

OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Elżbiety Wanowskiej

pt. „Regulatorowe funkcje ludzkich długich niekodujących RNA”

wykonanej

w Instytucie Biologii i Ewolucji Człowieka UAM w Poznaniu

pod kierunkiem Prof. UAM dr hab. Michała Szcześniaka

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM z dnia 22 stycznia 2021 roku.

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Wanowskiej pt. „Regulatorowe funkcje ludzkich długich niekodujących RNA” oparta jest na zestawie trzech prac opublikowanych w latach 2018- 2021. Doktorantka jest pierwszą autorką dwóch z nich- jednej o charakterze przeglądowym i drugiej pracy eksperymentalnej. Udział doktorantki w przedstawionych pracach oceniony został na 25% w pracy przeglądowej oraz odpowiednio na 70% w pracy eksperymentalnej. W trzeciej pracy stanowiącej podstawę rozprawy doktorantka jest drugą autorką. Jej udział oceniony został na 40%. Sumaryczny współczynnik oddziaływania wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi $IF=15,6$.

Rozprawa doktorska skonstruowana jest w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej prace i ich omówienie stanowią jej trzon. W rozprawę włączono typowe rozdziały, takie jak Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie do przedstawionych prac oraz spis cytowanej literatury. Uważam, że ta część pracy została przygotowana przez mgr Wanowską bardzo starannie z wykorzystaniem bardzo

dobrych źródeł literaturowych. Rozdział ten został napisany bardzo dobrym, i czytelnym językiem, który doskonale wprowadza czytelnika w prezentowane prace. Jedyne, czego mi zabrakło w tej części rozprawy, to krótkie podsumowanie uzyskanych wyników, jak również opisu dalszych potencjalnych planów związanych z realizacją omawianego tematu.

W składzie rozprawy znajdują się także wymagane publikacje oraz odpowiadające im Oświadczenie współautorów określające procentowy udział każdego z nich w przedstawionych pracach. Doktorantka zawarła w opisie informacje na temat źródeł finansowania badań przedstawionych w rozprawie. Zapoznanie się z Oświadczeniami Promotora pracy, który szczegółowo określił zarówno rolę i udział doktorantki, jak i własny w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji, a także precyzyjne stwierdzenia, co do zakresu zaangażowania w dane publikacje wszystkich pozostałych współautorów pozwala uznać, że wkład doktorantki w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie i jej zaprojektowanie – jako kompleksowego podejścia do zagadnienia zrozumienia roli długich niekodujących RNA w regulacji ekspresji genów – jest zasadniczy i znacznie przekraczający wkład pozostałych badaczy. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło doktorantki.

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej finansowane były ze środków przewidzianych na realizację dwóch grantów NCN, z czego doktorantka była kierownikiem jednego z nich.

2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Wanowskiej dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badanie roli długich niekodujących RNA w procesie regulacji ekspresji genów. Ta grupa RNA to niezwykle zróżnicowana klasa transkryptów, które pomimo braku zdolności do kodowania białek, pełnią funkcje regulatorowe w szeregu procesów komórkowych. Co szczególnie ważne, z punktu widzenia prezentowanej pracy, lncRNA mogą pełnić znaczące role w przebiegu wielu chorób człowieka, w tym chorób nowotworowych. Znaczenie funkcjonalne lncRNA, szczególnie tych, które ulegają ekspresji w kierunku przeciwnym do genów kodujących białka zostały bardzo dobrze opisane w pracy przeglądowej pt. „*Natural antisense transcripts in diseases: From modes of action to targeted therapies*”.

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy była funkcjonalna charakterystyka ludzkich długich niekodujących RNA. Doktorantka zrealizowała go w następujących etapach:

1. identyfikacja i charakterystyka nowych ludzkich lncRNA
2. weryfikacja eksperymentalna analiz *in silico* pod kątem statusu poliadenylacji oraz lokalizacji komórkowej nowych lncRNA

3. szczegółowe badanie funkcji wybranych lncRNA- tutaj na podstawie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych oraz danych literaturowych, doktorantka wyselekcjonowała kilka lncRNA o potencjalnie dużym znaczeniu biologicznym. Jeden z lncRNA- *OIP5-AS1* został wybrany do dalszych badań.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik, które moim zdaniem były w pełni odpowiednie do ich realizacji. Zostały one bardzo szczegółowo opisane w odpowiednich rozdziałach „Materials and methods” prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia rezultaty wielu obszernych, bardzo dobrze zaplanowanych prac, zarówno *in silico*, jak i *in vitro*.

Najistotniejsze wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to:

1. identyfikacja 41 400 nowych lncRNA u ludzi na podstawie analizy publicznie dostępnych wyników wysokoprzepustowego RNA 1463 prób obejmujących preparaty tkankowe oraz linie komórkowe;
2. klasyfikacja nowych lncRNA w oparciu o zachowawczość sekwencji, lokalizację komórkową, status poliadenylacji, kontekst genomowy, specyficzność tkankową oraz stabilność transkryptów;
3. eksperymentalne potwierdzenie istnienia przewidzianych metodami bioinformatycznymi wybranych nowych lncRNA;
4. wskazanie potencjalnej funkcji biologicznej dla 24 wybranych lncRNA- możliwe biomarkery diagnostyczne nowotworu piersi;
5. eksperymentalne określenie statusu poliadenylacji oraz lokalizacji komórkowej jako element weryfikacji analiz *in silico* – wykazanie specyficzności tkankowej dla wybranych lncRNA;
6. zaproponowanie mechanizmu działania dla *OIP5-AS1* (znanego także jako *Cyrano*) - antysensowego transkryptu dla *OIP5*, zgodnie z którym może on regulować ekspresję *OIP5*, znanego onkogenu, poprzez oddziaływanie z komponentem kompleksu remodelującego chromatynę- białkiem SMARCA4. Doktorantka wraz ze współautorami pracy wykazała, iż jedna z form splicingowych *OIP5-AS1* zatrzymywana jest w jądrze komórkowym, gdzie bezpośrednio oddziałuje z chromatyną. Wyciszenie tego transkryptu za pomocą oligonukleotydów antysensowych (tzw. gapmery z modyfikacją LNA) doprowadziło do obniżenia poziomu ekspresji transkryptu sesnowego *OIP5*, w pełni potwierdzając oddziaływanie pomiędzy *OIP5* i *OIP5-AS*. Dalsze analizy bioinformatyczne oraz precyzyjne eksperymenty obejmujące m.in. immunoprecypitację chromatyny i związanych z nią RNA, oczyszczanie RNA antysensowych wraz ze spektrometrią mas (RAP-MS) oraz immunoprecypitacja natywnych RNA w pełni potwierdziły mechanizm działania *OIP5-AS1* i bezpośrednie oddziaływanie tego transkryptu z

wieloma białkami jądrowymi, w tym głównie z SMARCA4, komponentu kompleksu remodelującego chromatynę, którego miejsce wiązania znajduje się w promotorze genu *OIP5*.

4. Znaczenie uzyskanych wyników

Literatura naukowa obejmuje w tej chwili wiele prac wskazujących na rolę i znaczenie funkcjonalne długich niekodujących RNA. Mechanizm działania wielu ze zidentyfikowanych lncRNA pozostaje jednak słabo poznany.

Praca mgr Elżbiety Wanowskiej łączy w sobie zarówno bardzo dogłębną analizę bioinformatyczną dostępnych danych, jak i bardzo dobrą analizę eksperymentalną wybranych lncRNA, wskazując nie tylko bezpośrednio na mechanizm działania jednego lncRNA, ale co wydaje mi się, bardzo cenne, również na drogę i możliwości poszukiwania funkcji innych cząsteczek tego typu.

5. Komentarze

Ze względu na fakt, iż rozprawa doktorska stanowi zbiór opublikowanych i zrecenzowanych już badań, pozwolę sobie jedynie na drobne komentarze.

1. W pracy „Towards a deeper annotation of human lncRNAs” przeprowadzono weryfikację ekspresji kilku lncRNA w linii komórkowej raka piersi MDA-MB-453. Jest to jedna z bardzo wielu linii komórkowych tego nowotworu. Czy doktorantka (lub zespół badawczy) rozważał zastosowanie innej linii nowotwory piersi dla porównania poziomu ekspresji wybranych lncRNA?

2. Doktorantka w kontekście tych analiz mówi, o identyfikacji biomarkerów diagnostycznych. Tutaj jedynie, trochę trudno mi sobie wyobrazić, żeby bez weryfikacji ekspresji RNA w preparatach tkankowych, móc w sposób całkowicie uprawniony ten pogląd propagować.

W kontekście tej pracy, uważam, że w literaturze zdarzają się opracowania, których wartość merytoryczna nie jest odzwierciedlona w pełni przez współczynnik oddziaływania czasopisma, w którym ta praca została opublikowana. Osobiście uważam tę pracę za jedną z lepszych dotyczących kompleksowej, globalnej analizy konkretnej klasy RNA. Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona na każdym możliwym poziomie dostępności i mam przekonanie, że dane, którymi posługiwał się zespół zostały wykorzystane absolutnie do końca. Dodatkowo, uzyskane wyniki, zostały potwierdzone dobrze dobranymi pracami eksperymentalnymi. Jedyne, czego mi tu brakuje, to wspomniane wcześniej porównanie kilku linii komórkowych i odniesienie tego do materiału klinicznego.

3. W wyniku immunoprecypitacji udało się zidentyfikować co najmniej kilka jądrowych białek wiążących *OIP5-AS*. Czy są przesłanki wskazujące na funkcjonalność któregoś z nich w oddziaływaniu z *OIP5-AS*? Czy planowane są dalsze prace z tym związane?

6. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Elżbiety Wanowskiej na uwagę zasługuje wysoka jakość przeprowadzonych badań, co znalazło odzwierciedlenie w poziomie opublikowanych prac. Bardzo podoba mi się połączenie zaawansowanych metod bioinformatycznych i podejścia eksperymentalnego, co skutkuje kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Doceniam także fakt, iż doktorantka wraz ze współautorami w swoich pracach w pełni czerpała z publicznie dostępnych danych, bardzo umiejętnie je wykorzystując, jak również w bardzo elegancki sposób uzupełniając je odpowiednimi pracami własnymi. Dlatego też uważam, iż rozprawa doktorska i składające się na nią prace jest bardzo cennym i rzetelnym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Wanowskiej spełnia wszystkie warunki zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Zwracam zatem się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM w Poznaniu o dopuszczenie mgr Elżbiety Wanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość prac stanowiących jej trzon, wnoszę do Rady Naukowej o jej wyróżnienie.

Poznań, 18.05.21



dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN