

Warszawa, 31-05-2023

Dr hab. Roman Szczęsny

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej "Wybrane aspekty oddziaływań pomiędzy ludzką rybonukleazą Dicer i cząsteczkami kwasów nukleinowych".

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej 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.

Mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem interferencyjnego RNA oraz białka uczestniczące w tym procesie stanowią przedmiot intensywnych badań ostatnich dwóch dekad. Obszar ten jest również przedmiotem badań prowadzonych pod kierunkiem prof. IChB PAN Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, które w szczególności dotyczą charakterystyki ludzkiego białka Dicer, będącego kluczowym składnikiem maszynerii RNAi. W ramach swojej rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszka Szczepańska podjęła się szeregu analiz biochemicznych mających na celu zbadanie roli domeny DUF283 białka Dicer.

Wykorzystując podstawowe techniki biologii molekularnej oraz biochemii Doktorantka uzyskała plazmidy ekspresyjne kodujące ludzkie białko Dicer oraz jego wersje pozbawione domeny DUF283, a następnie oczyściła odpowiadające im białko po ekspresji w ludzkich komórkach 293T, w których wcześniej zmieniono sekwencję genu *DICER1*, co skutkowało brakiem produkcji białka kodowanego przez ten gen. Oczyszczone preparaty białka Dicer zostały wykorzystane przez Doktorantkę do przeprowadzenia analiz biochemicznych mających na celu sprawdzenie czy domena DUF283 odgrywa kluczową rolę w aktywności wspierania hybrydyzacji komplementarnych cząsteczek RNA oraz czy ma wpływ na aktywność rybonukleolityczną. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że oczyszczona domena DU283 wspiera hybrydyzację komplementarnych kwasów nukleinowych. Niemniej, badania Doktorantki rozszerzyły wcześniejsze analizy i pozwoliły wykazać, że domena DUF283 jest kluczowa dla wspomnianej aktywności. Okazało się bowiem, że w warunkach *in vitro* białko Dicer pozbawione domeny DUF283 nie wspiera hybrydyzacji badanego, modelowego substratu RNA. Jednocześnie Doktorantka stwierdziła, że badana domena wpływa na aktywność rybonukleolityczną białka Dicer. Efekt ten był szczególnie widoczny w warunkach *in cellulo*, w których analizowano intensywność obróbki prekursorów dwóch miRNA, tj. pre-miR-16-1 i pre-miR-21. Doktorantka zaobserwowała obniżoną obróbkę obu badanych pre-miRNA w przypadku białka Dicer pozbawionego fragmentu od

aminokwasu 625 do 752. W przypadku białka Dicer pozbawionego krótszego fragmentu (aa 630-709) Doktorantka stwierdziła zmianę w intensywności obróbki pre-miR-16-1, ale nie drugiego badanego prekursora. Podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej prosiłbym o komentarz (spekulację) dlaczego w warunkach *in cellulo* w przypadku wariantu DUF(630-709) obserwuje się wpływ na obróbkę tylko jednego z dwóch badanych prekursorów miRNA.

W kolejnym etapie Doktorantka przeprowadziła badania mające na celu identyfikację transkryptów oddziałujących w komórce z białkiem Dicer oraz jego wersjami pozbawionymi domeny DUF283. W tym celu, Doktorantka przeprowadziła immunoprecypitację białka Dicer ze związanymi RNA, które następnie poddała identyfikacji z użyciem sekwencjonowania nowej generacji. Uzyskane dane zostały poddane analizie bioinformatycznej. Wyniki tych badań należy zakwalifikować jako analizę wstępną, na co wskazuje również Doktorantka. Niemniej, przeprowadzone analizy pozwoliły zaproponować Doktorantce, że badane warianty białka Dicer, przynajmniej na przykładzie genu *DICER1*, różnią się profilem oddziałujących RNA, co sugeruje, że badane regiony białka Dicer, tj. aa 625-752 i aa 630-709 wpływają na specyficzność substratową białka Dicer. W opisie przeprowadzonych analiz Doktorantka stwierdziła, że podczas sekwencjonowania jako kontrolę jakości i wydajności reakcji wykorzystano bibliotekę bakteriofaga PhiX. Jednakże, w rozprawie doktorskiej nie stwierdzono jednoznacznie do jakiego stopnia sekwencjonowanie materiału kontrolnego potwierdziło oczekiwaną jakość przeprowadzonej analizy (prosiłbym o uzupełnienie/komentarz). Prosiłbym również o komentarz dlaczego zastosowanie narzędzia STAR skutkuje większą frakcją jednoznacznie zmapowanych odczytów w porównaniu do narzędzia Bowtie 2. W przypadku Rysunku 21 nie jest jednoznaczne co oznacza kategoria „geny”, „transkrypty” - pozostałe wskazane kategorie albo są regionami w genach (np. UTR, CDS) lub stanowią rodzaj transkryptu (ncRNA). Proszę o doprecyzowanie podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wiele RNA wiązanych przez białko Dicer w ludzkich komórkach 293T stanowią cząsteczki bogate w ciągi guanozynowe. Obserwacja ta wskazała, że białko Dicer może wiązać RNA tworzący strukturę G-kwadrupleksów, co było zgodne z wynikami badań przeprowadzonych w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN przez dr Natalię Koralewską. Doktorantka potwierdziła, że białko Dicer wiąże z wysokim powinowactwem G-kwadrupleksy RNA. Wykazała również, że kasetka PPC białka Dicer, w tym tzw. kieszenie 5' i 3' znajdujące się w obrębie kasety PPC, uczestniczą w wiązaniu substratów tworzących G-kwadrupleksy. W kolejnym etapie przeprowadziła analizę mającą na celu sprawdzenie czy kasetka PPC może wiązać wewnątrzcząsteczkową strukturę G-kwadrupleksu. Uzyskane wyniki wskazują, że kasetka PPC może wiązać G-kwadrupleksy powstające w obrębie jednej cząsteczki substratu, jak i G-kwadrupleksy tworzone międzycząsteczkowo. Czy w przeprowadzonych badaniach potwierdzono cyrkularyzację zastosowanego substratu?

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, spis literatury oraz streszczenie napisane w języku polskim oraz angielskim. Rozdział „Wprowadzenie” stanowi dobre zapoznanie czytelnika z tematyką przeprowadzonych badań. Doktorantka przygotowując tę część rozprawy wykazała się znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań. W rozdziale „Materiały i metody” przedstawiono opisy stosowanych metod, które umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów, które stanowią cykl logicznie zaplanowanych eksperymentów. Doktorantka w umiejętny sposób interpretuje wyniki swoich badań w rozdziale „Dyskusja”. Treść tego rozdziału rozprawy doktorskiej potwierdza umiejętność

prowadzenia pracy naukowej przez mgr inż. Agnieszkę Szczepańską oraz wiedzę Doktorantki w dyscyplinie.

Doktorantka jest współautorką czterech artykułów naukowych, w tym dwóch, w których miała wiodący udział, jako pierwszy autor. Artykuły z wiodącą rolą Doktorantki przedstawiają wyniki opisane w rozprawie doktorskiej. Aktywność publikacyjną Doktorantki oceniam bardzo dobrze.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej oceniam pozytywnie. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz rozwinięcie dotychczas przeprowadzonej charakterystyki ludzkiego białka Dicer. 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.). **Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**

Roman Szczęsny