



Warszawa, 23.10. 2023

Dr hab. Elżbieta Nowak
Laboratorium Struktury Białka
Międzynarodowy Instytut Biologii
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
e-mail: enowak@iimcb.gov.pl
tel.: (+48) 22 5970721

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Katarzyny Wojnickiej.

Pani mgr inż. Marta Katarzyna Wojnicka przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Potencjalna aktywność DNazowa oraz możliwe funkcje biologiczne wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer”. Praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein w ICHB PAN pod kierunkiem Pani promotor prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak.

Tytułowy enzym to wielodomenowe białko należące do rodziny RNaz III. Dicer jest kluczowym uczestnikiem w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Ludzka rybonukleaza Dicer (hDicer) jest znana przede wszystkim z roli, jaką pełni w procesie dojrzewania krótkich regulatorowych RNA: miRNA oraz siRNA. Poza fundamentalną rolę w regulacji ekspresji genów, rybonukleaza Dicer okazała się również kluczowa w różnych procesach komórkowych, od mechanizmów obrony przeciwwirusowej po utrzymanie stabilności genomu. Co więcej, zaburzona aktywność Dicer została powiązana z różnymi stanami patologicznymi, w tym nowotworami i chorobami neurodegeneracyjnymi, podkreślając jego znaczenie dla ludzkiego zdrowia i rozwoju chorób. W ten nurt wpisują się badania prowadzone przez Panią mgr Martę Wojnicką.

Dysertacja została napisana w formie klasycznej i składa się z następujących części: części literaturowej, opisu materiałów i metod badawczych (łącznie z opisem procedur doświadczalnych), wyników oraz dyskusji. Ponadto Doktorantka przedstawia cel pracy,

podsumowanie oraz spis cytowanej bibliografii. Dodatkowo na początku pracy Autorka umieściła streszczenie pracy w j. polskim i angielskim, podaje spis skrótów stosowanych w rozprawie oraz załącza listę publikacji, w których jest współautorką. Podsumowując jest to 151 stron bardzo dobrze zredagowanego tekstu i starannie wykonanych rysunków.

Praca rozpoczyna się od wstępu, w którym Autorka w bardzo przejrzysty sposób przedstawiła wszystkie najważniejsze zagadnienia niezbędne do przybliżenia podjętej tematyki badawczej. Doktorantka opisała strukturę oraz biogenezę krótkich regulatorowych RNA, w których uczestniczy hDicer oraz ich rolę w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genów. Przedstawiona została także budowa hDicer z uwzględnieniem znaczenia poszczególnych domen tego białka w wiązaniu substratu pre-miRNA. Doktorantka przybliżyła również stan wiedzy na temat funkcji pełnionych przez hDicer wykraczający poza zakres biogenezy srRNA. Rozdział ten został wzbogacony rycinami, co stanowi dodatkowy atut estetyczny i poznawczy. Muszę przyznać, że czytałam ten tekst z dużą przyjemnością, doceniając, iż z tak szerokiej tematyki jaką są molekuly RNA, Doktorantka świadomie ograniczyła się do zagadnień istotnych w dalszej części pracy.

W kolejnym rozdziale przedstawione zostały cele badawcze. Pierwszym z nich było określenie czy hDicer pełnej długości oraz jej warianty pozbawione poszczególnych domen posiadają aktywność nukleolityczną. Drugim zdefiniowanym celem była charakterystyka biochemiczna białka Dicer1e, będącym naturalnie występującą w komórkach skróconą formą hDicer, jak również określenie jego funkcji biologicznych. Dla każdego z celów Doktorantka przedstawiła sprecyzowane zadania badawcze.

Rozdział obejmujący materiały i metody w sposób bardzo skrupulatny przedstawia opis materiałów i technik badawczych stosowanych podczas realizacji niniejszej pracy. Metodyka badań została dobrana adekwatnie do przedstawionych wcześniej celów pracy i umożliwiła uzyskanie odpowiednich danych, pozwalających odpowiedzieć na wcześniej postawione pytania. Należy podkreślić, że Doktorantka wykonała szereg eksperymentów obejmujących prace na poziomie genetycznym, białkowym jak i komórkowym. Cennym jest włączenie do badań sekwencjonowań nowej generacji oraz analiz bioinformatycznych i transkryptomycznych. Opisy w tym rozdziale nie budzą moich zastrzeżeń i są na tyle dokładne, że pozwalają na powtórzenie doświadczeń.

W kolejnej części pracy Doktorantka w sposób usystematyzowany przedstawia otrzymane wyniki. Na wstępie Pani Marta Wojnicka przygotowała i oczyściła 6 wariantów delecyjnych białka hDicer. Aktywność nukleolityczna oczyszczonych białek została sprawdzona z użyciem różnej długości znakowanych substratów RNA i DNA z wykorzystaniem elektroforezy żelowej. Rezultaty badań, potwierdzające aktywność wobec obu typów cząsteczek, uzyskane dla wariantów białkowych Δ PAZ and Δ PPC, zostały opublikowane przez Doktorantkę w 2020 r. w *Molecules*. Testy aktywności z użyciem substratów DNA dla kolejnych wariantów białka wykazały, że hydroliza DNA jest obserwowana tylko w przypadku usunięcia domeny DUF283. Dalsza treść opisująca wyniki poświęcona jest analizie bioinformatycznej, której celem była identyfikacja mRNA kodujących skrócone formy białka hDicer. Tylko forma Dicer1e posiadała obie funkcjonalne domeny RNazy III, dlatego też Doktorantka skupiła się na charakterystyce biochemicznej tego białka. Jednocześnie, mając na uwadze, iż w komórkach zmienionych nowotworowo obserwuje się podwyższony poziom Dicer1e, Doktorantka przeprowadziła eksperymenty *in cellulo*, mające na celu porównanie zmian ekspresji genów powiązanych z nadprodukcją Dicer1e.

Bardzo ciekawą część pracy stanowi dyskusja wyników, która w mojej ocenie została napisana bardzo dojrzałe. Doktorantka wnikliwie porównuje uzyskane rezultaty, odnosząc się do publikacji innych badaczy. Szczególnie ważna i ciekawa jest analiza aktywności Dicer1e jak i analiza porównawcza ekspresji genów, których poziom uwarunkowany był najprawdopodobniej obecnością Dicer1e w komórce. Doktorantka ostrożnie proponuje funkcje biologiczne białka Dicer1e, jednocześnie zaznaczając, iż uzyskane wyniki - choć bardzo ciekawe - potrzebują dalszych wnikliwych badań. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki, posiadaniu rozległej wiedzy, znajomości opisywanych zagadnień naukowych, kreatywnym myśleniu i ciekawości naukowej.

W końcowej części dyskusji Doktorantka formułuje główne wnioski, do których nie mam zastrzeżeń.

Praca doktorska mgr Marty Wojnickiej reprezentuje wysoki poziom merytoryczny, jednak w trakcie jej czytania nasunęło mi się kilka uwag i pytań:

1. Na str. 73 pokazana jest czystość uzyskanego preparatu białkowego na żelu poliakryloamidowym, jednak nie widząc całej ścieżki, w której migrowało białko trudno jest ocenić jakość tego preparatu.
2. Na str. 73 Autorka wspomina, iż do określania stężenia białka stosowano BSA o znanym stężeniu. W pracy nie znalazłam opisu przygotowania krzywej wzorcowej ani samej krzywej.
3. W pracy pojawiają się drobne błędy edytorskie oraz niefortunne stwierdzenia np. „białko prezentuje aktywność”.
4. Domyślam się, że uzyskanie przedstawionych wyników, wysokiej jakości, nie było trywialne. Tego typu eksperymenty zwykle wymagają szeregu optymalizacji, o których warto byłoby wspomnieć w treści pracy.
5. Czy Doktorantka mogłaby spróbować wyjaśnić, dlaczego obecność domeny helikazy jest konieczna, by enzym mógł osiągnąć aktywność DNazy choć wiadomo, że usunięcie tej domeny zwiększa procesywność enzymu względem pre-siRNA?
6. Białko Dicer1e powstaje na skutek alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Czy wiadomo coś więcej na temat związku między zwiększonym poziomem wariantu Dicer1e w komórkach nowotworowych a ekspresją genów, kodujących białka zaangażowane w proces składania pierwotnego transkryptu?
7. W badaniu zmian poziomu wybranych miRNA w komórkach HEK293T oraz HEK293T No Dice wykazano znaczne zmniejszenie poziomów miRNA w drugim typie komórek transfekowanych *Dicer1e::3xFlag Tag*, zwłaszcza po 72h inkubacji. Czy bezwzględne poziomy ekspresji genu referencyjnego U6 zmieniały się w tym czasie? Czy oprócz poziomów miRNA monitorowano również zmiany morfologii komórek w obu punktach czasowych?

Przedstawione powyżej uwagi i spostrzeżenia w żaden sposób nie wpływają na jakość prezentowanej pracy. Podsumowując, całość pracy oceniam wysoko, zwracając uwagę, iż wnosi ona znaczący wkład w poznawanie mechanizmów działania enzymów związanych z dojrzewaniem krótkich regulatorowych RNA.

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 wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Marty Katarzyny Wojnickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Elzbiecie Nowceł