



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Ewolucyjnej



Warszawa, 7.11.2022

Dr hab. Rafał Milanowski, prof. ucz.
Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biologii Ewolucyjnej
CNBCh, ul. Żwirki i Wigury 101, pokój 4.146
e-mail: r.milanowski@uw.edu.pl
tel.: +48 22 66 266 41

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Nowis zatytułowanej „Podejścia bioinformatyczne w badaniach kolistych RNA u roślin”

Wprowadzenie technologii sekwencjonowania wysokoprzepustowego było początkiem zjawiska, które śmiało możemy nazwać rewolucją w badaniach biologicznych i medycznych. Technologia ta pozwala w bardzo krótkim czasie uzyskać ogromną ilość danych, cennych nie tylko dla autorów danego projektu, ale także dla innych naukowców. W efekcie liczba powszechnie dostępnych nowych sekwencji zaczęła rosnąć lawinowo, zdecydowanie szybciej niż liczba badaczy, którzy byliby w stanie dogłębnie opracować zgromadzone dane. Niestety, ilość nowych danych nie zawsze idzie w parze z ich jakością. W większości przypadków nie jest to skutkiem złej woli, czy też niedbałości badaczy, ale wynika z braku doświadczenia, specyfiki konkretnego eksperymentu lub braku powszechnie akceptowanych praktyk. Z tego powodu niezwykle ważne jest opracowywanie odpowiednich technik zapewniających jak najlepszą jakość gromadzonych informacji oraz procedur standaryzujących i ułatwiających postępowanie z nimi. Dotyczy to zwłaszcza danych wykorzystywanych w analizach ilościowych, gdzie niezbędne są restrykcyjne procedury postępowania umożliwiające porównywanie wyników eksperymentów uzyskanych w różnych miejscach, w różnym czasie i przez różnych naukowców. Właśnie do tego nurtu, mającego na celu opracowywanie dobrych i skutecznych praktyk w analizie danych pochodzących z sekwencjonowania nowej generacji, można zaliczyć badania prowadzone przez panią Katarzynę Nowis.

Jej rozprawa doktorska zatytułowana „**Podejścia bioinformatyczne w badaniach kolistych RNA u roślin**” została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem prof. Marka Figlerowicza oraz dr hab. Anny Philips. Podstawowym celem badań było opracowanie wystandaryzowanych procedur laboratoryjnych i bioinformatycznych umożliwiających wiarygodną analizę jakościową i ilościową kolistych cząsteczek RNA (circRNA) u roślin, w oparciu o dane z sekwencjonowania NGS oraz



Instytut Biologii Ewolucyjnej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel.: 22 55 26 641
e-mail: r.milanowski@uw.edu.pl
<http://www.ibe.biol.uw.edu.pl>

zastosowanie tych procedur w praktyce. Kolejnym celem pracy było przygotowanie bazy danych gromadzącej sekwencje kolistych RNA u *Arabidopsis thaliana*.

Wyniki swoich badań Doktorantka przedstawiła w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy. Na cykl ten składają się trzy prace opublikowane w czasopismach: *Frontiers in Plant Science* (IF: 6,627; MNiSW: 100), *Cells* (IF: 7,666; MNiSW: 140), *Database* (IF: 4,462; MNiSW: 100):

Philips A, Nowis K, Stelmaszczuk M, Jackowiak P, Podkowiński J, Handschuh L, Figlerowicz M; Expression Landscape of circRNAs in Arabidopsis thaliana Seedlings and Adult Tissues. *Frontiers in Plant Science* (2020), doi: 10.3389/fpls.2020.576581

Philips A, Nowis K, Stelmaszczuk M, Podkowiński J, Handschuh L, Jackowiak P, Figlerowicz M; Arabidopsis thaliana cbp80, c2h2, and flk Knockout Mutants Accumulate Increased Amounts of Circular RNAs. *Cells* (2020), doi: 10.3390/cells9091937

Nowis K, Jackowiak P, Figlerowicz M, Philips A; At-C-RNA database, a one-stop source for information on circRNAs in Arabidopsis thaliana in a unified format. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* (2021), doi: 10.1093/database/baab074

We wszystkich publikacjach dokładnie opisano zakres pracy autorów i nie ma wątpliwości co do ważnej roli Doktorantki w ich powstaniu. W dwóch pierwszych artykułach pani Katarzyna Nowis jest drugą autorką i była odpowiedzialna za przeprowadzenie wszystkich analiz bioinformatycznych. W trzeciej pracy Doktorantka jest pierwszą autorką i miała wiodącą rolę w przygotowaniu internetowej bazy danych sekwencji. We wszystkich pracach podkreślono jej znaczący udział w przygotowaniu manuskryptów.

Rozprawę otwiera lista publikacji wchodzących i niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W dalszej części zamieszczono obszerne streszczenie przygotowane w języku polskim i angielskim, w którym krótko scharakteryzowano koliste RNA, przedstawiono podstawowy cel pracy oraz podsumowanie uzyskanych wyników. Kolejnym elementem rozprawy jest omówienie pracy doktorskiej. Rozpoczyna je pięciostronicowe wprowadzenie, gdzie Doktorantka opisała aktualny stan wiedzy na temat kolistych RNA, ze szczególnym uwzględnieniem roślinnych circRNA oraz wskazała problemy związane z analizą tych cząsteczek w oparciu o dane NGS. Następnie został przedstawiony cel pracy i uzyskane wyniki. Ten podrozdział został podzielony na cztery części, gdzie dwie pierwsze odnosiły się do wyników zaprezentowanych w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy a kolejne części opisują eksperymenty z dwóch kolejnych prac.

Eksperymenty opisane w pierwszej publikacji wchodzącej w skład cyklu, opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*, były najbardziej złożone. Obejmowały zarówno badania laboratoryjne jak i analizy bioinformatyczne, za które w całości odpowiadała Doktorantka. Pierwszym etapem pracy było przygotowanie dwóch typów bibliotek dla próbek RNA nietrawionych i trawionych RNAzą R. Dla bibliotek tych przeprowadzono sekwencjonowanie NGS a następnie przeprowadzono analizę wyników. Wykazano, że trawienie liniowych cząsteczek RNA w celu wzbogacenia próbki we frakcję kolistych cząsteczek nie daje lepszych rezultatów niż pominięcie tego etapu. To niezwykle ciekawy wynik, ponieważ procedura trawienia liniowych cząsteczek RNA jest powszechnie stosowana w analizach cząsteczek

kolistych. Jest to więc bardzo ważna wskazówka metodyczna dla wszystkich badaczy circRNA. Kolejnym etapem była jakościowa i ilościowa analiza porównawcza akumulacji circRNA w organach i siewkach *A. thaliana*. Wstępna analiza wyników pozwoliła na zaprojektowanie eksperymentu laboratoryjnego umożliwiającego weryfikację danych ilościowych z sekwencjonowania NGS. Weryfikacja ta umożliwiła porównanie różnych metod normalizacji danych i wskazanie metody najskuteczniejszej. Ostatecznie wskazano cztery metody jako dające satysfakcjonujące i porównywalne wyniki a w ostatecznej analizie zastosowano normalizację uwzględniającą wielkość biblioteki pomniejszoną o odczyty zmapowane do genów rRNA i do genomu chloroplastowego. Ostatecznie wyprowadzono wniosek, że biogeneza circRNA u *A. thaliana* jest regulowana w sposób specyficzny dla danego organu.

Procedury wskazane przez doktorantkę jako najskuteczniejsze w analizie kolistych RNA u *A. thaliana* znalazły swoje zastosowanie także w kolejnym eksperymencie, opisanym w drugiej pracy wchodzącej w skład rozprawy, opublikowanej w czasopiśmie *Cells*. Jego celem była identyfikacja białek zaangażowanych w biogenezę circRNA u *A. thaliana*. W analizie wykorzystano 18 wariantów z mutacją typu knockout w genie kodującym białko uczestniczące w splicingu, dla których przeprowadzono analizę obecności i ilości kolistych RNA. Wskazano dwa warianty produkujące znacząco większą liczbę circRNA w porównaniu do średniej dla wszystkich mutantów a także trzy warianty o zwiększonej akumulacji circRNA w stosunku do typu dzikiego. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że brak białek CBP80, C2H2 oraz FLK zaburza proces składania transkryptów. Bardzo ciekawa jest obserwacja kolistych RNA u mutantu pozbawionego białka CBP80, które charakteryzują się odmienną strukturą niż circRNA u innych wariantów. Wykazano, że cząsteczki kolistego RNA u mutantu *cbp80* zdecydowanie częściej zawierają pierwszy ekson, co najprawdopodobniej jest związane z upośledzonym funkcjonowaniem kompleksu wiążącego się z czapeczką.

W tym miejscu chciałbym zadać Doktorantce trzy pytania:

1. Niektóre badania wskazują na rolę intronów w procesie biogenezy kolistych cząsteczek RNA. Chciałbym się zapytać, czy w trakcie swojej pracy Doktorantka analizowała sekwencje intronów flankujących obszary ulegające cyrkularyzacji w celu poszukiwania elementów, które mogłyby sprzyjać temu procesowi? Jeżeli tak, to jakie wyniki przyniosły przeprowadzone analizy; jeżeli nie, to poszukiwanie jakich elementów powinno być uwzględnione w takiej potencjalnej analizie?
2. W publikacjach wspomniano wielokrotnie o braku korelacji pomiędzy poziomem circRNA a poziomem odpowiadających im transkryptów liniowych. Chciałbym się zapytać, czy zdaniem Doktorantki brak takiej korelacji może być efektem odmiennej stabilności różnych liniowych cząsteczek RNA? Być może Doktorantka może wskazać wyniki własnych analiz popierające lub odrzucające taką możliwość?
3. Chciałbym odnieść się do Rysunku 1 w drugiej publikacji z cyklu, przedstawiającego liczbę circRNA w analizowanych mutantach. Jak Doktorantka interpretuje względnie niski poziom kolistych RNA występujących zarówno w wariantie dzikim jak i w najbogatszym w różne circRNA wariantie *cbp80*?

W trzeciej pracy, opublikowanej w czasopiśmie *Database* Doktorantka opisuje przygotowaną przez siebie bazę danych kolistych RNA występujących u *A. thaliana*. Do przygotowania bazy wykorzystano dane z własnych sekwencjonowań, jak również dane z innych, publicznie dostępnych baz danych po ich przeprocesowaniu zgodnie z procedurą opisaną w pierwszej publikacji cyklu. W efekcie opracowano najbogatszą w sekwencji bazę zawierającą rekordy, które można ze sobą porównywać.

W związku ze wspomnianą bazą danych chciałbym zadać Doktorantce nietypowe pytanie:

4. Najślabszym punktem tego typu baz jest czynnik ludzki – okres trwania zależy bardzo często od determinacji administratora i środków finansowych przeznaczonych na funkcjonowanie bazy. W publikacji podkreślono, że mocną stroną bazy będzie opieka administracyjna, uwzględniająca aktualizację danych i ich dostosowywanie do przyjętych standardów. Chciałbym się zapytać w jaki sposób zaplanowane zostały zasady funkcjonowania i aktualizacji bazy oraz czy baza będzie utrzymywana w momencie teoretycznej zmiany zainteresowań naukowych pracowników Instytutu Chemii Bioorganicznej?

Po części opisującej badania eksperymentalne znajduje się podsumowanie, w którym w ciekawy sposób przedstawiono także perspektywy dalszych badań nad kolistymi RNA u roślin. Kolejnymi elementami rozprawy są bibliografia, publikacje wchodzące w skład cyklu oraz oświadczenia współautorów.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Uzyskane wyniki badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat kolistych RNA u roślin. Praca została poprawnie przygotowana i zredagowana. Analizy zaprezentowane w publikacjach z cyklu zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone, a uzyskane wyniki są bardzo wiarygodne. Doktorantka uniknęła też ich nadinterpretacji, co wskazuje, że pojęcie naukowego obiektywizmu jest dla niej bardzo ważne. Doktorantka jednoznacznie wykazała, że posiada odpowiedni warsztat i jest gotowa rozpocząć nowy etap pracy naukowej. 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. 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 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Nowis do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

 **PODPIS ZAUFANY**
RAFAŁ HUBERT
MILANOWSKI
07.11.2022 10:43:01 [GMT+1]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym