



Poznań, 23-05-2022r.

Dr hab. Michał Gdula  
Zakład Ekspresji Genów  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii, UAM w Poznaniu  
michal.gdula@amu.edu.pl

## Recenzja osiągnięcia habilitacyjnego Dr Anny Philips

### 1. Sylwetka Kandydatki

Dr Anna Philips ukończyła studia magisterskie w 2008 w Laboratorium Bioinformatki na Wydziale Fizyki na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę doktorską pt. „Nowe metody bioinformatyczne do przewidywania miejsc wiązania metali i ligandów w strukturach RNA” wykonywała pod kierunkiem Prof. Janusza Bujnickiego w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii tego samego uniwersytetu. Doktorat obroniła z wyróżnieniem w 2013. W latach 2008-2009 pracowała jako bioinformatyk w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Od 2013 jest adiunktem w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, a od stycznia 2020 kieruje tam Pracownią Bioinformatyki. Habilitantka jest współautorem 18 publikacji naukowych z kolekcji Web of Science cytowanych łącznie 253 razy, liczba oraz częstość cytowań poszczególnych prac przekłada się H-index 12.

### 2. Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Dr Anna Philips jako swoje osiągnięcie naukowe zgłosiła cykl publikacji pt. "Opracowanie metod i narzędzi analizy ilościowej i jakościowej kolistych RNA oraz ich wykorzystanie w różnych układach biologicznych". Cykl składają się z 4 publikacji. Wszystkie to artykuły badawcze powstałe w ramach grantu Sonata NCN, którego habilitantka była kierownikiem. W dwóch publikacjach habilitantka była pierwszym autorem, w jednej autorem korespondencyjnym.

Tematyką tych artykułów są badania nad kolistymi RNA (circRNA) u *Arabidopsis Thaliana* i w komórkach ludzkich pochodzących od ludzi chorych na dystrofię miotoniczną typu 1 (DM1). Prace nad lepszym zrozumieniem circRNA są ważne z uwagi m.in. na rosnącą liczbę doniesień o ich funkcjach w regulacji ekspresji genów oraz roli w patogenezie chorób. Koliste RNA zostały odkryte ponad dwie dekady temu. Badania wykazały, że powstają na drodze niekanonicznego splicingu pre-mRNA i że



wiele z nich jest stabilnych. Są konserwowane ewolucyjnie - ich obecność stwierdzono u wielu gatunków roślin i zwierząt. Funkcja większości circRNA nie została jeszcze poznana, choć pokazano, że niektóre z circRNA odgrywają ważne role w regulacji ekspresji genów. circRNA u roślin są zbadane w dużo mniejszym stopniu niż u roślin.

W dwóch pierwszych pracach cyklu (H1 i H2 zgodnie z numeracją z autoreferatu) habilitantka scharakteryzowała ekspresję circRNA u *Arabidopsis thaliana*, praca czwarta (H4) bada poziom circRNA w ludzkich komórkach z dystrofią mięśniową, z kolei praca trzecia to baza danych gromadząca informacje na temat wykrytych kolistych RNA u *A.thaliana*.

H1: Philips A. et al. (2020) Expression Landscape of circRNAs in Arabidopsis thaliana Seedlings and Adult Tissues. Front Plant Sci.

Jednym z głównych celów pracy była optymalizacja metodologii badań circRNA. Wyniki analiz ekspresji circRNA mierzona RNA-seq opisane w literaturze charakteryzują się dużymi rozbieżnościami wynikającymi z różnic metodologicznych, które prowadzą do różnic w czułości wykrywają poszczególnych transkryptów a także ich liczebności. W celu zmniejszenia odchyłeń wyników związanych z metodologią, w pracy H1 habilitantka przetestowała dwa najczęściej stosowane protokoły: z wzbogaceniem circRNA poprzez trawienie RNAzą R oraz bez oraz 6 różnych metod normalizacji ilości odczytów. Uzyskane wyniki były dla wybranych transkryptów dodatkowo testowane poprzez digital droplet PCR (ddPCR). Dr Philips doszła do wniosku, że bardziej odpowiednią metodą jest podejście bez traktowania RNAzą R, choć do kwantyfikacji części circRNA, które charakteryzują się niską ekspresją może być warto zastosować również alternatywny protokół. Dodatkowo analizy wskazały na wyższość 4 z 6 metod normalizacji danych. Wykonana praca jest ważnym wkładem metodologicznym w badania nad circRNA - pozwala na bardziej świadome stosowanie różnych protokołów RNA oraz zwiększenie porównywalności danych. Po ustaleniu optymalnego protokołu habilitantka dokonała analizy RNA-seq różnych stadiów rozwojowych/ organów *A. thaliana*: siewek, kwiatach, liściach i korzeniach. Pozwoliło to na charakteryzację zmienności poziomów transkryptów, różnic w ich ekspresji w różnych organach a także stabilności. Dodatkowo została zbadana korelacja między ekspresją circRNA a mRNA. Podsumowując dr Philips dokonała optymalizacji metodologii eksperymentu RNA-seq przy badaniach circRNA, jego analizy oraz przeprowadziła kompleksową analizę ekspresji circRNA w 4 różnych stadiach/organach, co jest cennym uzupełnieniem opublikowanych wcześniej przez innych badaczy wyników.

H2: Philips A. et al. (2020) Arabidopsis thaliana cbp80, c2h2, and flk Knockout Mutants Accumulate Increased Amounts of Circular RNAs.



W pracy H2 habilitantka przeanalizowała transkrypty 18 mutantów knockout *A.thaliana* u których zdezaktywowano pojedyncze geny biorące udział w splicingu. Wcześniejsze badania nad kolistymi RNA pokazały, że powstają na drodze niekanonicznego splicingu pre-mRNA, choć i biogeneza u roślin jest słabo poznana. Przeprowadzenie eksperymentów RNA-seq oraz ich kompleksowa analiza pozwoliły na wgląd w biogenezę circRNA. Dr Philips pokazała, że duże różnice w występowaniu poszczególnych typów circRNA u niektórych mutantów względem roślin kontrolnych: np. w mutancie *cbp80* występowało 5 razy więcej różnych typów circRNA u roślin pozbawionych *c2h2* trzy razy więcej. Badania wykazały również istotnie większą akumulację circRNA u KO *cbp80*, *c2h2* oraz *flk*. Akumulacja poszczególnych circRNA nie była związana ze zwieszoną ilością linearnych transkryptów. Wyniki wskazały na to, że zmiana kompleksów białkowych związanych ze splicingiem może być mechanizmem uruchamiającym/wzmacniającym produkcję circRNA a także, że kontrola ekspresji różnych czynników splicingowych może być jednym z mechanizmów kontroli ekspresji genów u roślin. Praca H2 to istotny wkład w poznanie biogenezy circRNA u roślin.

H3: Nowis K. et al. (2021) *At-C-RNA database, a one-stop source for information on circRNAs in Arabidopsis thaliana in a unified format. Database (Oxford)*

Publikacja H3 prezentuje internetową bazę circRNA powstałą na podstawie analizy wszystkie publicznie dostępnych danych. Baza ta powstała przy użyciu zoptymalizowanej metodologii opublikowanej w pracy H1. Baza danych umożliwia nieograniczony dostęp do informacji o circRNA uzyskanych przy pomocy tego samego protokołu. Jest to cenna pomoc dla badaczy studiujących circRNA mierzących się z problemami małej powtarzalności wyników analiz, która w dużym stopniu wynika z różnic w zastosowanej analizie. Baza danych została zaimplementowana przez doktorantkę dr Philips.

H4: Czubak K. et al. (2019) *Global Increase in Circular RNA Levels in Myotonic Dystrophy. Front Genet.*

W publikacji H4 dr Philips jest jednym z 10 współautorów, ale pełni w tym projekcie ważną rolę jako ekspert od analizy circRNA. Habilitantka z powodzeniem zastosowała metodologię wypracowaną we wcześniejszych pracach (głównie H1). Zaliczenie publikacji H4 do cyklu osiągnięcia badawczego uważam za uzasadnione. W projekcie przeanalizowano koliste RNA w komórkach pochodzących od ludzi z dystrofią miotoniczną typu 1. Doświadczenie w kwantyfikacji circRNA pozwoliło habilitantce na stwierdzenie, że różnice w ilości circRNA w DM1 nie jest częścią zmian globalnego poziomu transkrypcji lub podwyższenia ekspresji ich liniowych odpowiedników.

#### Podsumowanie – ocena osiągnięcia naukowego



Podsumowując uważam, że osiągnięcie naukowe dr Anny Philips stanowi istotny wkład w poznanie ważnego i wciąż słabo poznanego typu RNA - circRNA oraz rozwój metodologii ich badań. Habilitantka istotnie usprawniła metodykę analiz circRNA i zademonstrowała jej użyteczność w trzech różnych projektach opisanych w osiągnięciu naukowym, w tym w dwóch różnych modelach badawczych. Pozwoliło to na uzyskanie nowego i istotnego wglądu w biologię oraz funkcjonalne znaczeni circRNA. Dodatkowo dr Philips stworzyła bazę danych, która ułatwi pracę innym badaczom. Projekty zostały zaplanowane w logiczny, jasny sposób. Przy ich realizacji habilitantka musiała wykazać się znajomością wielu technik biologii molekularnej oraz bioinformatyki. Wszystko zostało wykonane w ramach grantu, którego była kierownikiem, co świadczy o Jej samodzielności i dojrzałości jako niezależnej badaczki.

### 3. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

Aktualna Ustawa Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce nie wymaga od recenzenta oceny pozostałego dorobku, dlatego odniosę się do niego bardzo skrótowo. Habilitantka jest współautorką 14 prac nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego podlegającego ocenie w trakcie habilitacji w tym 12 prac badawczo eksperymentalnych. Warto podkreślić, że dr Philips była pierwszym lub współ-pierwszym autorem 6 z tych publikacji. Tematyka tych prac obejmuje 1.) modelowanie komputerowe pozwalające przewidzieć wiązanie się jonów metali i ligandów do RNA i białek 2.) badania nad kolistymi RNA oraz 3.) badania nad mikrobiomem. Habilitantka ukończyła realizację dwóch grantów NCN i jest trakcie realizacji grantu NCN OPUS-21 oraz NCBR. To krótkie zestawienie dobitnie pokazuje, że dr Philips jest dojrzałym naukowcem, który jest w stanie realizować niezależne badania naukowe oraz że od długiego czasu pracuje samodzielnie.

### 4. Osiągnięcia organizacyjne i dydaktyczne

Dr Philips od 2020 kieruje Pracownią Bioinformatyki w ICHB PAN. Kierowała dwoma grantami NCN, aktualnie jest kierownikiem NCN OPUS oraz grantu NCBR. Habilitantka była współorganizatorką 4 konferencji a także członkiem zespołów: 1.) przygotowujących materiały do oceny instytutów PAN oraz 2.) komisji oceniającej pracowników ICHB PAN. Habilitantka była promotorką dwóch prac magisterskich, opiekowała się stażystami, dwoma licencjuszami, kieruje pracami dwóch doktorantów.

### 5. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę pozytywną ocenę osiągnięcia naukowego (cykl publikacji) oraz pozostałego dorobku naukowego, a także znaczące doświadczenie w innych dziedzinach stwierdzam, że w mojej ocenie pani dr Anna Philips w pełni spełnia ustawowe wymogi stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego (art. 221 ust. 4 i 5 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. z 2020 r. poz 85 z późn. Zm.). Osiem prac pierwszo-autorskich,



jedną jako autor korespondencyjny, kierowanie czterema grantami oraz własną pracownią w ramach IChB PAN jasno pokazuje, że habilitantka od długiego czasu funkcjonuje jako dojrzały, samodzielny naukowiec. Wnioskuje zatem o dopuszczenie pani dr Anny Philips do dalszych etapów zmierzających do nadania stopnia doktora habilitowanego.

  
Michał Gdula