

Poznań, 29 września 2023 r.

Dr hab. Katarzyna Dorota Raczyńska, prof. UAM  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

### Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Marty Katarzyny Wojnickiej pt.: „Potencjalna aktywność DNazowa oraz możliwe funkcje biologiczne wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem pani prof. ICHB PAN, dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, a zrealizowana w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Tematyka badań koncentruje się wokół dwóch zagadnień. Pierwsza część rozprawy dotyczy analizy aktywności DNazowej ludzkiego białka hDicer oraz jego skróconych wariantów. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, dotyczące aktywności DNazowej wariantu tDCR-1, który jest skróconą formą Dicer *C. elegans*, pytanie postawione przez doktorantkę było całkiem zasadne. I rzeczywiście, wykazała ona, że warianty pozbawione domeny DUF283, domeny PAZ lub całej kasety PPC, hydrolizują jedno- i dwuniciowe DNA. W drugiej części rozprawy doktorantka podjęła próbę przybliżenia funkcji jednej ze skróconych form hDicer, występującej w komórkach raka piersi o fenotypie nabłonkowym oraz w komórkach raka płaskonabłonkowego języka, Dicer1e. W tym celu, przebadła aktywność nukleazową tej izoformy, wykazując jej zdolność do hydrolizy krótkich RNA i jednoniciowych DNA. Ponadto, doktorantka wykonała analizy wysokoprzepustowego sekwencjonowania całkowitego RNA, które pozwoliły, między innymi, przypisać Dicer1e rolę w replikacji i organizacji DNA. Zastanawiam się, dlaczego doktorantka nie przeprowadziła również wysokoprzepustowego sekwencjonowania małych RNA? Uzyskane dane dostarczyłyby informacji o ekspresji miRNA i ich długości oraz klasach i długości innych cząsteczek powstających w tych warunkach. W dalszej części, można by powiązać ich poziom z poziomem zróżnicowanych transkryptów mRNA, uzyskanych z analiz całkowitego RNA. Być może przybliżyłoby to wyjaśnienie mechanizmu molekularnego związanego z zahamowaniem proliferacji oraz zwiększoną wrażliwością na cisplatinę komórek raka płaskonabłonkowego języka, obserwowanego po wyciszeniu ekspresji wariantu Dicer1e.

Badania doktorantki mają wysoką wartość naukową i niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat funkcji hDicer i jego wariantu Dicer1e. W mojej opinii, na podkreślenie w tej rozprawie doktorskiej zasługuje też kilka innych kwestii. Realizacja badań wymagała od autorki wykonania szeregu eksperymentów z wykorzystaniem badanych białek, do których przygotowała konstrukty genetyczne i zoptymalizowała metodę ich nadekspresji i oczyszczania. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane z wykorzystaniem różnych wariantów reakcji kontrolnych, co pozwoliło „wyłapać” wyniki fałszywie pozytywne i tym

strona 1 z 3

samym zwiększało wiarygodność i rzetelność wyciągniętych wniosków. Obrazy żeli po rozdziale elektroforetycznym są bardzo dobrej jakości a przedstawiane wyniki powtarzalne, co niewątpliwie świadczy o zoptymalizowanych warunkach eksperymentalnych i wysokich umiejętnościach manualnych doktorantki. Dyskusja jest napisana w sposób ciekawy i dojrzały naukowo.

Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr Marta Wojnicka jest współautorką 5 publikacji, wszystkie powstały w okresie realizacji rozprawy doktorskiej i każda dotyczy tematyki związanej z białkiem Dicer. Publikacje pojawiły się w renomowanych czasopismach, takich jak *Int. J. of Mol. Sci. czy Cell. and Mol. Life Sciences*. W jednej pracy, opublikowanej w *Molecules*, najbardziej zbliżonej z tematyką opisywaną w niniejszej rozprawie, doktorantka jest pierwszym autorem.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich. Na początku znajdujemy polskie i angielskie streszczenie pracy doktorskiej, trochę jednak zbyt długie moim zdaniem. Następnie, we „Wstępie” możemy zapoznać się z budową, biogenezą i funkcją miRNA i siRNA oraz strukturą i funkcją hDicer oraz poszczególnych jego domen. Dalej znajduje się „Cel pracy” i następnie opisane są wykorzystane „Materiały” i zastosowane „Metody”. W kolejnej części poznajemy „Wyniki” uzyskane przez doktorantkę i rozważania naukowe na ich temat w części „Dyskusja”. Warto podkreślić, że cała rozprawa przygotowana jest w sposób bardzo staranny, napisana poprawną polszczyzną, z właściwym doбором słów i znajomością terminologii w zakresie dyscypliny, uzupełniona starannie przygotowanymi rysunkami. Autorka unika żargonu laboratoryjnego, zdania są jasne, wnioski sformułowane poprawnie.

Zdarzają się naprawdę nieliczne błędy, przecinki w niewłaściwych miejscach, czy niezręczne sformułowania typu „produkty te nie były obserwowane we wszystkich reakcjach kontrolnych” zamiast „produktów tych nie obserwowano w żadnej reakcji kontrolnej”, „konstrukcja” zamiast „konstrukt genetyczny”, „bufor do cięć” zamiast „bufor do reakcji cięcia”, „PCR - reakcja łańcuchowej polimerazy” zamiast „reakcja łańcuchowa polimerazy”. Pewne zdania są niejasne, gdyż stanowią za duży skrót myślowy, jak na przykład „częściowa komplementarność miRNA zwiększa pulę docelowych transkryptów mRNA”. Ponadto, rozprawa posiada pewne niedociągnięcia redakcyjne: 1) Na niektórych wynikach analiz proteomicznych brakuje markerów mas cząsteczkowych. 2) Wydaje mi się, że struktura Dicer d na Rys. 24 jest błędnie przedstawiona, forma Dicer d powinna mieć krótszą domenę RNazy IIIa. 3) Rys. 2, M – czyli niesparowana cytozyna lub adenina w motywie GYM, na schemacie jest sparowana. 4) Na stronie 31, skład pożywki do hodowli komórek HEK293T został podany w języku angielsku. 5) Prędkości wirowań powinny być podane w wartościach „g”, nie w „rpm”. 6) Na Rys. 15 brak informacji o próbach nałożonych do kieszonek 3 i 4. 7) W wielu miejscach, zapis „RNA o długości 1/2 nt” jest nieprawidłowy, powinno być „RNA o długości 1-2 nt”. Te niedociągnięcia nie umniejszają jednak dużej wartości naukowej niniejszej pracy.

W trakcie czytania niniejszej rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, mianowicie:

1. Dlaczego doktorantka w części rozprawy dotyczącej analiz funkcji Dicer1e, tj. oczyszczania białka Dicer1e, analizy RNA-seq, nie użyła linii komórkowej T47D, czyli linii

komórkowej raka piersi, w której pierwotnie zidentyfikowano obecność wariantu Dicer1e? Byłby to naturalny model badawczy.

2. Na stronie 26 znajdujemy informację, że po indukcji apoptozy, „w wyniku przecięcia Dicer przez CED-3 powstają dwa fragmenty”, między innymi „N-końcowy o masie około 193 kDa” Czy fragment ten ma jakąś funkcję w *C. elegans*? W pracy znajdujemy informację tylko na temat funkcji drugiego fragmentu, C-końcowego. Kontynuując, czy fragment o masie 185 kDa, powstający na skutek indukcji apoptozy i aktywności kaspazy 3/7 w komórkach HeLa, można uznać za odpowiednik wyżej wspomnianego fragmentu N-końcowego u *C. elegans*?

3. W pracy doktorantka skupiła się na funkcji wariantu Dicer1e, ciekawi mnie jaką aktywność, według doktorantki, bazując na danych literaturowych i wynikach doktorantki, miałby wariant „d” względem ssDNA, dsDNA, ssRNA i dsRNA?

4. W reakcjach opisywanych na Rys. 12, 21 i 32, obserwujemy produkty różnej długości, w tym fragmenty 6 nt i 15 nt. Jak można wyjaśnić ich powstawanie?

5. Nie znalazłam wyjaśnienia, dlaczego reakcje z Rys. 14B prowadzono w obecności 50 nM białka, a reakcje z Rys. 15 i 16 – w obecności 12,5 nM białka.

6. Dlaczego nie wykonano analizy aktywności DNazowej preparatów białkowych: Dicer1e, Δ-PAZ, oraz Dicer1e (D1320A/D1709A) względem dwuniciowych substratów DNA?

7. Nie jest dla mnie do końca jasne, dlaczego doktorantka stosuje dwa różne układy badawcze do analizy wyników RNA-seq, to znaczy, komórki HEK293T No\_Dice+Dicer1e porównuje do komórek HEK293T No\_Dice traktowanych odczynnikami do transfekcji, natomiast komórki HEK293T+Dicer1e porównuje tylko do komórek HEK293T typu dzikiego?

8. Jak doktorantka wytłumaczyłaby wyniki analiz wysokoprzepustowego sekwencjonowania wskazujące, że w komórkach HEK293T+Dicer1e więcej genów ulega obniżonej ekspresji, podczas gdy w komórkach HEK293T No\_Dice+Dicer1e więcej genów ulega podwyższonej ekspresji?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Marty Katarzyny Wojnickiej uważam za wartościową naukowo i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Badania naukowe Doktorantki niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat nieopisaną dotąd aktywności DNazaowej hDicer oraz charakterystyki funkcjonalnej wariantu Dicer1e. 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 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Marty Katarzyny Wojnickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Raczyńska

Katarzyna Dorota Raczyńska

strona 3 z 3