

Warszawa, 06-02-2023

**Dr hab. Roman Szczęsny**

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Ciechanowskiej "Nowe spojrzenie na domenę helikazową ludzkiej rybonukleazy Dicer i jej aktywności biochemiczne, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności wiązania RNA".***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Kingi Ciechanowskiej została wykonana w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. IChB PAN.

Modyfikacje, obróbka posttranskrypcyjna oraz degradacja RNA są niezbędnymi elementami ekspresji informacji genetycznej. Procesy te są katalizowane przez wyspecjalizowane enzymy o zróżnicowanych aktywnościach, m.in. helikazy RNA, rybonukleazy lub polimerazy.

Mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem interferencyjnego RNA oraz białka uczestniczące w tym procesie stanowią przedmiot intensywnych badań ostatnich dwóch dekad. Co ciekawe, dotychczas funkcjonowanie poszczególnych białek, w tym białka Dicer będącego kluczowym składnikiem maszynerii RNAi, nie zostało w pełni scharakteryzowane. W odpowiedzi na niepełną charakterystykę tego białka mgr Kinga Ciechanowska w ramach swojej rozprawy doktorskiej podjęła się analizy aktywności biochemicznej domeny helikazowej ludzkiego białka Dicer. Cel rozprawy uważam za ważny dla pełnego zrozumienia działania białka Dicer na poziomie molekularnym.

Wykorzystując podstawowe techniki biologii molekularnej oraz biochemii Doktorantka uzyskała plazmid ekspresyjny kodujący domenę helikazową ludzkiego białka Dicer, a następnie oczyściła odpowiadające mu białko po ekspresji w komórkach bakteryjnych z użyciem chromatografii powinowactwa. Uzyskany preparat białka został wykorzystany przez Doktorantkę do przeprowadzenia analiz biochemicznych mających na celu sprawdzenie aktywności hydrolizy ATP, rozplatania kwasów nukleinowych, wspomaganie tworzenia dwuniciowych kwasów nukleinowych oraz aktywności rybonukleolitycznej. Zgodnie z wcześniejszymi przypuszczeniami Doktorantka potwierdziła, że badana domena białka Dicer posiada aktywność hydrolizy ATP. Co więcej, porównując aktywność badanej domeny, z innymi oczyszczonymi wersjami ludzkiego białka Dicer Doktorantka wykazała, że tylko domena helikazowa w obrębie białka Dicer posiada zdolność do hydrolizy ATP. W nawiązaniu do tej części badań chciałbym prosić o komentarz czy zaobserwowano różnice ilościowe w aktywności białka

oczyszczanego po produkcji w bakteriach (tylko domena helikazowa) i białka oczyszczonego po produkcji w ludzkich komórkach 293 (białko pełnej długości). Czy Autorka rozprawy rozważała zastosowanie innych metod do oznaczania aktywności hydrolizy ATP?

W kolejnej analizach Doktorantka zbadała zdolność badanej domeny do wiązania różnych kwasów nukleinowych. Okazało się, że domena helikazowa białka Dicer może wiązać jednoniciowe cząsteczki RNA i DNA o długości co najmniej 20 nukleotydów, z tym, że wyznaczone stałe dysocjacji wskazują na raczej słabe wiązanie nawet takich substratów. Jednocześnie Autorka uzyskała wyniki sugerujące, że wiązanie kwasów nukleinowych przez domenę helikazową białka Dicer prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie substratu. Nie zaobserwowano, aby badane białko posiadało zdolność do rozplatania dwuniciowych kwasów nukleinowych lub wspierało hybrydyzację jednoniciowych, komplementarnych kwasów nukleinowych. Taki wynik, co podkreśla Autorka, wydaje się być zgodny z wynikami innych eksperymentów przeprowadzonych w ramach rozprawy wskazującymi, że domena helikazowa białka Dicer nie wiąże dwuniciowych kwasów nukleinowych. Czy w trakcie prowadzonych prac sprawdzano zdolność do rozplatania substratów, które posiadałyby dłuższe końce jednoniciowe? Czy w świetle wyników uzyskanych zarówno przez Doktorantkę jak i innych badaczy zasadne jest aby badaną domenę nazywać domeną helikazową? – proszę o opinię Doktorantki w trakcie publicznej rozprawy doktorskiej.

W kolejnym etapie badań mgr Kinga Ciechanowska podjęła się identyfikacji transkryptów oddziałujących w komórce z białkiem Dicer oraz jego wersją pozbawioną domeny helikazowej. W tym celu, Doktorantka przeprowadziła immunoprecypitację Dicer ze związanymi RNA, które następnie poddała identyfikacji z użyciem sekwencjonowania nowej generacji. Uzyskane dane zostały poddane analizie bioinformatycznej. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły zaproponować Doktorantce, że białko Dicer pozbawione domeny helikazowej posiada odmienną pulę substratów RNA niż białko pełnej długości, naturalnie występujące w komórce. Sugeruje to, że badana przez mgr Kingę Ciechanowską domena helikazowa wpływa na specyficzność substratów ludzkiego białka Dicer, co wydaje się być ważnym stwierdzeniem w badaniach nad mechanizmem działania tego białka.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, wyniki, dyskusję, materiały i metody, spis literatury oraz streszczenie napisane w języku polskim oraz angielskim.

Praca została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Nieliczne błędy np. nintrocelulozową zamiast nitrocelulozową (rozd. 2.24.4) nie zaburzają mojej bardzo dobrej oceny tego aspektu rozprawy. Praca napisana jest w sposób ciekawy. Rozdział „Wstęp” stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badań m.in. podkreślając zróżnicowanie białek Dicer z różnych organizmów. Autorka przygotowując „Wstęp” wykazała się znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań. W rozdziale „Materiały i metody” w poprawny sposób opisane zostały stosowane metody oraz materiały badawcze. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Prace te zostały opisane z należytą starannością. Rozdział ten stanowi opis cyklu eksperymentów stanowiących logiczny ciąg. Autorka w umiejętny i krytyczny sposób interpretuje wyniki swoich badań w rozdziale „Dyskusja”. Ten rozdział rozprawy potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr Kingę Ciechanowską oraz ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są omawiane i analizowane na tle danych literaturowych.

Doktorantka jest współautorką siedmiu artykułów naukowych, a część badań przedstawionych w rozprawie została sfinansowana z grantu PRELUDIUM, którego Doktorantka uzyskała w konkursie organizowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Aktywność publikacyjną Doktorantki, Jej umiejętność pozyskiwania funduszy na badania oraz wykorzystanie swoich umiejętności badawczych w działalności na rzecz przeciwdziałania epidemii SARS-CoV-2 oceniam bardzo dobrze.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Kingi Ciechanowskiej oceniam pozytywnie. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. 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 128/2022/Internet z dnia 24 października 2022 r.) i **wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Kingi Ciechanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**

Roman Szczęsny