



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

25 października, 2024

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 600
<http://bionano.cent.uw.edu.pl>

Rada Naukowa Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marianny Plucińskiej-Jankowskiej

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marianny Plucinskiej-Jankowskiej, zatytułowana „Obliczeniowa analiza struktur drugorzędowych RNA w genomach wirusowych w oparciu o dane z metod wysokoprzepustowego próbkowania strukturalnego” (ang. “*Computational analysis of RNA secondary structures in viral genomes using high-throughput probing data*”) została napisana pod kierunkiem dra hab. Marka Żywickiego, prof. UAM na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

Temat badawczy rozprawy dotyczy przewidywania struktury drugorzędowej RNA w oparciu o dane doświadczalne oparte na wykorzystaniu różnych reagentów oddziałujących z określonymi fragmentami RNA. Autorka rozprawy opracowała uniwersalną metodę analizy danych z wysokoprzepustowego sondowania struktury drugorzędowej RNA oraz metodę porównywania alternatywnych struktur drugorzędowych RNA. Następnie zastosowała opracowane metody do analizy danych z sondowania struktury RNA wirusów Zika. Zidentyfikowała motywy RNA zachowane pomiędzy różnymi izolatami, dokonała analizy struktur alternatywnych RNA i porównała je ze strukturami modelowymi i ze strukturą RNA wirusa Dengi.

W rozprawie mgr Marianna Plucinska-Jankowska przedstawiła dwie nowe metody obliczeniowe: probNORM i rnaCARD. Pierwsza z metod służy do analizy danych z wysokoprzepustowych doświadczeń określania struktury drugorzędowej RNA. W metodzie obliczana jest reaktywność pojedynczych nukleotydów na podstawie skorygowanego rozkładu sygnału w próbce kontrolnej. Drugi program, rnaCARD, został opracowany do porównywania alternatywnych struktur drugorzędowych RNA, umożliwiając określenie ich podobieństw na podstawie reprezentacji w notacji abstrakcyjnych kształtów RNA. Te dwa programy zostały następnie zastosowane do przeprowadzenia kompleksowej analizy drugorzędowych struktur RNA regionów UTR wirusa Zika. Na podstawie sygnałów reaktywności obliczonych za pomocą programu probNORM, autorka wyznaczyła struktury drugorzędowe RNA czterech izolatów wirusa Zika, i następnie przy użyciu rnaCARD zidentyfikowała ich nowe cechy strukturalne.

Praca doktorska mgr Plucinskiej-Jankowskiej jest napisana w formie pełnej rozprawy, ale część wyników została już opublikowana. Pani Plucinska-Jankowska jest współautorką artykułu w *Int J Mol Sci* opublikowanego w roku 2023, a także pierwszym autorem publikacji w czasopiśmie *BioTechnologia* opublikowanej w roku 2016. Dwa kolejne manuskrypty dotyczące tematyki rozprawy, w których pani Plucinska-Jankowska będzie pierwszym autorem są w przygotowaniu. Pani Plucinska-Jankowska jest też współautorem dwóch innych artykułów, we *Frontiers in Pharmacology* i w *Pharmacogenomics J*, których tematyka nie jest ściśle związana z tematyką rozprawy.

Rozprawa doktorska liczy 130 stron i jest napisana w języku angielskim. Ma standardowy układ i jest podzielona na sześć głównych rozdziałów. Bibliografia jest obszerna i zawiera 133 pozycje.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym *Introduction* autorka wprowadza czytelnika w tajniki struktury drugorzędowej RNA oraz w różne sposoby zapisu takiej struktury. Opisuje także ogólny proces zwijania się cząsteczek RNA oraz zależność formowania struktury RNA od jonów, zwłaszcza dwuwartościowych. Następnie autorka wymienia i opisuje metody przewidywania struktury drugorzędowej RNA, takie jak podejście oparte na wyznaczeniu struktury odpowiadającej minimum energii swobodnej, metodach porównawczych i statystycznych opartych na prawdopodobieństwie utworzenia par zasad. Po metodach obliczeniowych autorka przechodzi do opisu metod doświadczalnych, enzymatycznego i chemicznego sondowania struktury RNA. Wymienia enzymy i addukty/reagenty służące do tego typu metod. Następnie przechodzi do wysokoprzepustowego próbkowania sekwencji i struktury drugorzędowej RNA dla wielu cząsteczek jednocześnie i omawia jak w eksperymencie określić, zanalizować i skwantyfikować sygnał pochodzący z doświadczeń sondowania RNA. Detekcja sygnału została bardzo przejrzysto podsumowana w Tabeli numer 4, w zależności od próbkującego odczynnika.

W kolejnym podrozdziale autorka opisuje, jak obliczyć tzw. reaktywność dla każdego nukleotydu w RNA, aby w pełni wykorzystać dane z doświadczeń sondowania struktury RNA. Taka reaktywność odzwierciedla dostępność danego fragmentu RNA dla cząsteczki, która je sonduje/próbkuje. Techniki wysokoprzepustowe opisane we wstępie to: DMS-seq, Mod-Seq, structure-seq i icSHAPE. Dalej autorka przechodzi do algorytmów przewidujących strukturę drugorzędową RNA, które uwzględniają dane doświadczalne, np. reaktywności używane jako więzy. Autorka podkreśla, że połączenie metod obliczeniowych i doświadczalnych jest konieczne, ponieważ doświadczenia wysokoprzepustowe są obarczone błędami. Reaktywności są powiązane z prawdopodobieństwami parowania zasad według różnych algorytmów. Ostatnia część wstępu koncentruje się na aspektach biologicznych i dotyczy flawiwirusów. Autorka omawia struktury drugorzędowe fragmentów 5'UTR i 3'UTR RNA tych wirusów oraz drzewo filogenetyczne szczepów Zika.

Wstęp rozprawy prezentuje wysoki poziom merytoryczny i je dobrze napisany. Wiele podsumowań jest zawartych w Tabelach, co ułatwia czytelnikowi szersze spojrzenie na tematykę, np. Tabela 2 czy Tabela 3. Jakość niektórych rysunków nie jest najlepsza. Na przykład rysunek 4 na stronie 35 powinien być większy.

W rozdziale 2 autorka przedstawia cel rozprawy i cele szczegółowe. Celem pracy doktorskiej mgr Marianny Plucinskiej-Jankowskiej było przeprowadzenie kompleksowej analizy porównawczej struktur drugorzędowych RNA regionów UTR czterech izolatów wirusa Zika, aby zidentyfikować nowe zachowane motywy strukturalne. Realizacja tego celu wymagała opracowania nowych narzędzi obliczeniowych oraz uwzględnienia w nich alternatywnych konformacji RNA. Cel ten został przez autorkę rozprawy zrealizowany w całości.

W rozdziale trzecim autorka rozprawy opisuje metody i bazy danych, z których korzystała. Ta część jest przedstawiona w zwartej formie, charakterystycznej dla publikacji naukowych, ale nie budzi zastrzeżeń. Jest opisana poprawnie.

Kolejny rozdział rozprawy to wyniki. Rozdział ten został podzielony na trzy części. W pierwszej części autorka opisuje oprogramowanie probNORM, metodę do normalizacji danych pochodzących z sondowania RNA. Druga część dotyczy oprogramowania rnaCARD, służącego do porównywania struktury drugorzędowej RNA. W trzeciej części autorka prezentuje wyniki, w których zastosowała te metody do analizy struktury drugorzędowej RNA flawiwirusów.

Oprogramowanie probNORM to metoda służąca do normalizacji danych pochodzących z doświadczalnego sondowania RNA. Głównym celem metody probNORM jest rozróżnienie między szumem tła a istotnymi informacjami strukturalnymi w eksperymentach sondowania RNA. probNORM bierze pod uwagę liczbę zatrzymań działania enzymu odwrotnej transkryptazy (RT) lub częstości mutacji obliczonych dla każdej pozycji w dwóch próbkach RNA: badanej i kontrolnej. Opis algorytmu jest szczegółowy i wspomagany rysunkami. Miejsca zatrzymania odwrotnej transkrypcji wskazują na pozycje modyfikacji chemicznych w strukturze RNA, a analiza tych miejsc zatrzymania pozwala na określenie struktury drugorzędowej RNA. Autorka porównuje też wyniki otrzymane jej programem z wynikami działania kilku innych programów. Jej metoda obliczania sygnału skutecznie eliminuje błąd wynikający z rozkładu odczytów i zapobiega niedoszacowaniu reaktywności. Pani Plucinska-Jankowska udostępniła także serwer internetowy do uruchamiania probNORM i analizy wyników.

Drugim programem, opracowanym przez mgr Plucinską-Jankowską, jest rnaCARD. rnaCARD umożliwia porównanie dwóch alternatywnych struktur RNA, wyszukując podobieństwa i różnice między elementami strukturalnymi. Program umożliwia identyfikację istotnych przegrupowań w obrębie struktury drugorzędowej RNA. Ta funkcjonalność jest szczególnie przydatna w badaniach nad zmiennością strukturalną długich cząsteczek RNA, takich jak wirusowe RNA. Ponadto, rnaCARD umożliwia automatyczną analizę wielu transkryptów jednocześnie. Skuteczność rnaCARD została potwierdzona poprzez testy na zestawie transkryptów. Podobnie jak w przypadku programu probNORM, autorka opracowała także wersję programu dostępną przez przeglądarkę internetową. Dla zapewnienia otwartego dostępu do narzędzi, obydwa programy zostały również udostępnione w repozytorium GitHub.

W kolejnej części rozdziału Wyniki, pani Plucinska-Jankowska zastosowała opracowane przez nią programy do analizy struktur drugorzędowych regionów 5'- i 3'-UTR genomowego RNA różnych

szczepów wirusów Zika i dengi. Obliczyła reaktywności i na ich podstawie przewidziała struktury drugorzędowe, a także przeprowadziła analizę porównawczą tych struktur. Interesowało ją, czy pewne struktury drugorzędowe mogą koegzystować w równowadze. W tym podrozdziale brakuje mi podsumowania co do roli biologicznej wyników autorki.

Rozdział 5 to dyskusja wyników. Autorka podkreśla, że zaproponowana przez nią metoda i stworzony program probNORM jest uniwersalny i można go stosować do danych pochodzących z różnych protokołów doświadczalnych. Metoda autorki nie przeszacowuje tła, co skutkuje lepszym rozróżnieniem nukleotydów "reaktywnych" od tła. probNORM stosuje korektę sygnału z próbki kontrolnej co pozwala odzyskać dodatkowe informacje, które bez korekty byłyby interpretowane jako sygnał tła. Porównania z kilkoma innymi metodami wykazały, że probNORM lepiej rozróżnia pomiędzy sparowanymi i niesparowanymi nukleotydami i skala reaktywności umożliwia bezpośrednie modelowanie struktury drugorzędowej RNA. Drugi program, rnaCARD, ułatwia porównanie alternatywnych struktur drugorzędowych. W przypadku niektórych cząsteczek RNA, takich jak ryboprzełączniki, zmiana struktury drugorzędowej jest kluczowa dla funkcji. Ponadto, autorka podkreśla, że analiza porównawcza struktury drugorzędowej różnych izolatów wirusów ZIKA i dengi pokazała, że domena 1 fragmentu 3' UTR wykazuje zmienność pomiędzy izolatami.

Rozdział 6 to krótkie jednostronicowe podsumowanie. Rozprawę uzupełniają: bibliografia, lista rysunków i tabel, wykaz skrótów oraz suplement.

Język angielski rozprawy jest poprawny, jednak autorka nie uniknęła drobnych błędów, głównie dotyczących braku przedimków. Ze względu na moją rolę recenzentki rozprawy, poniżej przedstawiam kilka z takich drobnych błędów, nie wpływających jednak na czytelność rozprawy.

str. 18. W zdaniu o modyfikacjach w strukturze RNA autorka odwołuje czytelnika do Tabeli 2, ale w Tabeli 2 na str. 23 nie ma modyfikacji RNA a jedynie enzymy, które hydrolizują RNA.

str. 23, Tabela 2, druga kolumna. Pairing specificity. Tytuł tej kolumny powinien raczej brzmieć specificity, gdyż nie mówimy, że enzymy parują z RNA, tylko oddziałują bądź je hydrolizują.

str. 32 powinno być subtraction introduces noise

str. 39 powinno być thesis encompasses

str. 50 powinno być We observed that mRNAs synthesized in Mn²⁺-containing MaP buffer exhibit

str. 52 drugie zdanie od góry nie jest zrozumiałe

str. 97 jest literówka w słowie identified

Czasem brakuje też kropek po wymienionych cytowaniach artykułów (np. str 28, 34),

str. 34 ostatnie zdanie, powinno być chyba NS5 a nie N5

Na rysunku 5 str 35, mała pętla sHP nie jest podpisana.

str. 56 ostatni paragraf, Różnice nie są wyraźnie widoczne pomiędzy rysunkiem 15a i 15b.

str. 60 Rysunek 17 i 18, Nie jest dla mnie jasne, dlaczego akurat te cząsteczki RNA były wzięte jako przykłady. Nie znalazłam takiego wyjaśnienia w tekście.

str. 64 Rysunek 21, w podpisie pod rysunkiem nie ma odniesienia do wykresu d) i e) a za to jest odniesienie dwa razy do c).

Po przeczytaniu rozprawy jestem ciekawa zdania autorki na poniższe tematy:

Mam wrażenie, że w rozprawie stwierdzenie "struktura RNA" jest tożsame ze strukturą drugorzędową RNA. Nie znalazłam natomiast informacji, że taka struktura drugorzędowa związa się do struktury trzeciorzędowej i dopiero struktura 3D jest funkcjonalna. Rysunki są również dwuwymiarowe. Rozumiem, że struktura 2D jest istotna, gdyż związanie się RNA jest hierarchiczne i bez znajomości struktury 2D nie sposób przewidzieć modeli pełnoatomowych. Ale w związku z tym ciekawa jestem, co autorka sądzi o pseudowęzłach. Czy strukturę pseudowęzła autorka określiłaby jako strukturę drugo- czy trzeciorzędową RNA? Jak można tego typu struktury uwzględnić w oprogramowaniu probNORM, czy jest to w ogóle możliwe z doświadczeń sondowania RNA i obliczaniu reaktywności?

Na stronie 22 autorka stwierdza, że metody obliczeniowe przewidywania struktury drugorzędowej RNA mają swoje ograniczenia. Jednym z takich ograniczeń są efekty środowiska, takie jak np. oddziaływanie z białkami czy obecność jonów. Ciekawa jestem, czy istnieje sposób, żeby uwzględnić efekt środowiska w metodach przewidywania struktury drugorzędowej RNA. Na przykład, czy można uwzględnić siłę jonową poprzez modyfikację parametrów modeli, poprzez może zmianę siły oddziaływania zasad albo uwzględnienie temperatur topnienia?

Podsumowując badania mgr Marianny Plucinskiej-Jankowskiej, widoczny jest jej indywidualny wkład w opracowanie dwóch programów i udostępnienie aplikacji na stronie internetowej. Oprogramowanie zostało przetestowane na RNA izolatów wirusa Zika i dengi oraz porównane z innymi programami. Uważam więc, że wkład naukowy autorki w badania nad strukturą RNA z wykorzystaniem danych pochodzących z badań doświadczalnych jest istotny i będzie użyteczny dla innych badaczy. Program probNORM to autorska metoda obliczania i normalizacji sygnału, mająca zastosowanie do danych z sondowania struktury RNA z różnych protokołów. probNORM jest uniwersalny i dostarcza wartości reaktywności odpowiednie do modelowania struktury RNA. rnaCARD to metoda do porównywania alternatywnych struktur drugorzędowych RNA na podstawie notacji abstrakcyjnych kształtów RNA. Programy probNORM i rnaCARD umożliwiają całościową analizę porównawczą struktur drugorzędowych opartą na wysokoprzepustowych eksperymentach sondowania struktury RNA.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marianny Plucinskiej-Jankowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza jej wiedzę teoretyczną w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Marianny Plucinskiej-Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.