

Warszawa, 09-11-2022

Dr hab. Roman Szczęsny

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Nowis "Podejścia bioinformatyczne w badaniach kolistych RNA u roślin".

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Nowis została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem prof. dr. hab. Marka Figlerowicza. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr hab. Anna Philips.

Transkrypcja genomu prowadzi do powstawania RNA o zróżnicowanej funkcji. Rozwój nowych technik sekwencjonowania kwasów nukleinowych umożliwia odkrywanie i analizę kolejnych klas RNA. W ostatnich latach szczególne zainteresowanie wzbudza kolisty RNA (circRNA), który powstaje w wyniku alternatywnego składania transkryptów. Pomimo intensywnych badań funkcja i biogeneza kolistego RNA nie zostały w pełni poznane. Większość dotychczasowych badań dotyczyło kolistego RNA u zwierząt. Znacząco mniej wiadomo na temat kolistego RNA u roślin.

Możliwość wiarygodnej i powtarzalnej identyfikacji danego rodzaju RNA jest kluczowa do przeprowadzenia analiz porównawczych, funkcjonalnych oraz badania mechanizmu powstawania danej klasy RNA. Dotychczas stosowane procedury nie pozwalały na wystandaryzowaną i powtarzalną analizę jakościową i ilościową kolistego RNA u roślin. Problem ten stanowił obiekt prac badawczych mgr Katarzyny Nowis przeprowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej. Podstawowym celem badań mgr Katarzyny Nowis było opracowanie zoptymalizowanego podejścia bioinformatycznego do analizy kolistego RNA u roślin, a następnie wykorzystanie opracowanej procedury m.in. do zbadania znaczenia składników spliceosomu w powstawaniu kolistego RNA. Cel rozprawy uważam za ambitny i istotny dla zrozumienia roli kolistego RNA roślinnego.

Wykorzystując szeroki zakres narzędzi bioinformatycznych, we współpracy z innymi badaczami odpowiedzialnymi za pozostałe, nie bioinformatyczne etapy badań, mgr Katarzyna Nowis zrealizowała cele badań przedstawione w rozprawie. W wyniku przeprowadzonych prac opracowano strategię badawczą pozwalającą na wystandaryzowaną i powtarzalną identyfikację i analizę ilościową kolistego RNA. Wykazano, że stosowana powszechnie metoda wzbogacenia kolistych cząsteczek RNA przy użyciu egzorybonukleazy R może prowadzić do degradacji poszukiwanych transkryptów. Jednocześnie, testując różne strategie normalizacji danych z sekwencjonowania nowej generacji (NGS) stwierdzono,

że powszechnie stosowana strategia normalizacji na całkowitą liczbę odczytów z biblioteki prowadzi do najmniej wiarygodnej analizy ilościowej. Co ważne, analizy z użyciem danych NGS zostały zweryfikowane przy użyciu niezależnej metody emulsyjnego PCR, co dotychczas nie było opisane w literaturze przedmiotu. Za ważny uznaję aspekt wyznaczenia minimalnej liczby cząsteczek kolistego RNA niezbędnego do jego wiarygodnej analizy.

Wykonane badania optymalizacyjne pozwoliły na stworzenie katalogu kolistych RNA *Arabidopsis thaliana* oraz potwierdzenie wcześniejszych przypuszczeń, że znacząca pula kolistych RNA powstaje stochastycznie, co wskazuje, że prawdopodobnie tylko niewielka pula kolistych RNA ma znaczenie funkcjonalne. Badania przeprowadzone przez mgr Katarzynę Nowis wskazują, że identyfikacja kolistych RNA z użyciem NGS odznacza się niewielką powtarzalnością wśród analizowanych niezależnych prób biologicznych. Nawiązując do tej części rozprawy chciałbym zapytać czy zaobserwowano zwiększoną „powtarzalność” w przypadku kolistych RNA, których istnienie było wsparte przez więcej niż 100 odczytów. Porównując liczbę odczytów RNA-seq charakterystycznych dla kolistego RNA i jego liniowego odpowiednika mgr Katarzyna Nowis stwierdza brak zależności między poziomem kolistego RNA a poziomem ekspresji danego genu. Warto zwrócić uwagę, że liczba odczytów RNA-seq „transkryptów liniowych” jest wypadkową różnych procesów – syntezy i degradacji RNA. Czy rozważano analizę publicznie dostępnych danych z eksperymentów typu GRO-seq, pNET-seq, aby sprawdzić potencjalną zależność między poziomem kolistych RNA z poziomem transkrypcji danego genu? Proszę o komentarz w trakcie publicznej rozprawy doktorskiej.

W kolejnym etapie badań mgr Katarzyna Nowis zastosowała opracowane podejście bioinformatyczne do identyfikacji białek istotnych dla biogenezy kolistego RNA. W tym celu mgr Katarzyna Nowis przeprowadziła analizę transkryptomów 18 mutantów *A. thaliana*. Przeprowadzone badania doprowadziły do identyfikacji trzech genów, tj. *CBP80*, *C2H2*, *FLK*, których inaktywacja prowadzi do wzrostu poziomu kolistych RNA. Dane te są zgodne z wcześniejszymi przypuszczeniami, że kolisty RNA powstaje w wyniku zaburzonego/alternatywnego splicingu. Badania mgr Katarzyny Nowis pozwalają na dalszą charakterystykę zidentyfikowanych białek oraz określenie ich roli w powstawaniu kolistego RNA.

W ostatnim etapie badań mgr Katarzyna Nowis wykorzystwała opracowaną strategię do stworzenia ogólnodostępnej, wystandaryzowanej bazy kolistych RNA *A. thaliana*. W ramach tej części rozprawy doktorskiej mgr Katarzyna Nowis poddała analizie publicznie dostępne dane transkryptomiczne, przeprowadziła analizę porównawczą uwzględniając dane uzyskane we wcześniejszych etapach rozprawy doktorskiej oraz stworzyła aplikację internetową, która umożliwi innym badaczom wykorzystanie wyników przeprowadzonych analiz.

Rozprawa doktorska została przygotowana jako zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, które zostały poprzedzone omówieniem w języku polskim. Omówienie zbioru prac zostało przygotowane bardzo dobrze i stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki badań. Z przedstawionych w rozprawie oświadczeń oraz stosownych sekcji zamieszczonych w artykułach naukowych wynika, że mgr Katarzyna Nowis miała istotny i twórczy udział w powstaniu artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru składającego się na rozprawę doktorską. Ponadto, mgr Katarzyna Nowis jest współautorką czterech innych artykułów naukowych. Dorobek publikacyjny Kandydatki oceniam jako bardzo dobry.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Katarzyny Nowis oceniam wysoko. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które może stanowić cenne źródło informacji dla dalszych prac nad rolą kolistego RNA. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) i **wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Katarzyny Nowis do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora**. Jednocześnie, ze względu na istotne znaczenie uzyskanych wyników dla prac nad ustaleniem roli kolistego RNA wniosuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Roman Szczyński