciwko infekcji wirusem grypy, nakreślając tym samym możliwe zastosowania zaplanowanych przez siebie badań.

Słabszą stroną wprowadzenia literaturowego jest niewielkie nakreślenie zależności pomiędzy strukturą a funkcją RNA wirusa grypy. Doktorantka podaje niewiele przykładów znanych funkcji stwierdzonych już motywów strukturalnych i nawet w tych wypadkach nie wyjaśnia w jaki sposób określona struktura danego elementu przekłada się na jej rolę biologiczną. W większości przykładów tylko stwierdza istnienie danego elementu strukturalnego, co pozostawia wrażenie, że temat jest potraktowany raczej opisowo, a nie po to aby wyjaśnić zależności między strukturą RNA wirusa grypy a jego funkcją, które są uzasadnieniem założonych celów pracy.

Fakt, że wirusowe RNA na poszczególnych etapach cyklu replikacyjnego znajdują się w różnych środowiskach skłonił Doktorantkę, w części badawczej pracy, do porównania podatności wirusowego RNA grypy typu A na modyfikację odczynnikami chemicznymi zależnie od tego, czy genomowy RNA wirusa znajduje się w wirionie, w zainfekowanej komórce, czy też w lizacie z zainfekowanych komórek. Do analizy struktury wirusowego RNA Doktorantka zastosowała metody oparte o modyfikację chemiczną. W lizacie komórkowym badała strukturę RNA przy pomocy metody opartej o zatrzymywanie odwrotnej transkryptazy w miejscach modyfikacji RNA i detekcję miejsc zatrzymania przez porównanie z produktami sekwencjonowania metodą dideoksy. Natomiast w komórkach oraz w wirionie badała strukturę RNA analizując mutacje wprowadzone przez odwrotną transkryptazę w miejscach modyfikacji RNA, które były wykrywane za pomocą metody sekwencjonowania następnej generacji. Prace badawcze zostały przeprowadzone przez Doktorantkę zgodnie z bardzo wysokimi standardami jakości naukowej i za pomocą nowoczesnej metodyki, a uzyskane profile reaktywności wirusowego RNA są cennym źródłem wiedzy, które może być przydatne dla badaczy zajmujących się zmianami strukturalnymi w wirusowym RNA zachodzącymi na różnych etapach cyklu replikacyjnego.



Jakość prezentacji wyników pracy doktorskiej obniża fakt, że Doktorantka nie wyodrębniła opisu wyników od ich dyskusji. Utrudnia to docenienie wniosków płynących z uzyskanych danych i sprawia wrażenie większej koncentracji na opisie wyników niż na interpretacji ich znaczenia. Ponadto przy czytaniu opisu wyników nie zawsze łatwe jest odseparowanie danych uzyskanych przez Doktorantkę od tych cytowanych z innych prac. Na przykład na stronie 63 opisując metodykę uzyskiwania lizatu komórkowego odnosi się do rysunku nr 20, jednak rysunek ten przedstawia dane z innego laboratorium, co jest mylące przy opisie wyników własnych. Ten rysunek lepiej nadawałby się do odrębnego rozdziału poświęconego dyskusji wyników, albo nawet do opisu metod. Podobnie mylące jest przedostatnie zdanie na stronie 83, odnoszące się do rysunku 63A. Opis wyników ma też tę słabość, co wprowadzenie literaturowe - wykryte struktury drugorzędowe są dokładnie opisane, jednak Doktorantka nie dyskutuje ich możliwej roli biologicznej. Rolę mini-dyskusji spełnia 7-stronicowe podsumowanie tej ponad 200 stronicowej pracy, jednakże jest ono raczej ogólne i nie odnosi się wystarczająco do danych literaturowych aby móc wypełnić tę lukę.

Z drobnych uwag stylistycznych, w oznaczaniu końców kwasów nukleinowych używamy symbolu „prim” a nie apostrofu. Ponadto, ze względu na złożone kształty przestrzenne, w które zwijają się cząsteczki RNA, lepszym tłumaczeniem angielskiego słowa *folding* byłoby „zwijanie” niż „fałdowanie” cząsteczek RNA, tym bardziej, że cząsteczki RNA nie tworzą fałd. W pracy stosowany jest inny format referencji w legendach rysunków (nazwisko i rok) niż w tekście (numeryczny), co utrudnia odnalezienie referencji z opisu rysunków w spisie 215 pozycji. Chciałbym jeszcze zapytać w jaki sposób Doktorantka definiuje „ustrukturyzowanie”? Mam na myśli zdanie na stronie 46 mówiące, że „struktury mRNA w warunkach komórkowych są mniej ustrukturyzowane niż w warunkach in vitro”?

Oczywiście przyjęcie, że stosowane w niniejszej pracy metody informują nas o strukturze drugorzędowej RNA jest pewnym przybliżeniem. Przede wszystkim dlatego, że w warunkach reakcji badana cząsteczka RNA przyjmuje złożoną strukturę przestrzenną. Wprowadzenie modyfikacji chemicznych do badanego RNA podczas reakcji informuje nas o dostępności danego regionu dla modyfikacji. Przy założeniu, że badany RNA nie oddziałuje z innymi cząsteczkami świadczy to o lokalnej dynamice



strukturalnej, gdzie regiony bardziej dynamiczne są bardziej podatne na modyfikacje, niż te które są bardziej stabilne. Jednak w komórce i w wirionie na podatność RNA na modyfikację będą wpływać także oddziaływania z białkami, które mogą zakrywać pewne regiony RNA przed odczynnikami. Cząsteczki RNA mogą także przyjmować alternatywne konformacje, co może komplikować analizę uzyskanych danych.

W związku z powyższym, chciałbym poprosić Doktorantkę podczas obrony o odpowiedzi na trzy pytania. Po pierwsze, chciałbym poprosić o wyjaśnienie na kilku przykładach, jakie może być znaczenie biologiczne odkrytych przez Nią motywów strukturalnych w wirusowym RNA grypy typu A. Po drugie, czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić, czy porównując otrzymane przez Nią dane reaktywności RNA w komórce, w wirionie, oraz dane uzyskane *in vitro* możliwe jest wskazanie regionów, których zmiany reaktywności mogą świadczyć o zmienionym oddziaływaniu z białkami, a nie o zmienionej strukturze RNA? Czy takie przyczyny różnic w reaktywności są rozróżnialne na poziomie analizy danych? Po trzecie, czy Doktorantka uważa za możliwe, że uzyskane przez nią profile reaktywności mogą być wypadkową reaktywności alternatywnych konformacji RNA występujących, np. w zainfekowanej komórce? Czy możliwa jest detekcja alternatywnych konformacji w oparciu o uzyskane przez Nią dane?

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca Pani mgr Barbary Szutkowskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o nadanie Pani mgr Barbarze Szutkowskiej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.

  
Mikołaj Olejniczak