UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii
prof. dr hab. Paweł Golik

Warszawa, 30.05.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk pt. „Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach stresu abiotycznego"

Krótkie fragmenty RNA powstające w wyniki fragmentacji niekodujących funkcjonalnych RNA przez długi czas były traktowane wyłącznie jako produkty degradacji lub artefakty doświadczalne. Dopiero od niedawna pojawiają się doniesienia sugerujące, że mogą pełnić ważne role w regulacji funkcjonowania komórek, w szczególności na poziomie kontroli translacji. Pojawiające się w literaturze doniesienia są przeważnie fragmentaryczne i ograniczają się do opisania pojedynczych cząsteczek tego typu. W recenzowanej pracy Doktorantka podjęła się kompleksowego scharakteryzowania krótkich RNA pochodzących z fragmentacji tRNA i snoRNA za pomocą technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego i zbadania ich asocjacji z różnymi frakcjami rybosomów i ich podjednostek w warunkach normalnych i w stresie, na który komórki reagują zmianami w syntezie białek. Praca spełnia zatem najważniejsze kryterium stawiane nie tylko przed rozprawami doktorskimi, ale przed każdym przedsięwzięciem badawczym – podejmuje się rozwiązania naprawdę istotnego poznawczo problemu naukowego. Opisane w rozprawie badania mają, często spotykany we współczesnej genomice, charakter opisowy (podejście opisywane angielskim terminem *data-driven*), gdzie głównym celem jest zebranie kompleksowych danych i poddanie ich analizie, bez szczegółowych hipotez wstępnych. Tego typu projekty stanowią ważny element współczesnej nauki, a uzyskane w nich wyniki często służą do kolejnych, bardziej już szczegółowych i ukierunkowanych analiz.

Praca ma formę tradycyjnej rozprawy i przedstawia wyniki, które zostały częściowo opublikowane. Rozprawa zawiera elementy wymagane od tego typu tekstów, w tym streszczenia w języku polskim i angielskim i spełnia wszystkie wymogi formalne. Rozprawa została przygotowana starannie i świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę umiejętności prowadzenia pracy naukowej, analizowania uzyskanych wyników i prezentowania ich w formie pisemnej. Jak w każdym złożonym tekście, tak i tu nie udało się uniknąć pewnej liczby niedociągnięć technicznych lub edytorskich, w

ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel.: 22 592 22 44
e-mail: p.golik@uw.edu.pl

większości jednak nie wpływają one znacząco na odbiór pracy (uwagi mające potencjalnie znaczenie merytoryczne przedstawię w dalszej części recenzji).

Praca rozpoczyna się od bardzo zwięzłego wstępu wprowadzającego czytelnika w zagadnienia krótkich RNA i ich asocjacji z rybosomami. Zwięzłość wstępu jest zrozumiała biorąc pod uwagę to, że bardzo duża ilość wyników, które należało zaprezentować powoduje, że rozprawa i tak jest obszerna, a informacje zawarte w tej części pozwalają stwierdzić, że Doktorantka posiada wymaganą wiedzę teoretyczną w będącej przedmiotem rozprawy dziedzinie. Mam jednak wrażenie, że rozbudowanie wstępu o pewne dodatkowe informacje ułatwiłoby interpretację przedstawianych w dalszej części rozprawy wyników. Warto na przykład by wspomnieć o dobrze poznanych mechanizmach odpowiedzi komórek drożdży na zastosowane w części eksperymentalnej stresy abiotyczne: głód cukrowy i stres hiperosmotyczny (odpowiednio, szlaki TOR i HOG), zwłaszcza w aspektach związanych z regulacją translacji. Gdy Doktorantka we wstępie pisze o roli białka Dicer w biogenezie tRF (s. 17) albo o interakcjach tRF z białkami Piwi (s. 19), nie wspomina, że w badanych przez nią komórkach *S. cerevisiae* białka te akurat nie występują. Białka te są zresztą też przywoływane przy opisie i interpretacji wyników (na s. 46), nadal bez jasnego podkreślenia, że nie występują w wybranym do projektu organizmie modelowym.

Lekturę dalszej części pracy bardzo ułatwiłoby też bardziej dogłębne omówienie we wstępie niektórych ważnych w tym kontekście kwestii wiążących metylację i degradację RNA. Przykładowo, mechanizm przegrupowania Dimrotha, wspomniany dopiero na s. 84, znaczenie preferencji białek AlkB wobec konkretnych typów metylacji (na s. 93), czy możliwa rola AlkB w cięciu RNA (s. 115 i 121) są to zagadnienia, których wcześniejsze omówienie bardzo ułatwiłoby zrozumienie praktycznie wszystkich wyników, a wspomniano o nich dopiero w części „Wyniki i dyskusja", i to dopiero w dalszych sekcjach. W części prezentującej cele pracy na s. 24 wspomniano jedynie, że demetylacja za pomocą AlkB powinna ułatwiać wykrywanie zmodyfikowanych RNA i prowadzić do wzrostu liczby odczytów. Tymczasem w wynikach od początku pojawia się wiele sytuacji, kiedy liczba odczytów po demetylacji malała, a możliwe wyjaśnienia tego efektu (wspomniane powyżej) pojawiają się w tekście rozprawy znacznie później.

Rozdział „Materiały i Metody" jest obszerny i szczegółowo przedstawia wszystkie informacje niezbędne do oceny poprawności metod eksperymentalnych i ewentualnej replikacji uzyskanych wyników. Stosunkowo mało szczegółowa jest jedynie część dotycząca sekwencjonowania i bioinformatycznych metod opracowania jego wyników (zapewne dlatego, że realizowane były komercyjnie lub we współpracy). Zabrakło też omówienia zastosowanych metod i testów statystycznych.

Najobszerniejszą część pracy stanowią połączone w jeden rozdział wyniki i dyskusja. Taki sposób prezentowania wyników jest często spotykany w projektach polegających na wielkoskalowych analizach, których głównym celem jest stworzenie kompleksowego obrazu zachodzących zjawisk. Trudno w takiej sytuacji oddzielić wyniki od ich interpretacji i dyskusji, podjętą przez Doktorantkę decyzję uznaję zatem za uzasadnioną.

W opisanych w rozprawie badaniach Doktorantka przeanalizowała krótkie RNA we frakcji wolnej, związanej z podjednostkami rybosomu, monosomami oraz polisomami. Wszystkie badania prowadzone były w dwóch powtórzeniach biologicznych w warunkach optymalnych, stresu głodu cukrowego oraz stresu hiperosmotycznego. Dodatkowo każda frakcja RNA sekwencjonowana była w postaci natywnej i po działaniu demetylazą AlkB. Oznacza to wykonanie ogromnej pracy i zgromadzenie dużej ilości bardzo wartościowych danych. Uzyskane w toku tej pracy informacje stanowią niesłychanie cenny materiał, który nie tylko posłużył do opracowania jednej publikacji, ale – jestem przekonany – będzie jeszcze długo służył do dalszych analiz i planowania kolejnych, już ukierunkowanych na konkretne RNA doświadczeń. Nie mam więc żadnych wątpliwości co do tego, że Doktorantka zaprezentowała oryginalne rozwiązanie istotnego problemu badawczego, wykazując się przy tym umiejętnością prowadzenia badań naukowych i wiedzą teoretyczną.

Skala opisanych w rozprawie doświadczeń i analiz, a zwłaszcza duża liczba zmiennych (różne warunki hodowli, różne frakcje rybosomów, działanie AlkB) powoduje, że analiza i interpretacja wyników stanowi poważne wyzwanie. W znacznej mierze Doktorantce udało się temu wyzwaniu podołać, co po raz kolejny potwierdza jej umiejętności i wiedzę. W niektórych momentach, zwłaszcza w częściach dotyczących przedstawienia i interpretacji wyników, pojawiają się jednak pewne wątpliwości, które omawiam poniżej. Nie wpływają one negatywnie na wysoce pozytywną ocenę recenzowanej pracy, stanowią raczej wyraz tego, że uzyskane wyniki są na tyle interesujące, że zachęcają do dyskusji i poszukiwania pogłębionych wyjaśnień. To właśnie niedostatek takich pogłębionych wyjaśnień i modeli jest głównym mankamentem pracy. Stanowiący jej główną część rozdział „Wyniki i dyskusja" to w przeważającej części opis kolejnych RNA, których udział w danej frakcji w danych warunkach się zmienia, co czyni go dosyć trudnym w odbiorze, choć zarazem bardzo cennym jako materiał do dalszych analiz. Pojawiające się niekiedy hipotezy i modele biologiczne (np. na s. 84 albo na s. 92) są bardzo interesujące, ale rozproszone w długim tekście, podczas gdy powinny być zebrane razem w części „Wnioski", która jednak zasadniczo ogranicza się do zbiorczego przedstawienia najważniejszych zmian. Nie umniejsza to znacząco wartości naukowej uzyskanych wyników, ale utrudnia lekturę.

W pierwszym eksperymencie Doktorantka wykonała profilowanie polisomowe drożdży hodowanych w różnych warunkach stresowych i wybrała stres głodu cukrowego, który znacząco

zaburza ogólny obraz translacji, i stres hiperosomotyczny, który z kolei w niewielkim stopniu wpływa na aktywność syntezy białek. To bardzo dobry i logiczny wybór, który świadczy o opanowaniu przez nią sztuki planowania eksperymentów. Trochę tylko (jak już wspomniałem przy omawianiu wstępu), brakuje tu dyskusji, np. odnoszącej się np. do tego, co wiadomo o szlaku TOR i jego roli w regulacji biosyntezy rybosomów. Z drożdży hodowanych w wybranych warunkach przygotowano odpowiednie preparaty różnych frakcji krótkich RNA wolnych i zasocjowanych z rybosomami.

W dalszej części Doktorantka uzyskała rekombinowane białka AlkB w wariancie dzikim i z podstawieniem D135S. Wydajność demetylacji została potwierdzona odpowiednim oznaczeniem, a następnie zweryfikowano jakość poddanych tej reakcji RNA. W tym miejscu mam jedną uwagę – Rys. 14-19 przedstawiają rozkład długości wyizolowanych krótkich RNA po demetylacji, a Rys. 20-21 ich obraz elektroforetyczny. Interpretację tych danych utrudnia to, że w pracy nie ma analogicznych wykresów i obrazów krótkich RNA przed demetylacją, są tylko obrazy elektroforetyczne całego RNA przed izolacją krótkich RNA (Rys. 8-10) i przykładowy żel PAA przedstawiający rozdział względem wielkości. Nie da się zatem porównać RNA użytych do konstrukcji bibliotek sekwencyjnych przed i po demetylacji i ocenić ewentualnych zmian związanych z tą procedurą.

Analiza liczby zmapowanych odczytów wykazała, że demetylacja nie wpłynęła istotnie na globalną wydajność sekwencjonowania. W tym miejscu mam ogólne pytanie odnoszące się do całości pracy. W „Materiałach i metodach" Doktorantka pisze, że przy mapowaniu odczytów z bibliotek nie poddanych demetylacji dopuszczano niewielką liczbę niedopasowań, zaś dla odczytów z bibliotek po demetylacji wymagano pełnego dopasowania. W kontekście tego, że w wielu szczegółowych analizach omawianych w dalszej części pracy zaobserwowano spadki liczby odczytów w próbie poddanej demetylacji w porównaniu z wyjściową zastanawiam się, czy nie jest to podejście zbyt restrykcyjne. W RNA poddanych demetylacji (zwłaszcza pochodzących z tRNA) mogą wciąż znajdować się zmodyfikowane zasady, które nie są substratem AlkB, ale wciąż mogą skutkować błędami w odczytach. Czy przyjęcie w analizie podobnej tolerancji niedopasowań dla wszystkich sekwencjonowań, niezależnie od AlkB, znacząco zmieni wyniki?

Do opisanej w sekcji 4.4.2 analizy ilości podtypów RNA w wynikach sekwencjonowania mam następującą uwagę. W całym tekście tej sekcji użyte są sformułowania takie, jak „obserwowano przewagę rRNA nad tRNA" czy „tRNA stanowiło największą frakcję". Tymczasem z opisu eksperymentu wynika, że tak naprawdę nie było tam (przynajmniej nie w znaczących ilościach) cząsteczek rRNA, mRNA czy tRNA, a tylko ich krótkie fragmenty. Brakuje mi też próby dyskusji obserwowanych różnic – dlaczego np. we frakcji monosomów dominują fragmenty pochodzące od rRNA, podczas gdy we frakcji podjednostek ogromną większość stanowią pochodne tRNA?

Przedstawiając ogólne zmiany zawartości tRF i sdRNA w wynikach sekwencjonowania (sekcja 4.4.3.1, s. 57) Doktorantka podaje wartości liczbowe i odchylenia z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku (np. 93,89% ± 1,98%). Czy liczba powtórzeń i zastosowane (a nie opisane explicite) metody statystyczne pozwalają na taką precyzję? Czy spadki i wzrosty rzędu kilku % mają tu znaczenie biologiczne?

Opisując w początkowej części rozprawy Cele pracy, Doktorantka sugerowała, że demetylacja za pomocą AlkB zwiększy wykrywalność modyfikowanych RNA. W związku z tym, obserwacje takie jak ta na s. 58, że zawartość sdRNA jest większa w bibliotekach AlkB- wymagają choćby krótkiego komentarza (tu wyjaśnieniem być może jest to, że gdy wzrasta udział odczytów z innych, silniej zmodyfikowanych klas RNA, to % udziału tych mniej zmodyfikowanych spada). Podobnie, obserwacje (Diag. 1-6) licznych indywidualnych typów, zarówno tRF jak i sdRNA, które występują w bibliotekach AlkB- i zanikają po demetylacji wymaga jakiegoś wyjaśnienia. Tymczasem wspomniane (s. 65) jest jedynie to, że ich liczba po demetylacji ogólnie rośnie, a ewentualne hipotezy próbujące taki efekt wyjaśnić pojawiają się dopiero w kolejnych sekcjach pracy (np. na s. 73, a bardziej szczegółowo dopiero dużo dalej na s. 93, 115 i 121). Drobna uwaga techniczna – jaki jest sens stosowania odrębnej numeracji dla diagramów Venna, które są rodzajem wykresu (a i diagramy, i wykresy są rysunkami)?

W dalszych częściach pracy szczegółowo analizowane są zmiany poziomów sdRNA i tRF w poszczególnych frakcjach rybosomów w różnych warunkach. Jak już wspomniałem, ta część pracy to niezwykle cenny zasób zawierający ogromną ilość danych, na podstawie których będzie można zaplanować wiele kolejnych analiz i doświadczeń. Jestem przekonany, że dane te znacząco przyczynią się do postępów w badaniach nad rolą sdRNA i tRF w regulacji translacji. Większość uwag i pytań, jakie nasunęły mi się podczas lektury tej sekcji rozprawy dotyczy wszystkich jej części, dotyczących różnych frakcji rybosomowych.

Na s. 67 (i dalsze podobne) pojawia się sformułowanie „… wykazujące istotne statystycznie zmiany …”. Jaką metodą obliczana była istotność statystyczna (wartość *p*)? – brak opisu w „Materiałach i metodach”.

W tytule Tab. 8 (i kolejnych tego typu aż do Tab. 32) użyto sformułowania „… wykazujące największą akumulację w bibliotekach z hodowli w stresie w stosunku do warunków optymalnych …”, tymczasem w tabelach są także (w niektórych w większości) takie RNA, dla których liczba odczytów w stresie spada w porównaniu z kontrolą w warunkach optymalnych (co jest zauważone w tekście, ale przeczy podpisowi tabeli). Uwaga techniczna – dlaczego w Tab. 8 kolejność kolumn kontroli i warunków stresowych jest inna, niż w Tab. 9 i dalszych?

Na Rys. 27 i pozostałych rysunkach przedstawiających mapy cieplne liczba odczytów we frakcji wolnego RNA przedstawiona jest jako „poziom ekspresji". Nie jestem przekonany, czy jest to uzasadnione. Poziomem ekspresji raczej jest suma odczytów z frakcji wolnej i wszystkich frakcji zasocjowanych, tym bardziej, że zdarzają się sytuacje, w których dana cząsteczka nie występuje we frakcji wolnego RNA (np. na s. 135 snR35(184-204)), a jej poziom ekspresji nie wynosi przecież 0. Mapy cieplne są też zwyczajowo sposobem wizualizacji zmian, czyli poziomów względnych, a w rozprawie wykorzystano je do przedstawienia bezwzględnych liczb odczytów. Moim zdaniem bardziej czytelne byłoby przedstawienie na nich ilorazu stres/kontrola (tzw. *fold-change*), opcjonalnie jako logarytmu (wartości ujemne oznaczają wtedy spadek poziomu, a dodatnie – wzrost). To samo dotyczy wykresów takich, jak Wyk. 3 (s. 72) i dalsze podobne, tym bardziej, że zastosowana kolejność zmusza do porównywania wysokości odległych od siebie słupków przy analizie zmian między kontrolą a warunkami stresu. I wreszcie drobna uwaga językowa – odczyty NGS są z natury policzalne, więc raczej należy używać słowa „liczba" a nie „ilość".

Na s. 72 w tekście pojawia się zdanie „Na Rysunku 28 umieszczono struktury drugorzędowe sdRNA wykazujących najwyższą asocjację do podjednostek rybosomalnych w stresie głodu cukrowego w porównaniu do warunków optymalnych." Tymczasem na Rys. 28 znajdują się struktury snR190(-2-21) i snR190(170-192), dla których na Wyk. 3 i w Tab. 8 obserwujemy **spadek** liczby odczytów w bibliotekach z warunków stresowych w porównaniu z kontrolą. Podobnie, na s. 73 znajdujemy dwa kolejne zdania ze sprzeczną informacją: „W warunkach głodu cukrowego we frakcji podjednostek rybosomowych zaobserwowano **wysoki poziom** akumulacji snR190 (-2–21) i snR128 (105–124). Fakt, że poziom akumulacji obu tych sdRNA był **niższy** w warunkach stresu […]" (podkreślenia moje).

Na s. 81 znajduje się ciekawa przykładowa próba interpretacji biologicznej „Może to wskazywać na rolę tych sdRNA w kontroli składania rybosomów w warunkach optymalnych." – czy można tu rozróżnić, czy rolę w kontroli składania rybosomów odgrywa sdRNA, czy jego pełny prekursor – snoRNA? Jeżeli w tych warunkach wzrasta poziom prekursora snoRNA, to wzrośnie też poziom fragmentu sdRNA.

Na s. 90 pojawia się przy dyskusji jednego z wyników odniesienie do wiązania się tRF z białkami Ago (w komórkach jedwabnika). Informacja, że u *S. cerevisiae* nie występują białka Ago pojawia się dopiero na s. 108, przy okazji dyskusji poświęconej już innej cząsteczce tRF.

Analiza na s. 99 poświęcona jest cząsteczkom sdRNA, tymczasem jedno ze zdań rozpoczyna się od „Oba tRF zostały wykryte …".

Tego typu niezręczności są nieuniknione w tak obszernym i trudnym tekście, opisującym bardzo złożone wielowymiarowe analizy porównawcze. Ich obecność nie wpływa na ogólnie bardzo wysoką

ocenę wartości naukowej zaprezentowanych w rozprawie wyników i ogromu pracy wykonanej przez Doktorantkę.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk pt. „Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach stresu abiotycznego" stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Do rozprawy doktorskiej dołączone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim. Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Digitally signed by
Paweł Golik; UW
Date: 2025.05.30
09:50:11 CEST

prof. dr hab. Paweł Golik