UNIWERSYTET WARSZAWSKI | CeNT CENTRUM NOWYCH TECHNOLOGII

11 sierpnia, 2023

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 600
http://bionano.cent.uw.edu.pl

Rada Naukowa
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Marcina Biesiady

Rozprawa doktorska mgra Marcina Biesiady zatytułowana „Modelowanie przestrzennych struktur RNA w badaniach ewolucji na poziomie molekularnym i projektowaniu nanocząstek RNA" została napisana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Pachulskiej-Wieczorek, prof. IChB PAN, w Zakładzie Struktury i Funkcji Retrotranspozonów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Temat badawczy autora rozprawy dotyczy badania procesu ewolucji wybranych cząsteczek RNA przy użyciu metod modelowania struktur trójwymiarowych oraz projektowanie na tej podstawie nanocząstek RNA. W ostatnich dekadach dowiedziono, że RNA jest równie istotną cząsteczką jak DNA czy białka, która ma znaczenie nie tylko w procesie translacji. Istnieje wiele rodzajów RNA, także niekodujących, które biorą udział lub regulują różne procesy w komórce. Cząsteczki RNA mogą też być używane jako szczepionki, tak jak przekonaliśmy się w czasie pandemii wirusa SARS-Cov-2. Badania cząsteczek RNA, w szczególności ich pełnoatomowej struktury przestrzennej, są więc istotne dla zrozumienia wszelkich mechanizmów, w których RNA uczestniczy oraz które reguluje. Rozprawa pana Marcina Biesiady podejmuje właśnie kwestie określania struktur RNA metodami obliczeniowymi, które uwzględniają także wiedzę z danych doświadczalnych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest oparta o wyniki badań autora opublikowanych w następujących artykułach, w których pan Marcin Biesiada występuje jako pierwszy autor:
Biesiada M; Purzycka KJ; Szachniuk M; Blazewicz J; Adamiak RW *Automated RNA 3D structure prediction with RNAComposer. Methods Mol Biol*. 2016, 1490:199-215
Biesiada M; Pachulska-Wieczorek K; Adamiak RW; Purzycka KJ *RNAComposer and RNA 3D structure prediction for nanotechnology. Methods*. 2016, 103:120-7
Biesiada M; Hu MY; Williams LD; Purzycka KJ; Petrov AS *rRNA Expansion ES7 in Eukaryotes: from Signature Fold to Tentacles. Nucleic Acids Res*. 2022, 50(18): 10717-10732

Czasopisma, w których mgr Marcin Biesiada opublikował wyniki badań są anglojęzyczne i znajdują się na liście *Journal Citation Reports* o wysokich wskaźnikach oddziaływania (tzw. *impact factor*, IF). Dla *Methods* aktualny IF wynosi 4,6 a dla *Nucl. Acids Res*. 19,1. *Methods in Molecular Biology* jest serią książek wydawnictwa Springer, w którym artykuł został napisany na zaproszenie wydawcy. Pan Biesiada jest także współautorem sześciu innych artykułów, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej.

Do rozprawy załączono oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu do prac zbiorowych, a także oświadczenie mgra Biesiady dotyczące jego wkładu w publikacje będące przedmiotem rozprawy. Z tych oświadczeń wynika, że pan Biesiada miał znaczący wkład w opracowanie i dostarczenie wyników do wszystkich trzech publikacji. Wykonał wszystkie przewidywania trójwymiarowych struktur RNA, które zostały opisane w artykułach. Przygotowywał też większą część rysunków i tabel oraz filmy. Brał udział w opracowywaniu koncepcji artykułów oraz w przygotowaniu manuskryptów publikacji.

Cykl powyżej wymienionych artykułów poprzedza około 40 stronicowe wprowadzenie, które stanowi ważną część rozprawy. Wprowadzenie zostało napisane w języku polskim, poza streszczeniem rozprawy, które jest w języku angielskim. Po streszczeniach autor umieścił ogólne wprowadzenie do tematyki RNA oraz przewidywania struktury RNA. W pierwszej części autor przedstawia podstawowe informacje dotyczące budowy RNA. W kolejnym podrozdziale przechodzi do opisu metod przewidywania struktur przestrzennych RNA. Następnie przedstawia zasady działania programu RNAComposer, który był głównym narzędziem używanym w pracy badawczej autora. W kolejnym krótkim podrozdziale pan Biesiada opisuje funkcje RNA oraz podaje przykłady zastosowania różnych rodzajów cząsteczek RNA w terapii, a także wyzwania związane z badaniem cząsteczek RNA.

W kolejnym, szóstym rozdziale autor przedstawia główny cel badań oraz cele szczegółowe. Celem rozprawy było przewidywanie struktury różnych cząsteczek RNA oraz zaprojektowanie nanocząstki RNA. Określanie struktur RNA było ściśle związane z badaniem mechanizmów ewolucji RNA.

Pierwsza z cyklu prac opublikowana w 2016 roku w *Methods in Molecular Biology* jest szczegółowym opisem działania narzędzia RNAComposer. Pierwszą część tej publikacji można określić mianem podręcznika użytkownika wraz z rysunkami. W kolejnej części, na przykładzie ryboprzełącznika lizynowego, autor określił i opisał jak dokładność struktury drugorzędowej, która jest wprowadzana jako parametr wejściowy do programu RNAComposer wpływa na jego wyniki, czyli dokładność struktury przestrzennej. Autor wnioskuje, że jakość struktury drugorzędowej istotnie wpływa na strukturę przestrzenną modelowaną przez program RNAComposer. Informacje umieszczone w tej pracy uważam za istotne z punktu widzenia osób, które chciałyby używać oprogramowania RNAComposer, a nie mają doświadczenia w przewidywaniu struktur RNA. Kroki i komendy oraz istotne dane wejściowe są dokładnie wyjaśnione. W tej publikacji autor wykazał, że potrafi nie tylko modelować struktury przestrzenne RNA, ale także zna dokładnie działanie programu RNAComposer.

W kolejnej publikacji z 2016 roku w *Methods* autor przechodzi do tematyki projektowania nowych struktur RNA, które mogą być przydatne w nanotechnologii. Głównym wynikiem pracy jest stwierdzenie, że program RNAComposer nadaje się także do projektowania nowych cząsteczek RNA a nie tylko przewidywania struktury przestrzennej naturalnie występujących RNA. W pracy tej autorzy

przedstawiają zaproponowany i przetestowany przez nich protokół projektowania nowych struktur RNA z zaprogramowaną określoną funkcją. Protokół został najpierw przetestowany na RNA bakteriofaga o nazwie phi29, gdyż dla tego RNA były dostępne kontrolne struktury trójwymiarowe wyznaczone doświadczalnie.

Następnie pan Biesiada zaprojektował nanokwadrat RNA, dopasowując jego składowe tak aby oddziaływały tworząc odpowiednią strukturę. Zadanie polegało na rozszerzeniu funkcjonalności potwierdzonego wcześniej nanokwadratu, którego elementy samoasocjują. Do takiego nanokwadratu autor rozprawy dodał spinkę. Dodanie spinki, która mogłaby wiązać ligand albo selektywnie oddziaływać z innym RNA, mogłoby być istotne w projektowaniu różnych nanostruktur RNA. W tym celu autor przetestował co najmniej kilkanaście różnych spinek, w tym trójramiennych. Nanokwadrat składał się ostatecznie z ośmiu niezależnych nici RNA. Część dotyczącą projektowania takiego układu uważam za istotną część rozprawy, która wykracza poza samo testowanie oprogramowania w oparciu o znane struktury RNA.

W trzeciej z cyklu prac, opublikowanej w *Nucl. Acids Res.* w 2022 roku, autor modelował fragment RNA rybosomu eukariotycznego, nazywany siódmym segmentem ekspansyjnym. Ten segment jest niezbędny u rRNA eukariotycznych, gdyż jest miejscem wiązania białek rybosomowych. Dodatkowo, ten segment ewoluował poza jeden konserwowany element (tzw. zwój sygnaturowy) i u wyższych organizmów znacznie się wydłużał i rozgałęział. Autor rozprawy przeanalizował własności tego segmentu modelując jego strukturę dwu- i trójwymiarową u różnych organizmów. Struktury te wyznaczał na podstawie uliniowienia sekwencji struktur wyznaczonych doświadczalnie oraz doświadczeń typu SHAPE. Zastosował podejście hybrydowe, gdyż istotną informacją służącą do modelowania był sposób ewolucji tego fragmentu rRNA. Opracowana procedura modelowania programem RNAComposer pozwoliła na stworzenie modeli pełnoatomowych nie tylko fragmentu ekspansyjnego, ale także całego rRNA dużej podjednostki rybosomu myszy.

Odnośniki literaturowe to ponad 140 pozycji; autor cytuje głównie artykuły anglojęzyczne z listy *Journal Citation Reports*. Rozprawę dobrze się czyta, gdyż jest napisana poprawnym językiem.

Podoba mi się, że autor rozumie, że RNA jest samo w dobie cząsteczką dynamiczną, raczej zespołem struktur a nie jedną konformacją. Przewidujemy raczej zespół możliwych konformacji, podobnie jak w doświadczeniach spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

Znalazłam kilka błędów językowych i nieścisłości, które wymieniam poniżej z powodu mojej roli jako recenzenta rozprawy.

Numeracja podrozdziałów rozdziału 5. Wprowadzenie przedstawiona w spisie treści nie odpowiada numeracji pojawiającej się w rozprawie. Dodatkowo, przy części tytułów podrozdziałów 5 nie pojawia się żadna numeracja, co trochę utrudnia nawigowanie. To samo dotyczy rozdziału 7.

W części dotyczącej przedstawienia budowy RNA (str. 10) pojawia się informacja, że RNA jest zbudowany z 4 różnych nukleotydów, ale nie ma informacji, że występuje przecież wiele modyfikowanych nukleotydów, m. in. w transportującym RNA (tRNA). Jak na rozprawę doktorską ta część jest zbyt podstawowa.

Str. 15 raczej nie używamy określenia „reszta guanozyny” czy „reszta guaniny” tylko reszta fosforanowa lub cukrowa.

Str. 15 chyba chodzi o trudności w wyznaczeniu struktur a nie oznaczeniu

Str. 16 W tytule podrozdziału powinno być „składanie”

Str. 17 powinno być „udokładniania”

Str. 20 „Jednakże to struktura trzeciorzędowa RNA posiada bardziej wyrafinowane właściwości…” Nie rozumiem co to są wyrafinowane właściwości RNA?

Str. 23 brakuje kropki po danych wejściowych.

Str. 24 powinno być pomiędzy dwiema pętlami

Str. 26 Autor napisał „…dokładniejsza struktura drugorzędowa cząsteczki pozwalała na bardziej zbliżone do modelu rzeczywistego przewidywanie modelu przestrzennego, co przedstawia Tabela 1 poniżej.” O jaki model rzeczywisty chodzi, czy jest to struktura krystalograficzna? A jeśli tak to nie uznałabym jej za model rzeczywisty…

Str. 26 Tabela 1 ostatnia kolumna. Brakuje jednostek energii.

Str. 26 Autor stwierdza, że przewidywanie struktur przestrzennych RNA przez RNAComposer jest silnie zależne od jakości wprowadzonych danych. Jest to raczej ogólna zasada, która dotyczy wszystkich programów, ale czy akurat tutaj nie ma także zależności od typów danych?

Str. 27 pierwsze zdanie, nie jest jasne o co chodzi „o strukturę 3D helisy alpha”. W przypadku RNA nie mówimy o helisie alpha?

Str. 30 powinno być „Strukturę wprowadzanej spinki zaprojektowałem tak,”

Str. 33 powinno być „…eksperymentalnie wyznaczone struktury 3D rybosomów…” a nie „oznaczone”.

Str. 42 powinno być „..opracowanie modelu zarządzania…”

Str. 42 powinno być „..i ich wpływu..”

Interesuje mnie także następująca kwestia. Dwie prace, w których autor modelował struktury przestrzenne RNA ukazały się w 2016 roku. Czy obecnie oprogramowanie RNAComposer zawiera istotne uaktualnienia, które spowodowałyby, że przewidywania byłyby inne? Pojawił się także w ostatnich dwóch latach program AlphaFold 2, który dobrze przewiduje struktury białek i jego odpowiednik dla kwasów nukleinowych już w zasadzie też będzie niebawem dostępny. Czy gdyby autor przewidywał struktury teraz to czy wyniki byłyby inne i jak to by wpłynęło na wnioski?

Ciekawa też jestem na czym polegała ręczna korekta struktury 2D i dlaczego była potrzebna (str. 33)?

Podsumowując, pan Marcin Biesiada przedstawił cykl publikacji, w których zawarł wyniki badań dotyczących modelowania struktury przestrzennej różnych RNA. Zrealizował cele badawcze swojej rozprawy doktorskiej. Niewątpliwie jest obecnie ekspertem w przewidywaniu i modelowaniu struktur dwu- i trójwymiarowych RNA przy użyciu programu RNAComposer. Ma także ogromną wiedzę dotyczącą wykorzystania bazy RNA FRABASE oraz innych programów służących analizie cząsteczek RNA. Potrafi także zaprojektować sekwencję nanocząstki RNA, tak by otrzymać odpowiednią strukturę trójwymiarową RNA o określonej funkcji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi 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.

J. Trylska