

**Dr hab. Monika Pietrowska**

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie - Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15  
44-102 Gliwice  
tel. (32) 278 96 72  
e-mail: [monika.pietrowska@gliwice.nio.gov.pl](mailto:monika.pietrowska@gliwice.nio.gov.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Hudy pt. **"Różne mechanizmy działania microRNA w procesie translacji"**

zrealizowanej na Wydziale Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Rzeszowskiej.

Będący przedmiotem prezentowanej do oceny pracy doktorskiej proces translacji jest bardzo jednym z najistotniejszych w realizacji informacji genetycznej. Regulacja tego procesu odbywa się poprzez szereg czynników między innymi krótkie niekodujące cząsteczki RNA (microRNA), które mogą destabilizować cząsteczkę mRNA lub blokować dostępność jej sekwencji dla innych czynników np. inicjujących proces syntezy białek. W pracy doktorskiej poruszono zagadnienia związane z mechanizmem tych oddziaływań wykorzystując dwa modele komórkowe (komórki czerniaka Me45 oraz komórki raka okrężnicy HTC116) z wykorzystaniem genów reporterowych. Sam proces translacji jest regulowany głównie na etapie inicjacji, który może przebiegać w sposób wykorzystujący lub pomijający sekwencje AUG (kodon START). Doktorantka we wstępie pracy doktorskiej dokładnie opisuje przebieg procesu translacji z możliwym wpływem microRNA oraz jego konsekwencjami dla efektu czyli powstania białka.

Za główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie zbadanie wpływu microRNA na proces translacji, degradację mRNA oraz zbadanie różnic międzykomórkowych w tym zakresie, stąd jak pozostaje się niestety domyślać zastosowanie dwóch tak różnych modeli komórkowych? Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić, podczas publicznej obrony, powody wyboru właśnie tych linii nowotworowych jako modelu do swoich badań. Rola microRNA nie ogranicza się tylko do funkcji będącej przedmiotem rozprawy. Poza wyżej wymienioną funkcją, jaką jest regulacja ekspresji genów, microRNA kontroluje wiele innych procesów komórkowych, do których zaliczamy wzrost i różnicowanie komórek, metabolizm, sygnalizację (obecność cząsteczek microRNA wykrywa się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych), jak również wpływ na procesy chorobowe powiązane z nowotworami i stanami zapalnymi. MicroRNA zawarte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych reguluje ekspresję genów w komórkach docelowych. Do wymiany informacji pomiędzy komórkami dochodzi zarówno w stanach fizjologicznych, jak i w przypadku stanów patologicznych. Jest to obecnie kierunek badań rozpatrujący wykorzystanie cząsteczek microRNA jako biomarkerów procesu nowotworowego i jego diagnostyki. Poznanie mechanizmów i procesów w których biorą udział te cząsteczki o różnorodnych funkcjach jest w mojej opinii cenne i wysoce adekwatne do kierunków badawczych współczesnych badań medycznych oraz biologicznych. Temat pracy doktorskiej którego realizacji podjęła się mgr inż. Doroty Hudy uważam za zasadny i wpisujący się w aktualne badania naukowe.

Rozprawa doktorska składa się z siedmiu głównych rozdziałów, który stanowią: Wstęp teoretyczny, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Bibliografia (całość liczy 86 stron). Opis rozprawy jest na tyle rzeczowy, że recenzent jest w stanie ocenić dobór metod do założonych celów

wpłynęło dnia 01.12.2023.....

nr 160..... zał. ....

pracy, uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski. Niestety praca w kilku miejscach pozostawia pewien niedosyt. Wstęp teoretyczny mgr inż. Dorota Hudy ograniczyła do wprowadzenia czytelnika pracy jedynie w teoretyczne podstawy procesu translacji i mechanizmu działania microRNA. Nie jestem zwolennikiem obszernych prac doktorskich, ale być może poświęcenie jednego rozdziału wybranemu do badań modelowi i technikom ich realizacji wyczerpałoby pojawiające się pytania o powody podjętych przez Doktorantkę decyzji, na które odpowiedź (niestety nie na wszystkie) wnikliwy czytelnik może znaleźć dopiero w rozdziale Wyniki. Podobnie rozdział Materiały i Metody dostarcza kolejnych pytań dotyczących wybranych do realizacji postawionych sobie celów. Szczególnie zdawkowo potraktowała Doktorantka w opisie metodycznym (który świadczy o sposobie realizacji) cel jakim było „stworzenie modelu matematycznego działania microRNA i regulacji translacji”. Rozdział 3.11. Modelowanie stanowią trzy zdania. W opinii Recenzenta nawet jeśli Doktorantka implementuje gotowy algorytm dobrze jeśli rozumie i jest w stanie opisać jego parametry oraz podstawy teoretyczne, które będzie wykorzystywał do realizacji postawionego sobie zadania. Prosiłabym, aby Doktorantka przygotowując odpowiedzi na moje uwagi poświęciła tej części swojej pracy więcej uwagi. Dobór piśmiennictwa (85 pozycji) jest adekwatny do treści pracy i nie ogranicza się jedynie do najnowszych prac, ale obejmuje również wcześniejsze prace źródłowe. Praca zawiera 39 bardzo przejrzystych rycin oraz 6 tabel. Dużą zaletą tej pracy są przejrzyste bardzo dobrze opisane ryciny stanowiąc w mojej opinii olbrzymie ułatwienie dla zrozumienia treści pracy. Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Układ pracy jest zdecydowanie tradycyjny. W mojej ocenie zawierają one wszystkie informacje niezbędne do przygotowania niniejszej recenzji.

W związku z wątpliwościami pojawiającymi się podczas czytania przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mam kilka pytań związanych z treścią rozprawy, do których prosiłabym, aby mgr inż. Dorota Hudy odniosła się podczas publicznej obrony:

(1) Jak ma się informacja o tym, że pasaż komórek wykonywano „średnio co dwa dni” (strona 24) do podanego przez Doktorantkę czasu podziału populacji (dla HTC 116 – 8 godzin, a dla Me45 – 16 godzin)? Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić w jaki sposób ograniczyła jeśli tak było wpływ tej różnicy na uzyskane dane?

(2) Czy na podstawie opisu w rozdziale 3.12 Statystyka, że Doktorantka posługiwała się wyłącznie testem t Studenta można wnosić, że wszystkie uzyskane w pracy doktorskiej dane miały rozkład normalny?

(3) Czy w trakcie analiz Doktorantka zauważyła wpływ liczby komórek na uzyskane wyniki? W jaki sposób były normalizowane uzyskane wartości odczytów do liczby komórek, mając na uwadze pytania z punktu 1? W opisie metod Doktorantka podaje dość często objętości co oczywiście nie pozwala ustalić realnych wartości ani odtworzyć warunków eksperymentu bez dodatkowej wiedzy na temat na przykład stężeń, liczby komórek.

(4) Jaki eksperyment wyjaśniłby zdaniem Doktorantki drogę inhibicji lub stymulacji translacji będący kontynuacją jej badań? Czy Doktorantka planuje kontynuować badania w innych modelach komórkowych? Jakim zdaniem Doktorantki czynniki nie uwzględnione na etapie wyboru modelu komórkowego mogą powodować obserwowane różnice?

Doktorantka nie uniknęła błędów edytorskich oraz pomyłek np. strona 30 „-jak w punkcie 3.8” chyba chodziło o rozdział 3.9, gdyż w 3.8 nie znajduję tej informacji. W treści pracy znajdziemy sporo niezręczności językowych np. gen „jest na plazmidzie” (strona 24), „wyniki otrzymane z reakcji ilościowego PCRu” (strona 34). Ponadto dużym ułatwieniem dla Recenzenta byłoby posługiwanie się sformułowaniem: uzyskany wynik był/nie był (niepotrzebne skreślić) istotny statystycznie, zamiast „poziom białka był wyższy dla lucyferazy Renilla w obu liniach komórkowych oraz podobnie jak RNA wyższy w komórkach HCT116” (strona 38) oraz „W badanych liniach komórkowych obserwowałam

różnicę w poziomach transkryptów helikaz rozplatających mRNA" (strona 42). Niektóre zdania są czasem nieinterpretowalne: „Transkrypt czynnika eIF4G3 był również na niskim poziomie z przewagą w komórkach Me45” (strona 42). Byłoby dobrze gdyby przy opracowywaniu wyników Doktorantka unikała wyrażen potocznych lub skrótów charakterystycznych dla języka używanego w laboratorium: „zaobserwować pewną akumulację” (strona 50), „w momencie dołożenia regulacji poprzez miR-21” (strona 50), „rozkład mRNA genów „housekeeping” (strona 55).

Wykaz prac badawczych Doktorantki nie został dołączony do rozprawy, ale według danych ze strony PubMed dorobek naukowy mgr inż. Doroty Hudy obejmuje pięć publikacji. Jedna z prac w której mgr inż. Dorota Hudy jest pierwszym autorem zawiera dane będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Wyniki zostały opublikowane w dobrym czasopiśmie naukowym (International Journal of Molecular Science, MPDI, IF=5,6). Byłoby niezwykłym ułatwieniem dla Recenzenta, gdyby otrzymał dorobek naukowy Doktorantki, aby go ocenić. Oceniając tylko na podstawie danych w dostępie publicznym osiągnięcia Doktorantki należy uznać za znaczące. Osobiście uważam je za bardzo dobre na tym etapie kariery naukowej.

### **Wnioski ogólne**

Podsumowując, mgr inż. Dorota Hudy uzyskała wyniki o istotnej wartości naukowej. W ocenie recenzenta Autorka opisała uzyskane wyniki w umożliwiającej ocenę pracy doktorskiej formie, choć dość skrótowo. Być może krótki opis wyników wynika z faktu, iż Autorka uważała, że powtórzy informacje zawarte w opublikowanej pracy? Niemniej jednak dodatkowe informacje, zwłaszcza dotyczące pracy wykonanej przez Autorkę w części prezentującej dobór technik do realizacji postawionych sobie celów, ułatwiłyby pracę recenzentowi i nie pozostawiały miejsca na domysły. Powyższe drobne uwagi absolutnie nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Doroty Hudy. Treść rozprawy dowodzi dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Doroty Hudy, jej umiejętności analizy danych i w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. Ponadto rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w danej dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Reasumując, w mojej ocenie treść i jakość przedstawionej rozprawy w pełni odpowiadają wymogom stawianym rozprawom doktorskim oraz wskazują na dojrzałość naukową Kandydata. Stąd rekomenduję dopuszczenie rozprawy do jej publicznej obrony.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

*Prutnowska*