Dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. ICHB PAN
Zakład Biochemii Rybonukleoprotein
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: akurzyns@man.poznan.pl

21 grudnia 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Joanny Miśkiewicz

pt. „Bioinformatics methods of motif analysis in RNA structures"

1. Problem badawczy i jego znaczenie

Praca doktorska Pani mgr Joanny Miśkiewicz została wykonana w Instytucie Informatyki Politechniki Poznańskiej pod opieką naukową prof. dr hab. Marty Szachniuk. Rozprawa poświęcona jest bioinformatycznym metodom badania motywów strukturalnych występujących w cząsteczkach kwasów rybonukleinowych (RNA) i została oparta na zbiorze artykułów o charakterze naukowym. W skład tego zbioru wchodzą cztery prace badawcze i jedna praca o charakterze przeglądowym, wszystkie opublikowane w czasopismach z tzw. listy JCR (ang. *Journal Citation Reports*), popularnie nazywanej listą filadelfijską. Szósta praca, opisująca stworzenie bazy danych ONQUADRO, została opublikowana po złożeniu rozprawy doktorskiej.

W swojej rozprawie doktorskiej Pani Joanna Miśkiewicz koncentruje się na dwóch problemach badawczych: (i) analizie motywów strukturalnych występujących w prekursorach małych regulatorowych RNA, mikroRNA (miRNA), w szczególności w kontekście oddziaływania tych prekursorów z białkami powiązanymi z procesem biogenezy miRNA oraz (ii) szeroko pojętej analizie bioinformatycznej motywów kwadrupleksowych występujących w cząsteczkach RNA.

Cząsteczki miRNA to grupa małych regulatorowych RNA pełniących istotną rolę w procesie regulacji ekspresji genów. Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA obejmuje transkrypcję, zazwyczaj przy udziale polimerazy II RNA, oraz następujące po sobie cięcia prekursorów przez rybonukleazy należące do rodziny rybonukleaz III (RNaz III), tj. enzymów katalizujących cięcie w dwuniciowych rejonach cząsteczek RNA. W przypadku zwierząt kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA przebiega z udziałem dwóch RNaz III: Drosha i Dicer. U roślin proces ten katalizowany jest przez białka typu Dicer (DCL, ang. *Dicer-like proteins*); najczęściej w biogenezie roślinnych miRNA uczestniczy białko nazwane DCL1. Generowany przez RNazy III dupleks miRNA/miRNA* o długości ~21 par zasad przekazywany jest do kompleksu efektorowego RNAi nazywanego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), w którym jedna z nici dupleksu (tzw. nić pasażerska, miRNA*) jest usuwana, podczas gdy druga pozostaje związana z białkami kompleksu i służy jako sonda rozpoznająca komplementarne sekwencje w obrębie matrycowych RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*). Zazwyczaj miRNA, które są w pełni komplementarne do mRNA indukują proces degradacji transkryptu, natomiast miRNA posiadające częściową komplementarność wobec mRNA, indukują inhibicję translacji. Zatem sekwencja miRNA ma kluczowe znaczenie dla specyficzności i sposobu przebiegu procesu wyciszania ekspresji genu. Obecnie wiadomo, iż poziom akumulacji miRNA jest ściśle regulowany i specyficzny dla określonego typu komórek czy tkanek, podczas ich każdego stadium rozwojowego. Jakiekolwiek zaburzenia i odchylenia od prawidłowego, fizjologicznego poziomu miRNA w komórce, czy też zmiany w sekwencji miRNA, mogą uruchamiać szereg niekorzystnych procesów, np. nowotworowych,

degeneracyjnych czy zaburzeń rozwojowych, prowadzących do dysfunkcji narządów i organów, a często śmierci organizmu. Aspekty strukturalne procesu biogenezy miRNA, w szczególności u roślin, są ciągle słabo poznane. Pierwsza część rozprawy doktorskiej Pani Joanny Miśkiewicz została poświęcona właśnie tym zagadnieniom. Dokładniej, Doktorantka skoncentrowała się na poszukiwaniu i analizie motywów strukturalnych w obrębie prekursorów roślinnych cząsteczek miRNA, w szczególności w kontekście specyficznego rozpoznawania pre-miRNA przez białka DCL1. Zgłębiony został także problem wpływu zmian w sekwencji pierwotnego prekursora miRNA (pri-miRNA) człowieka na strukturę powstających w komórkach pri-miRNA i konsekwencje tych zmian prowadzące do rozwoju choroby nowotworowej.

Drugi nurt badawczy dotyczy motywów kwadrupleksowych występujących w cząsteczkach RNA. Kwadrupleksy to sekwencje polinukleotydowe, które tworzą specyficzną strukturę tetrad stabilizowanych poprzez wiązania wodorowe Hoogsteena. W przyrodzie najczęściej występują kwadrupleksy typu G, czyli kwadrupleksy tworzone przez kwasy nukleinowe bogate w guaniny (G). G-kwadrupleksy pełnią ważną rolę regulacyjną w podstawowych procesach biologicznych, takich jak replikacja, transkrypcja czy translacja, podczas gdy nieprawidłowe tworzenie tych struktur jest związane z niestabilnością genomu i powstawaniem nowotworów. Zrozumienie funkcji biologicznych odgrywanych przez G-kwadrupleksy wymaga szczegółowej wiedzy na temat ich struktury. Badania prowadzone przez Panią Miśkiewicz miały na celu lepsze poznanie struktur kwadrupleksowych występujących w cząsteczkach RNA.

Zaprezentowane w rozprawie doktorskiej badania mają także charakter praktyczny. Analizy motywów kwadrupleksowych doprowadziły do stworzenia bazy danych ONQUADRO, bazy służącej do gromadzenia i przetwarzania danych o strukturach kwadrupleksów. Bez wątpienia taka baza stanowi ogromne wsparcie dla szerokiego grona badaczy zajmujących się empirycznymi badaniami motywów kwadrupleksowych występujących w cząsteczkach kwasów nukleinowych, w tym osób zajmujących się projektowaniem terapeutyków mających zastosowanie w leczeniu chorób wywołanych zaburzeniami w tworzeniu struktur kwadrupleksowych.

Podsumowując, wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony aktualnym stanem wiedzy i zapotrzebowaniem na rozwiązania w postaci baz służących do gromadzenia i przetwarzania danych o strukturach występujących w cząsteczkach kwasu rybonukleinowego.

2. Wkład autora

Jak wcześniej wspomniałam, rozprawa doktorska Pani Joanny Miśkiewicz została oparta na zbiorze artykułów o charakterze naukowym. Pierwsza praca: Miskiewicz J, *et al.* **(2017)**, *BioMed Research International* (IF_{2017} 3,411) [A1], dotyczy poszukiwań i charakterystyki motywów strukturalnych występujących w cząsteczkach pre-miRNA modelowego organizmu roślinnego – *Arabidopsis thaliana*. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano w badanych cząsteczkach powtarzające się motywy strukturalne: małe wewnętrzne pętle w okolicach dupleksu miRNA/miRNA*. Uzyskane wyniki doprowadziły do postawienia hipotezy, iż takie motywy strukturalne są rozpoznawane przez roślinne białka DCL zaangażowane w proces biogenezy miRNA (białka DCL1). Zgromadzone dane zainspirowały badaczy do przeprowadzenia kolejnych analiz bioinformatycznych dotyczących powtarzalnych motywów strukturach występujących w cząsteczkach pre-miRNA, w obrębie kladu roślin zielonych (*Viridiplantae*). Analizy bioinformatyczne zostały wykonane z podziałem na: *Chlorophyta* (Zielenice), *Coniferophyta* (Nagonasienne), *Magnoliophyta* (Okrytonasienne), *Embryophyta* (Rośliny telomowe). Co ważne, pomimo że badane cząsteczki pre-miRNA pochodziły

z bardzo zróżnicowanej grupy roślin, w analizowanych strukturach pre-miRNA zidentyfikowano wspólne motywy, podobne do motywu strukturalnego wykrytego w pre-miRNA *Arabidopsis thaliana*, czyli motywu małej wewnętrznej pętli w okolicach dupleksu miRNA/miRNA*. Zgromadzone dane pozwalają sądzić, iż motyw taki może być kluczowy podczas rozpoznawania cząsteczek pre-miRNA przez białka DCL1, a może także i inne białka biorące udział w procesie biogenezy miRNA, czy też w regulacji tego procesu. Uzyskane wyniki są także spójne z poglądem, iż proces biogenezy miRNA jest procesem silnie konserwowanym ewolucyjnie. Omawiane badania zostały opublikowane w pracy: Miskiewicz J, Szachniuk M **(2018)**, *Molecules* (IF_{2018} 4,411) [A2]. Podsumowując, w obu pracach dotyczących analizy motywów strukturalnych występujących w prekursorach roślinnych miRNA, Pani Joanna Miśkiewicz jest pierwszym autorem, czyli jej wkład w prowadzenie badań i powstanie publikacji był znaczący.

Trzecia praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej Pani Joanny Miśkiewicz (Lehmann T, Miskiewicz J, *et al.* **(2020)**, *Applied Sciences* (IF_{2020} 2,679) [A3]), dotyczy pre-miRNA człowieka i opisuje badania struktury pierwszo- i drugorzędowej pierwotnego transkryptu miR-125a (pri-miR-125a), z uwzględnianiem dwóch wariantów sekwencyjnych charakteryzujących się polimorfizmem (czyli zmianą) pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Prowadzone badania dotyczyły przypadku raka piersi. Obecnie wiadomo, iż w raku piersi zmienione nowotworowo tkanki wykazują niższy poziom ekspresji miR-125a, w porównaniu z tkankami zdrowymi. Autorzy zaobserwowali, że w analizowanych przypadkach genotyp TT występował nieco częściej niż genotypy CC i CT. Modelowanie *in silico* wykazało, że obecność urydyny (U) zmniejsza prawdopodobieństwo wiązania pri-miR-125a z białkami NOVA1 i HNRNPK (białkami zaangażowanymi w proces dojrzewania i metabolizm RNA). Ponadto badacze wykazali, że warianty U i C mogą promować różne wzory fałdowania RNA, co może przekładać się na wiązanie innej grupy białek. Moim zdaniem omawiana praca stanowi doskonałe połączenie badań empirycznych i analiz *in silico*, które mogą prowadzić do zaproponowania możliwych scenariuszy procesu kancerogenezy.

Drugi nurt badawczy, zawarty w pracy doktorskiej mgr Joanny Miśkiewicz, dotyczy motywów kwadrupleksów występujących w cząsteczkach RNA. Analizy bioinformatyczne koncentrujące się na topologii zidentyfikowanych do tej pory kwadrupleksów RNA, a także na ich analizie parametrycznej, doprowadziły do opracowania nowej klasyfikacji kwadrupleksów, w oparciu o ich strukturę drugorzędową, nazwanej klasyfikacją ONZ. Nazwa ta wynika ze sposobu oddziaływania nukleotydów w tetradach tworzących kwadrupleks (ułożenie w kształcie litery: O, N lub Z). Ponadto, autorzy zaproponowali nowe reprezentacje umożliwiające zapisywanie informacji o strukturze drugorzędowej kwadrupleksów w dwuliniowej notacji kropkowo-nawiasowej i w postaci dwuczęściowego diagramu łukowego. Omawiane badania zostały przedstawione w pracy: *Popenda M, *Miskiewicz J, *et al.* **(2020)**, *Bioinformatics* (IF_{2020} 6,937) [A4]. Pani Joanna Miśkiewicz jest także współautorką publikacji o charakterze przeglądowym (Miskiewicz J, Sarzynska J, Szachniuk M **(2021)**, *Briefings in Bioinformatics* (IF_{2021} 11,622) [A5]). W publikacji tej zawarty został opis, a także charakterystyka wszystkich dostępnych zasobów bioinformatycznych pod kątem ich wykorzystania do badań kwadrupleksów RNA. Zasoby te zostały podzielone na cztery kategorie: (i) bazy danych, (ii) narzędzia bazujące na sekwencjach RNA, służące do przewidywania motywów kwadrupleksowych, (iii) narzędzia do przewidywania struktury drugorzędowej kwadrupleksów oraz (iv) narzędzia do analizy i wizualizacji struktur drugo- i trzeciorzędowych kwadrupleksów. Ze względu na nowatorskie podejście do problematyki klasyfikacji motywów kwadrupleksowych oraz ze względu na ogrom pracy włożonej w przygotowanie publikacji przeglądowej stanowiącej cenne źródło danych i informacji dla badaczy zgłębiających problematykę powiązaną z występowaniem motywów kwadrupleksowych w cząsteczkach kwasów nukleinowych, tę część pracy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Wysoka

jakość naukowa prowadzonych badań i analiz została potwierdzona poprzez publikację ich wyników w doskonałych czasopismach naukowych listy JCR. Pani Joanna Miśkiewicz jest pierwszym współautorem pracy opublikowanej w czasopiśmie *Bioinformatics* (IF_{2020} 6,937) oraz pierwszym autorem pracy opublikowanej w czasopiśmie *Briefings in Bioinformatics* (IF_{2021} 11,622).

Podsumowaniem badań dotyczących motywów kwadrupleksowych było stworzenie bazy danych ONQUADRO, umożliwiającej gromadzenie i przetwarzanie danych o strukturach kwadrupleksów otrzymanych drogą eksperymentalną. Baza ONQUADRO została opisana w publikacji, która ukazała się po złożeniu rozprawy doktorskiej: Zok T, Kraszewska N, Miskiewicz J, Pielacinska P, Zurkowski M, Szachniuk M **(2021)** ONQUADRO: a database of experimentally determined quadruplex structures. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż praca ta ukazała się w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* ($IF_{2020/2021}$ 16,971).

3. Poprawność

Rozprawa doktorska Pani Joanny Miśkiewicz została napisana w języku angielskim, w sposób czytelny i zrozumiały. Rozprawa doktorska zawiera: listę publikacji stanowiących jej podstawę, wraz z opisem wkładu Doktorantki w prowadzone badania, wprowadzenie (Introduction), opisy uzyskanych wyników (Main Results), spis literatury (Bibliography) cytowanej w rozdziałach: *Introduction* oraz *Main Results*, przedruki publikacji (Publication reprints), oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstałe publikacje, streszczenia (w języku angielskim i polskim) oraz dodatek opisujący udział mgr Joanny Miśkiewicz w projektach naukowych i konferencjach, a także nagrody i wyróżnienia uzyskane przez Doktorantkę. Pragnę podkreślić, iż wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w dobrych lub bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co świadczy o bardzo wysokiej jakości naukowej prowadzonych badań, a Pani Joanna Miśkiewicz pełni rolę autora wiodącego (pierwszego, lub równorzędnego pierwszego) w większości z nich.

Odnośnie konstrukcji i zawartości samej rozprawy doktorskiej mam kilka uwag. Oto one:

1. Zabrakło odrębnego rozdziału, który przedstawia cele prowadzonych badań, jak ma to miejsce w przypadku prac doktorskich o układzie klasycznym. Uwypuklenie celu prowadzonych badań w znacznym stopniu ułatwia czytelnikowi odbiór treści rozprawy doktorskiej.

2. W rozdziałach *Introduction* oraz *Main Results*, zamiast znaku *prim* (′), Autorka użyła znaku: *apostrof* (’).

3. Niektóre z przedruków prac, zawarte w rozdziale *Publication reprints*, zostały pomniejszone tak bardzo, że trudno odczytać ich treść w wydrukowanej wersji rozprawy doktorskiej (np. publikacja A4).

Powyższe nieliczne uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej.

4. Wiedza kandydata

O stanie wiedzy Doktorantki można wnioskować na podstawie zawartości rozdziałów *Introduction* oraz *Main Results*. Wprowadzenie zawiera charakterystykę cząsteczek RNA w odniesieniu do ich struktury oraz funkcji pełnionych w komórkach, a także opisy znanych motywów strukturalnych występujących w RNA. Rozdział ten dobrze wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy doktorskiej. Kolejny

rozdział pokrótce opisuje wyniki badań motywów strukturalnych występujących w cząsteczkach RNA, z podziałem na: (i) motywy występujące w roślinnych pre-miRNA (w odniesieniu do publikacji A1 i A2), (ii) motywy występujące w cząsteczkach pri-miRNA i miRNA człowieka (w odniesieniu do publikacji A3), (iii) motywy kwadrupleksu (w odniesieniu do publikacji A4, A5 i A6). Omawiane rozdziały zostały napisane bardzo treściwie i zwięźle, co sprawia, że dobrze się je czyta, co świadczy o bardzo dobrej orientacji Autorki w stanie wiedzy o zagadnieniach podjętych w rozprawie. Spis literatury (Bibliography) został sporządzony w kolejności alfabetycznej i zawiera pozycje cytowane w rozdziałach *Introduction* i *Main Results*. Cytowana literatura to zarówno pozycje nowe (opublikowane w okresie ostatnich pięciu lat), jak i pozycje starsze, np. publikacja autorstwa J. Watson'a i F. Crick'a, z roku 1953, opublikowana z czasopiśmie *Nature*, w roku 1974. Spis literatury nie zawiera numeracji; szacuję, że zawiera on ok. 140-150 pozycji.

Podsumowując, na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej, bardzo wysoko oceniam wiedzę Doktorantki w obszarze dotyczącym badań motywów strukturalnych występujących w kwasach rybonukleoproteinowych. Moją szczególną uwagę, w kontekście usystematyzowania wiedzy na temat wszystkich dostępnych zasobów bioinformatycznych pod kątem ich wykorzystania do badań kwadrupleksów RNA, zwróciła praca: Miskiewicz J, Sarzynska J, Szachniuk M **(2021)**, *Briefings in Bioinformatics* (IF_{2021} 11,622) ([A5]), w której Pani J. Miśkiewicz jest pierwszym autorem.

5. Inne uwagi

Podczas obrony prosiłabym Autorkę rozprawy o ustosunkowanie się do następujących pytań/ kwestii:

1. Czy Autorka zastanawiała się na nad różnicami/podobieństwami strukturalnymi, dotyczącymi roślinnych i zwierzęcych pre-miRNA, w kontekście procesu biogenezy miRNA?

2. Czy na podstawie prowadzonych analiz bioinformatycznych motywów kwadrupleksowych w RNA, można wnioskować o stabilności tych motywów (w strukturach RNA) w żywych komórkach?

3. Czy Doktorantka zastanawiała się nad badaniem oddziaływań kwadrupleks RNA-białko? Czy różnice w topologii/organizacji kwadrupleksów mogą mieć znaczenie dla oddziaływań kwadrupleks RNA-białko (jakie)?

6. Podsumowanie

Podsumowując, chciałabym stwierdzić, iż Pani mgr Joanna Miśkiewicz przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską. Nie mam wątpliwości, iż dane zebrane podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej pozwolą na pełniejsze zrozumienie funkcji biologicznych pełnionych przez motywy strukturalne zidentyfikowane w cząsteczkach RNA. Biorąc pod uwagę opinie zaprezentowane w poprzednich punktach i wymagania zdefiniowane przez artykuł 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (z późniejszymi zmianami) moja ocena rozprawy pod względem trzech podstawowych kryteriów jest następująca:

A. Czy rozprawa zawiera oryginalne rozwiązanie problem naukowego? (wybierz jedną opcję stawiając znak **X**)

[X]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Zdecydowanie TAK	*Raczej TAK*	*Trudno powiedzieć*	*Raczej NIE*	*Zdecydowanie NIE*

B. Czy po przeczytaniu rozprawy zgadzasz się, że kandydat posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie Informatyka techniczna i telekomunikacja?

[X]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Zdecydowanie TAK	*Raczej TAK*	*Trudno powiedzieć*	*Raczej NIE*	*Zdecydowanie NIE*

C. Czy kandydat posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej?

[X]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Zdecydowanie TAK	*Raczej TAK*	*Trudno powiedzieć*	*Raczej NIE*	*Zdecydowanie NIE*

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową zaprezentowanych wyników, które zostały opublikowane w sześciu pracach, w dobrych lub bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także biorąc pod uwagę znaczący wkład Doktorantki w powstanie tych sześciu publikacji, rekomenduję wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Anna Krzyńska-Kokorniak

Podpis