



UNIwersytet
WARSAWski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Ewolucyjnej



Warszawa, 3.09.2023

Dr hab. Rafał Milanowski, prof. ucz.
Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biologii Ewolucyjnej
CNBCh, ul. Żwirki i Wigury 101, pokój 4.160
e-mail: r.milanowski@uw.edu.pl
tel.: +48 22 66 266 41

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Biesiady zatytułowanej „Modelowanie przestrzennych struktur RNA w badaniach ewolucji na poziomie molekularnym i projektowaniu nanocząsteczek RNA”

Przenoszenie informacji genetycznej nie jest jedyną rolą cząsteczek RNA. Pełnią one także inne funkcje, które obejmują między innymi katalizowanie reakcji biochemicznych czy regulację ekspresji genów. Większość tych aktywności zależy od specyficznych struktur, dlatego ich dokładne określenie jest kluczowe dla lepszego zrozumienia funkcji RNA. Jednak skuteczne określanie struktury RNA metodami eksperymentalnymi jest ograniczone przez liczne czynniki, takie jak stabilność RNA czy jego wielkość. Z tego powodu bazy danych zawierają niewielką liczbę potwierdzonych eksperymentalnie struktur RNA, co więcej, są to dane głównie dla krótkich cząsteczek regulacyjnych oraz pełniących funkcje enzymatyczne. W takiej sytuacji niezwykle przydatne jest modelowanie struktur przestrzennych RNA z wykorzystaniem metod bioinformatycznych, co umożliwia szybką analizę na dużą skalę. Oczywiście warunkiem skuteczności takiego podejścia jest opracowanie i weryfikacja narzędzi pozwalających uzyskać wiarygodne wyniki. Badania magistra Marcina Biesiady przedstawione w rozprawie doktorskiej dotyczyły właśnie tego problemu, skutecznego zastosowania metod komputerowych w predykcji struktury przestrzennej cząsteczek RNA.

Rozprawa zatytułowana „**Modelowanie przestrzennych struktur RNA w badaniach ewolucji na poziomie molekularnym i projektowaniu nanocząsteczek RNA**” została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem prof. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek i dr Katarzyny Purzyckiej. Podstawowym celem pracy było badanie procesów ewolucji cząsteczek RNA a także projektowanie potencjalnie funkcjonalnych nanocząsteczek RNA przy użyciu zaawansowanych metod obliczeniowych przewidywania struktury przestrzennej RNA. Do tego zadania doktorant wykorzystywał aplikację RNAComposer, opracowaną w jego rodzimym instytucie.



Instytut Biologii Ewolucyjnej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel.: 22 55 26 641
e-mail: r.milanowski@uw.edu.pl
<http://www.ibe.biol.uw.edu.pl>

Wyniki badań zostały zaprezentowane w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy. Na cykl ten składają się trzy prace opublikowane w czasopismach: *Methods in Molecular Biology* (IF: 1,372; MNiSW: 70), *Methods* (IF: 4,8; MNiSW: 100), *Nucleic Acids Research* (IF: 14,9; MNiSW: 200):

Biesiada M, Purzycka KJ, Szachniuk M, Blazewicz J, Adamiak RW. Automated RNA 3D structure prediction with RNAComposer. *Methods Mol Biol* (2016). doi: 10.1007/978-1-4939-6433-8_13

Biesiada M, Pachulska-Wieczorek K, Adamiak RW, Purzycka KJ. RNAComposer and RNA 3D structure prediction for nanotechnology. *Methods* (2016). doi: 10.1016/j.ymeth.2016.03.010

Biesiada M, Hu MY, Williams LD, Purzycka KJ, Petrov AS. rRNA expansion ES7 in eukaryotes: from signature fold to tentacles. *Nucleic Acids Res* (2022), doi: 10.1093/nar/gkac844

Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich publikacji a oświadczenia dołączone do rozprawy nie pozostawiają wątpliwości, że jego rola w ich powstawaniu była kluczowa.

Rozprawę otwiera lista publikacji wchodzących i niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W dalszej części zamieszczono streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim, w których przedstawiono podstawowy cel pracy oraz podsumowanie uzyskanych wyników. Kolejnym elementem rozprawy jest rozdział zatytułowany Wprowadzenie. W części tej została opisana budowa RNA z uwzględnieniem wszystkich trzech poziomów, scharakteryzowane zostały różne metody modelowania struktur przestrzennych RNA, opisano zasadę działania programu RNAComposer, podsumowano znaczenie znajomości budowy przestrzennej RNA dla rozwoju nowoczesnych terapii oraz przedstawiono jakie wyzwania w zakresie badań nad strukturami przestrzennymi czekają w najbliższym czasie badaczy. Rozdział ten bardzo dobrze wprowadza czytelnika w świat RNA i jego struktur, jednak w tym miejscu rozprawy pojawia się błąd techniczny powtarzający się w całej pracy, który utrudnia jej czytanie i analizę – tytuły podrozdziałów drugiego rzędu pozbawione zostały numeracji. W efekcie została utracona hierarchia poszczególnych podrozdziałów, numeracja podrozdziałów nie do końca zgadza się z numeracją zamieszczoną w spisie treści a pozbawione numerów tytuły podrozdziałów drugiego rzędu są nieodróżnialne od tytułów podrozdziałów czwartego rzędu. W dalszej części rozprawy przedstawiono cele naukowe trzech prac z cyklu oraz umieszczono ich skrócone opisy.

Pierwszą pracę wchodzącą w skład z cyklu, zatytułowaną „Automated RNA 3D structure prediction with RNAComposer” opublikowano jako rozdział w książce „RNA structure determination” wydanej w ramach serii *Methods in Molecular Biology*. Zasadniczą częścią tej publikacji jest szczegółowa instrukcja działania programu RNAComposer, służącego do automatycznego przewidywania struktury przestrzennej RNA na podstawie sekwencji i zakodowanej struktury drugorzędowej lub na podstawie samej sekwencji – w takim przypadku struktura drugorzędowa jest szacowana przez zaimplementowane w programie algorytmy. W pracy przedstawiono także efekty przewidywania struktury przestrzennej dla przykładowej cząsteczki RNA – ryboprzełącznika lizynowego u *Thermotoga maritima*. Eksperyment zakładał porównanie efektywności programu w zależności od użytej struktury drugorzędowej (struktura przewidziana *in silico* lub struktura przewidziana na podstawie danych

eksperymentalnych) i danych dodatkowych na temat obecnego w strukturze pseudowęzła. Na podstawie przeprowadzonej analizy wyprowadzono najważniejszy wniosek, że skuteczność programu RNAComposer jest zależna od jakości danych wejściowych, czyli poprawności struktury drugorzędowej i dodatkowych informacji o strukturze przestrzennej. Podkreślono także wagę elementów obecnych w bazie RNA FRABASE na jakość ostatecznych wyników. W tym miejscu mam do doktoranta dwa pytania:

1. Czy doktorant przeprowadzał analogiczne (w miarę możliwości) eksperymenty dla tej samej sekwencji z wykorzystaniem innych narzędzi do przewidywania struktury trzeciorzędowej RNA? Jeżeli tak, to jak wypadają oszacowania RNAComposer w porównaniu z innymi programami? Jakie są najważniejsze plusy programu RNAComposer w porównaniu do innych narzędzi?
2. Czy doświadczenia doktoranta w pracy z programem RNAComposer zostały wykorzystane do ulepszenia działania tego narzędzia?

Drugą pracą cyklu, zatytułowaną „RNAComposer and RNA 3D structure prediction for nanotechnology” opublikowano w czasopiśmie *Methods*. Celem opisanych eksperymentów było przetestowanie programu RNAComposer w procesie projektowania cząsteczek o pożądanym cechach, o potencjalnym zastosowaniu w nanotechnologii. Utrudnieniem procedury był fakt, że projektowane cząsteczki są funkcjonalne jako struktury zbudowane z kilku elementów, tymczasem program RNAComposer umożliwia przewidywanie struktury przestrzennej tylko dla pojedynczej nici RNA. Pierwszy, testowy eksperyment polegał na odtworzeniu znanej struktury trzeciorzędowej RNA prokapsydu bakteriofaga phi29, którego pięć cząsteczek tworzy nanopierścień. Procedura zakończyła się powodzeniem, pomimo tego, że przed rozpoczęciem przewidywania wszystkie struktury RNA wspomnianego prokapsydu zostały wykluczone z bazy danych elementów strukturalnych, w celu zasymulowania problemu często spotykanego w modelowaniu, polegającego na braku bezpośrednich struktur referencyjnych. Drugi, zasadniczy eksperyment polegał na zaprojektowaniu pojedynczej cząsteczki RNA z wprowadzonymi dodatkowymi elementami (struktura spinki do włosów), która w formie polimeru tworzyłaby strukturę nanokwadratu. Co więcej, wprowadzone dodatkowe spinki miały w założeniu umożliwić tworzenie połączeń między nanokwadratami, co potencjalnie mogłoby prowadzić do powstawania nieskończonych, biopolimerowych sieci RNA. Także ten eksperyment zakończył się zaprojektowaniem RNA, którego osiem cząsteczek tworzy potencjalnie funkcjonalny nanokwadrat. Wielka szkoda, że w ramach pracy nie zaplanowano eksperymentów laboratoryjnych weryfikujących efekty projektowania cząsteczek RNA *in silico*.

Trzecia praca cyklu, pod tytułem „rRNA expansion ES7 in eukaryotes: from signature fold to tentacles”, została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. W pracy została opisana hybrydowa metoda modelowania struktury przestrzennej rRNA dużej podjednostki rybosomu, w której połączono modelowanie struktury przestrzennej z wykorzystaniem programu RNAComposer z wcześniejszymi ustaleniami na temat struktury rRNA, przy założeniu dopuszczalnego modelu ewolucji tej cząsteczki. Metoda ta na pierwszych

etapach polega na dokładnym porównywaniu sekwencji i struktur drugorzędowych z uwzględnieniem przebiegu filogenezy; uwzględniona jest także optymalizacja przyrównań. W kolejnym kroku struktury trzeciorzędowe są modelowane automatycznie. Na etapie oceny struktury 3D przewidziane jest cofanie do wcześniejszych etapów w celu poprawienia przyrównań i wyróżnienia motywów. Dla zaproponowanej procedury przeprowadzono dwa eksperymenty walidacyjne. W pierwszym z nich modelowano segment ekspansyjny ES7 w 28S rRNA *Candida albicans*, dla którego to gatunku struktura drugorzędowa rRNA została wcześniej ustalona eksperymentalnie. Uzyskane wyniki były zgodne z eksperymentalnymi w akceptowalnym stopniu. W drugim eksperymencie walidacyjnym przeprowadzono modelowanie tego samego segmentu ekspansyjnego u drożdży (struktura znana) na podstawie znanej struktury 3D tego fragmentu u *Eremothecium gossypii* przy wyłączeniu z bazy danych programu RNAComposer danych na temat rRNA drożdży. Również w tym przypadku uzyskana struktura trzeciorzędowa była wysoce zgodna z rzeczywistością. W kolejnym kroku przeprowadzono właściwy eksperyment polegający na przewidywaniu struktury przestrzennej segmentu ekspansyjnego ES7 o zróżnicowanym stopniu komplikacji u pięciu gatunków. W celu potwierdzenia użyteczności i uniwersalności opracowanej metody przeprowadzono także eksperyment dodatkowy, polegający na modelowaniu całego kompleksu 28S i 5,8S rRNA u myszy, na podstawie struktury referencyjnej rRNA człowieka. Ostatecznie uzyskano model całego rRNA myszy o strukturze bardzo zbliżonej do referencyjnej co potwierdziło możliwość wykorzystania opracowanej metody dla dłuższych cząsteczek. Praca ta po raz kolejny potwierdziła możliwości programu RNAComposer, który umożliwia wiarygodne modelowanie struktur przestrzennych RNA w oparciu o dane referencyjne różnych typów. W tym miejscu chciałbym zapytać doktoranta nie o samą metodę modelowania, ale o ewolucję segmentów ekspansyjnych:

3. Czy doktorant mógłby przedstawić jaki jest molekularny mechanizm ewolucyjny powstawania i wydłużania segmentów ekspansyjnych w rRNA? Jaką korzyść dla organizmu dają te wydłużone obszary? Czy zdaniem doktoranta jest jakaś granica ekspansji tych fragmentów?

Za rozdziałem opisującym eksperymenty i uzyskane wyniki w trzech pracach cyklu znajduje się syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników, wykaz stosowanych skrótów oraz bibliografia. W pracy znalazły się także trzy załączniki: życiorys naukowy doktoranta, prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia autorów tych prac na temat wkładu w ich powstanie.

Podsumowując, eksperymenty zaprezentowane w publikacjach z cyklu zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone, a uzyskane wyniki są wiarygodne. Doktorant z wyczuciem interpretuje je, zdając sobie sprawę z ograniczeń stosowanych metod. Cała rozprawa potwierdza biegłość doktoranta w modelowaniu RNA, zwłaszcza z wykorzystaniem narzędzia RNAComposer. Zaprezentowane wyniki pokazują, że umiejętnie stosując ten program jesteśmy w stanie nie tylko przewidywać strukturę przestrzenną RNA w wiarygodny sposób, ale także projektować cząsteczki RNA o pożądanym cechach. Doktorant jednoznacznie

wykazał swoją dojrzałość naukową, zaprezentował odpowiedni warsztat i potwierdził, że jest gotowy rozpocząć nowy etap pracy naukowej. **Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie pana Marcina Biesiady do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**