

Poznań, 02.06.2025 r.

dr. hab. Andonis Karachitos

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk
pt. „Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w
Saccharomyces cerevisiae w warunkach stresu abiotycznego”,
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN,
w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN.**

Przedstawiona rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk skupia się na analizie krótkich niekodujących RNA związanych z rybosomami, określanych jako rancRNA (ribosome-associated noncoding RNA). Autorka bada dwie kluczowe klasy tych cząsteczek: fragmenty pochodzące z tRNA (tRF) oraz fragmenty pochodzące z małych jąderkowych RNA (sdRNA), w warunkach stresu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Celem pracy, jak szczegółowo określiła Doktorantka, było przeprowadzenie identyfikacji i charakterystyki rancRNA u drożdży w warunkach optymalnych oraz podczas umiarkowanych stresów abiotycznych. Szczegółowe cele badawcze pracy obejmowały: a) określenie ilości i typów rancRNA oddziałujących z poszczególnymi frakcjami rybosomalnymi; b) analizę wpływu metylacji RNA na ilość i typ rancRNA wykrywanych przy użyciu technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania; c) próbę określenia funkcji najczęściej identyfikowanych tRF oraz sdRNA.

Rozdział „Wprowadzenie” szczegółowo nakreśla stan wiedzy dotyczący rybosomów oraz rancRNA. Autorka zaczyna od historycznego przeglądu odkryć rybosomów oraz niekodujących RNA, pokazując chronologiczny rozwój wiedzy na temat struktur RNA i ich roli w komórce. W dalszej części Autorka omawia klasyfikację, budowę oraz biogenezę tRF, podkreślając różnorodność tych cząsteczek oraz znaczenie ich posttranskrypcyjnych modyfikacji. Autorka opisuje także mechanizmy powstawania tRF, w tym zależne od angiogeniny i enzymu Dicer, oraz wskazuje na złożoność procesu związaną z udziałem innych, mniej poznanych endonukleaz. Wprowadzenie obejmuje również funkcjonalne aspekty tRF, pokazując ich wpływ zarówno na hamowanie, jak i stymulację translacji, oddziaływanie z

białkami Piwi, czy regulację ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym i postranskrypcyjnym.

Ponadto, osobny rozdział wprowadzenia poświęcony jest sdRNA, ich strukturze, klasyfikacji, biogenezie i funkcjom, podkreślając zarówno podobieństwa do mikroRNA, jak i unikalne cechy regulacyjne tych krótkich RNA. Dodatkowo omówiony został proces demetylacji RNA, istotny z punktu widzenia wykorzystanej w rozprawie metodyki.

Zauważyłem, że cytowane są aktualne źródła, które dobrze wpisują się w kontekst prowadzonych badań, co świadczy o dużej świadomości Doktorantki na temat stanu obecnej wiedzy naukowej. Szczegółowość opisu mechanizmów biogenezy i funkcji tRF i sdRNA, wywarła na mnie duże wrażenie i w moim odczuciu świadczy o głębokim zrozumieniu tematyki przez Autorkę.

Rozdział „Materiały i metody” przedstawia klarowny opis technik stosowanych w pracy doktorskiej, obejmując różnorodne metody biologii molekularnej i bioinformatyki. Rozdział jest podzielony logicznie na podrozdziały obejmujące aparaturę, odczynniki, zestawy, bufory, pożywki oraz szczegółowe protokoły procedur eksperymentalnych. Uważam, że rozdział ten spełnia wszystkie wymagania formalne stawiane pracy doktorskiej na wysokim poziomie merytorycznym i metodologicznym.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” stanowi obszerny opis wyników eksperymentalnych i ich analizy. Na szczególne uznanie zasługuje precyzyjne profilowanie polisomowe, które umożliwiło ocenę wpływu różnych warunków stresowych na translację, mierzonych jako stosunek polisomów do monosomów. Identyfikacja wyraźnych zmian aktywności translacyjnej, zwłaszcza w przypadku głodu cukrowego i promieniowania UV, została przedstawiona w sposób klarowny. Autorka opisuje również ilości uzyskanego RNA oraz ocenia jego jakość metodą elektroforezy kapilarne. Tu chciałbym zaznaczyć, że sama Doktorantka wskazuje na potencjalne niedoskonałości rozdziału frakcji rybosomalnych i proponuje sposoby ich ulepszenia, co według mnie świadczy o jej krytycznym podejściu do przeprowadzonych badań. Stanowi to dowód rzetelności i świadomości ograniczeń stosowanych metod.

Kolejnym mocnym punktem rozdziału jest część poświęcona demetylacji RNA, gdzie szczegółowo opisano procedurę z użyciem enzymów AlkB i AlkB-D135S oraz ocenę jej skuteczności za pomocą testu ELISA. Następnie, w bardzo rozbudowanej analizie danych wysokoprzepustowego sekwencjonowania (rancRNA-seq), Doktorantka analizuje ilość odczytów, zmiany w składzie frakcji RNA po demetylacji oraz identyfikuje dominujące typy RNA w poszczególnych frakcjach, co stanowi istotny wkład w zrozumienie dynamiki rancRNA.

Należy także podkreślić, że Doktorantka bardzo rzetelnie przeprowadziła analizę statystyczną i bioinformatyczną, wskazując na istotne zmiany w poziomie akumulacji różnych rancRNA między frakcjami oraz warunkami stresowymi i kontrolnymi. Klarowne przedstawienie wyników znacząco ułatwia interpretację danych i podnosi wartość naukową tego rozdziału. Z drugiej strony, obszerność i bogactwo danych stanowią jednocześnie pewne

wyzwanie dla czytelności tej części pracy. W niektórych miejscach pojawia się wyraźny nadmiar informacji, zwłaszcza w odniesieniu do diagramów Venna. Pewne części mogłyby być przedstawione bardziej syntetycznie lub w dowolnej formie zgrupowane, co poprawiłoby odbiór całości i ułatwiłoby zrozumienie najważniejszych wyników. Krótkie podsumowanie kluczowych ustaleń na końcu każdej sekcji również moim zdaniem umożliwiłoby szybsze wychwycenie sedna przeprowadzonych analiz. Niemniej jednak uważam, że rozdział „Wyniki i dyskusja” prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią wartościowy wkład w zrozumienie roli krótkich RNA w regulacji translacji w warunkach stresu i z pewnością są godne publikacji w wysoko punktowanych czasopismach naukowych.

Rozdział „Wnioski” stanowi zwięzłe i uporządkowane podsumowanie najważniejszych wyników pracy doktorskiej, z wyraźnym podziałem na wnioski ogólne oraz szczegółowe. W części ogólnej Doktorantka przedstawia kluczowe osiągnięcia badawcze, w tym identyfikację najsilniej asocjujących z rybosomami rancRNA, porównanie wpływu metylacji na te interakcje, wytypowanie unikatowych cząsteczek pojawiających się po demetylacji RNA oraz próbę określenia potencjalnych funkcji wybranych rancRNA na podstawie lokalizacji we frakcjach rybosomalnych. Moje uznanie dla tej części za zwięzłość i przejrzystość przekazu. W części szczegółowej wnioski zostały uporządkowane zgodnie z analizowanymi frakcjami rybosomalnymi. Na duży plus zasługuje bardzo dobra struktura rozdziału oraz czytelne tabele (Tab. 35 – 37), które w znacznym stopniu ułatwiają identyfikację poszczególnych rancRNA i umożliwiają szybkie odnalezienie interesujących danych.

Poniżej przedstawiam moje uwagi, które nasunęły się podczas czytania rozprawy. Doktorantka może się do nich odnieść, aby zaspokoić moją ciekawość:

- W pracy wskazała Pani na istotny wpływ demetylacji RNA na identyfikację rancRNA. Jakie inne modyfikacji RNA, poza metylacją, mogą również wpływać na wykrywalność tRF oraz sdRNA? Czy w przeszłości rozważała Pani ich analizę?

- W badaniach zastosowała Pani demetylację z użyciem białek AlkB oraz AlkB-D135S. Czy mogłaby Pani wyjaśnić wybór akurat tych enzymów oraz ewentualnie wskazać alternatywne metody demetylacji, które mogłyby być równie lub bardziej efektywne?

- Analizując wyniki sekwencjonowania rancRNA, zauważyłem niekiedy duże rozbieżności w ilości odczytów między replikatami biologicznymi. Jak Pani ocenia wpływ tych różnic na wiarygodność uzyskanych danych?

- Dlaczego w swojej pracy zdecydowała się Pani szczegółowo analizować wpływ głodu cukrowego i stresu hiperosmotycznego, pomijając stres UV, który wcześniej wspomniała Pani jako istotny czynnik wpływający na aktywność translacyjną? Czy było to podyktowane specyfiką uzyskanych danych, czy może innymi względami eksperymentalnymi?

- Czy uważa Pani, że identyfikowane rancRNA mogłyby mieć zastosowanie praktyczne np. jako biomarkery stresu lub cele terapeutyczne w przyszłości?

Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uwagi redakcyjne, które jednak nie mają wpływu na merytoryczną wartość pracy i nie wymagają odniesienia się podczas obrony. W kilku miejscach pojawiają się literówki, jak „*Saccharomyces cerevisiale*” zamiast „*Saccharomyces cerevisiae*” na stronie 18, czy niekonsekwentne zapisy jednostek, gdzie brakuje spacji między liczbą a jednostką, np. „18nt” zamiast „18 nt”. Dodatkowo zauważyłem brak jednolitego oznaczenia metylacji w indeksach górnych oraz powtarzające się przejęzyczenie „stres hiperomotyczny” zamiast „stres hiperosmotyczny”. Są to jedynie drobne kwestie techniczne i, jak wcześniej zaznaczyłem, nie mają one wpływu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy.

Podsumowując, praca doktorska mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk wnosi istotny wkład w poznanie roli rancRNA w regulacji translacji, zwłaszcza w warunkach stresu abiotycznego. Stanowi cenne źródło wiedzy i punkt wyjścia dla dalszych badań nad funkcją tych cząsteczek w komórkach eukariotycznych.

Uważam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



dr hab. Andonis Karachitos