

Poznań, 24 października 2023 roku

dr hab. Marzena Skrzypczak-Zielińska, prof. IGC PAN
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Marty Katarzyny Wojnickiej

pt. „Potencjalna aktywność DNazowa oraz możliwe funkcje biologiczne wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer”

wykonanej w

Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

pod kierunkiem dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. IChB PAN

1. Tematyka podjętych badań

Temat podjętych badań jest bardzo aktualny, nowatorski i ambitny. Po czasie intensywnych badań regionów RNA kodujących białka uwaga naukowców skupiła się na regionach niekodujących RNA, szczególnie mikroRNA (miRNA), których zmieniona ekspresja wiązana jest np. z rozwojem wybranych nowotworów. Wiedza ta jest bardzo pożądana przez świat medyczny z uwagi na poszukiwanie prognostycznych i predykcyjnych wskaźników chorób, a także celem opracowania nowych metod leczniczych z wykorzystaniem antysensownych miRNA czy terapii mających na celu kompensację ilości cząsteczek konkretnych miRNA.

W biogenezie krótkich regulatorowych RNA, przede wszystkim mikroRNA i krótkiego interferującego RNA (ang. *small interfering* RNA, siRNA), bierze udział rybonukleaza Dicer, która z takiej funkcji jest najbardziej znana. Jednakże rybonukleaza Dicer, posiadająca bardzo złożoną budowę, może posiadać liczne dodatkowe funkcje istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki człowieka, o których jeszcze niewiele wiemy. W niniejszej rozprawie doktorantka podjęła się zadania określenia jednej z potencjalnych aktywności rybonukleazy Dicer, mianowicie aktywności DNazowej oraz możliwych funkcji biologicznych wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer. Jak dotąd nie udało się wykazać występowania aktywności DNazowej u Dicer kręgowców. Stwierdzam, że **zagadnienia podjęte w rozprawie są nowatorskie i stanowią ważny temat badawczy,**

a uzyskane wyniki są pożądane nie tylko w kontekście naukowym, ale i być może zastosowaniu klinicznym w przyszłości.

Należy także zaznaczyć, że w prowadzeniu badań dotyczących funkcji pełnionych przez rybonukleazę Dicer w Polsce znaczący udział posiada dr. hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. IChB PAN – Promotor rozprawy doktorskiej. Zadania badawcze podjęte zatem w niniejszej rozprawie stanowią kontynuację i rozwinięcie zainteresowań oraz osiągnięć Pani Promotor.

2. Ocena formalna

Mgr Marta Wojnicka poprawnie sformułowała hipotezy badawcze, właściwie dobrała i zastosowała metodykę, a treść pracy odpowiada tematowi określonego w tytule. Pod względnym formalnym rozprawa nie budzi żadnych zastrzeżeń i napisana jest w tradycyjnym układzie, obejmując następujące części: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski końcowe, literatura, a także załącznik do pracy, zawierający cztery tabele z zestawieniem wspólnych genów oraz wykaz kategorii ontologii genów ulegających zmiennej ekspresji warunkowanej produkcją wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T. Na początku pracy poza spisem treści znajduje się wykaz skrótów oraz dorobek naukowy doktorantki, obejmujący pięć prac oryginalnych z ostatnich opublikowanych w latach 2020-2022 (łącznie współczynnik IF 35,757). Doktorantka w jednej publikacji jest pierwszym autorem, a w dwóch drugim. Należy też zaznaczyć, że artykuły mimo, iż są z ostatniego czasu, posiadają stosunkowo wysoką ilość cytowań (łączna ilość cytowań wg Scopus: 40). Praca doktorska była realizowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu SONATA BIS nr 2016/22/E/NZ1/00422 przyznanego Pani Promotor.

Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje 183 pozycje, zarówno autorów polskich, jak i zagranicznych, które zostały uszeregowane wg kolejności cytowania w tekście. Rozprawa napisana jest bardzo starannie i poprawną polszczyzną. Niezauważalne są nawet drobne błędy językowe i edytorskie. Doktorantka zamieściła w pracy liczne ilustracje i wykresy (41 pozycji), które ułatwiają zrozumienie tekstu i są jak najbardziej pożądane w pracy. Drobna uwaga dotyczy podpisu ilustracji, gdyż są kolejno nazwane jako „rysunek”. Trafniej jest zastosować określenie „rycina”. Poza tym, pomocnym w czytaniu rozprawy byłby spis rycin, a także spis tabel. Jednakże uchybienia są drobiazgami i nie wpływa w istotny sposób na ocenę pracy.

3. Ocena merytoryczna

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i jest zawarta na 151 stronach maszynopisu.

We wstępie liczącym 17 stron Doktorantka zaczyna od ogólnego wprowadzenia do tematyki, wyjaśniając strukturę i biogenezę krótkich regulatorowych RNA — miRNA oraz siRNA. Następnie opisuje rolę krótkich regulatorowych cząsteczek RNA (ang. *short regulatory RNA*, srRNA) w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genów, zmierzając do przedstawienia budowy i modelu działania ludzkiej rybonukleazy Dicer oraz udziału domen rybonukleazy hDicer w wiązaniu substratu pre-miRNA, cytując m.in. publikację z 2021 roku, w której jest drugim współautorem. W dalszej części powołując się na wyniki prac naukowych poświęconych tzw. niekanonicznym funkcjom Dicer człowieka i innych organizmów, Autorka przybliża funkcje Dicer niepowiązane ze szlakiem biogenezy

krótkich regulatorowych RNA oraz opisuje aktywność DNazową rybonukleazy Dicer skróconej formy Dicer u nicienia, pozbawionej domeny helikazowej, DUF283 oraz kasyety PPC, uzasadniając tym samym wybór celu swojej rozprawy. **Wstęp oceniam jako ciekawy, bardzo dobrze napisany i wartościowy, stanowiący aktualne oraz wyczerpujące temat opracowanie.**

Jako **główny cel** badań postawiono ocenę potencjału rybonukleazy Dicer człowieka oraz jej skróconych form do hydrolizy substratów DNA. Drugi wiodący cel pracy, który wynikał z faktu istnienia szeregu skróconych wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*, polegał na zbadaniu aktywności nukleazowej wariantu Dicer1e oraz zaproponowaniu potencjalnej funkcji biologicznej tej skróconej formy rybonukleazy Dicer człowieka. Drobną uwagę dotyczy sformułowania pierwszego celu. Właściwszym jako hipoteza badawcza byłoby zdanie twierdzące w miejsce pytania: czy hDicer oraz jej skrócone formy również posiadają potencjał do hydrolizy substratów DNA? **Nie mniej, cel pracy uznaję za bardzo ambitny i aktualny.**

Zastosowane Materiały zostały przedstawione na 13 stronach rozprawy, a metody badawcze na kolejnych 24 stronach. Obszerność tej części rozprawy świadczy o bogatym warsztacie laboratoryjnym i różnorodności metod, które zostały zastosowane podczas prowadzenia eksperymentów badawczych. Materiał do badań stanowiły linie komórkowe, szczepy bakteryjne, pożywki, wektory i konstrukcje genowe, startery, oligonuklotydy, enzymy, przeciwciała i odczynniki. Natomiast badania molekularne obejmowały: 1) **pracę z kwasami nukleinowymi** (m.in. przygotowanie konstrukcji genowych z sekwencją kodującą hDicer pełnej długości oraz wariant pozabawiony domeny PAZ, przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e, przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e z mutacją w domenach RNazy III, selekcję stransformowanych kolonii bakteryjnych, izolację plazmidowego DNA, elektroforezę kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących, w warunkach natywnych, znakowanie izotopem ^{32}P końca 5' oligonukleotydów RNA i DNA, badanie oddziaływań białko-RNA metodą różnicowej migracji w żelach poliakrylamidowych, izolację całkowitego RNA z ludzkich linii komórkowych oraz frakcji miRNA, odwrotną transkrypcję dla cząsteczek mRNA i miRNA), 2) **pracę z komórkami ssaczymi** (hodowla komórek ssaczyc, transfekcja komórek, izolacja frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej z komórek HEK293T, indukcja procesu apoptozy w komórkach), 3) **pracę z białkami** (immunoprecypitacja białek, rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących, detekcja białek immobilizowanych na membrane PVDF), oraz 4) **sekwencjonowanie RNA**. Jestem pod wrażeniem różnorodności metod i ogromnego nakładu pracy laboratoryjnej. Drobną uwagę dotyczy braku opisu oceny jakości preparatów RNA oraz w jaki sposób oceniano proces apoptozy w komórkach ludzkich linii HEK293T i HeLa? **Jednakże ogólnie, nie mam żadnych większych zastrzeżeń do tej części pracy.**

Rozdział Wyniki liczy 48 stron. Został podzielony na dwa duże podrozdziały: 1) Badanie potencjalnej aktywności DNazowej hDicer oraz 2) Skrócone formy hDicer: charakterystyka wariantu Dicer1e; które odpowiadają postawionym dwóm głównym celom rozprawy. Na podkreślenie, a zarazem uznanie, zasługuje spójny i przejrzysty sposób przedstawienia wyników. Mimo, że doktorantka uzyskała obszerną ilość danych, to zostały one zaprezentowane w zwięzły sposób, z należytą dbałością o szczegóły, zestawione w formie czytelnych tabel i rycin. Autorka zaprezentowała szereg ciekawych wyników,

oczywiście skupię się tylko na wybranych. Przede wszystkim badanie potencjalnej aktywności DNazowej hDicer potwierdziło hipotezę i po raz pierwszy u człowieka dowiedziono eksperymentalnie, że usunięcie domeny PAZ/kasety PPC umożliwia dostęp ssDNA do centrum aktywnego takiego wariantu delecyjnego hDicer. Co więcej, obserwowane skracanie substratu ssDNA (znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5') o jeden nukleotyd sugeruje aktywność egzonukleazową 3'→5' wariantów ΔPAZ i ΔPPC. Zatem potencjalna aktywność DNazowa hDicer może sugerować, iż w komórkach białko to może oddziaływać nie tylko z cząsteczkami RNA, ale także z cząsteczkami DNA. Tę część wyników doktorantka opublikowała jako pierwszy autor w czasopiśmie *Molecules* w 2020 roku. Uzyskane wyniki stawiają kolejne pytania badawcze dotyczące lokalizacji w komórce i procesów, w których aktywność DNazowa może być wykorzystywana? Druga bardzo ciekawa obserwacja dotyczy potencjalnej funkcji komórkowej wariantu Dicer1e. W badaniach z użyciem analizy NGS puli całkowitego RNA komórek HEK293T doktorantka wytypowała geny, których wzrost lub obniżenie poziomu ekspresji przypuszczalnie warunkowane były produkcją wariantu Dicer1e w komórce. Wytypowane geny zostały poddane analizie opartej na ontologii genów (GO). Ważną informacją jest to, że dominującą grupę genów w każdej z wymienionych kategorii GO stanowiły geny kodujące białka histonowe, których nadmierna ekspresja może prowadzić do wielu zaburzeń, np. cyklu komórkowego, niestabilności genomu w postaci nadmiernej utraty chromosomów, zwiększonej wrażliwości na czynniki uszkadzające DNA i cytotoksyczności. Wyniki te wymagają dalszych badań.

Rozdział Dyskusja składa się z 10 stron. Doktorantka ciekawie omawia uzyskane wyniki, zestawiając je z danymi z aktualnego piśmiennictwa oraz dodając dojrzałe i logiczne komentarze. Należy zaznaczyć, że badania są nowatorskie dla kręgowców, stąd konieczność prowadzenia szerokiej dyskusji z uwzględnieniem różnych typów organizmów. Pani mgr inż. Marty Katarzyny Wojnickiej doskonale sprostała temu zadaniu.

Najważniejsze informacje wynikające z badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zebrane w postaci pięciu wniosków. Uzyskane wyniki pozwoliły na realizację założonego celu. Doktorantka wykazała, że 1) hDicer może docinać krótkie RNA o długości miRNA/siRNA, a w procesie tym nie uczestniczą przypuszczalnie domeny PAZ i Platformy, odpowiedzialne za kotwiczenie kanonicznych substratów hDicer. Uzyskane wyniki sugerują, że hDicer mogłaby uczestniczyć w procesie degradacji nici pasażerskiej uwalnianej z dupleksu miRNA podczas tworzenia aktywnego kompleksu RISC. 2) hDicer posiada potencjał do hydrolizy substratów typu DNA. Przypuszczalnie dostęp substratów DNA do domen RNazowych hDicer jest ograniczony przez domeny otaczające centrum katalityczne enzymu, takie jak domena DUF283 lub PAZ. 3) Naturalnie występujący w komórkach skrócony wariant hDicer - Dicer1e, posiadający unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD, nie generuje produktów o długości miRNA/siRNA. Wariant ten może jednak hydrolizować krótkie RNA, co w połączeniu z analizą danych transkryptomicznych dotyczących komórek produkujących wariant Dicer1e może wskazywać, iż wariant ten jest zaangażowany w metabolizm komórkowych RNA. 4) Wariant Dicer1e posiada potencjał do hydrolizy substratów typu DNA. Konieczne są dalsze badania mające na celu zdefiniowanie puli komórkowych DNA, z którymi może oddziaływać hDicer i jej skrócone formy. 5) Zgromadzone dane pochodzące z analizy różnicowej poziomu ekspresji genów w komórkach produkujących i nieprodukujących Dicer1e sugerują, iż nadprodukcja Dicer1e

może wpływać na zwiększenie proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych poprzez: (i) podwyższenie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces replikacji i organizacji DNA oraz (ii) obniżenie ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za połączenia międzykomórkowe. **Nie mam zastrzeżeń co do formy przedstawienia wniosków.**

Podsumowując, uważam, że Pani mgr inż. Marta Katarzyna Wojnicka przygotowała ciekawą, i wartościową rozprawę doktorską, po przeczytaniu której nasuwają się pytania o charakterze dyskusyjnym: 1) Jakie są możliwości kontynuacji prowadzonych badań i czy doktorantka ma w planach takowe podjąć? 2) W jaki stopniu rybonukleaza Dicer może mieć wpływ na mediatory procesu zapalnego w organizmie człowieka? Jakie jest zdanie Doktorantki?

4. Wniosek końcowy

Rozprawa stanowi zwartą i logiczną całość. Doktorantka porusza bardzo aktualny, ważny i jednocześnie trudny temat, który dobrze wpisuje się w nowatorskie badania struktury i funkcji rybonukleazy Dicer człowieka. Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji pracą stwierdzam, że Doktorantka przygotowała bardzo wartościową rozprawę doktorską, która 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.

Ze względu na całościowe opracowanie zagadnienia i nowatorski charakter uzyskanych wyników **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.**

Skrypczyk-Zielińska Karolina

dr hab. Marzena Skrzypczak-Zielińska,
prof. IGC PAN