

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAN
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
agata.starosta@ibb.waw.pl
tel. 22 592 3341

Warszawa, 25.05.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Anny Wasilewskiej-Burczyk

Rozprawa doktorska zatytułowana „Potencjał regulatorowy krótkich RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA) w *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach stresu abiotycznego” została przygotowana przez Panią mgr Annę Wasilewską-Burczyk pod opieką promotorską prof. ICHB PAN, dr hab. Kamili Grzywacz. Praca została przedłożona Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest identyfikacja i charakterystyka krótkich RNA asocjujących z rybosomami u *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach optymalnych i w czasie stresu. Wyniki przedstawione w pracy są nowe i stanowią integralną część badań prowadzonych przez grupę profesor Grzywacz.

Praca doktorska mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk została napisana w języku polskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest dopuszczalny dla danego formatu, chociaż praca by zyskała gdyby *Wyniki* i *Dyskusja* były osobnymi rozdziałami. Praca jest podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Streszczenie*, *Wstęp*, *Cele Pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki i Dyskusja*, i *Wnioski*. Autorka wykorzystała obszerną bibliografię odwołującą się do 191 artykułów naukowych. Autorka stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. Praca jest przejrzysta. Tekst opatrzone jest 60 rycinami, 19 wykresami, 6 diagramami i 55 tabelami, brakuje ich spisu. Ryciny i wykresy są starannie przygotowane, chociaż opisy na nich mogłyby być większe dla lepszej czytelności. Bibliografia została odpowiednio użyta w tekście i we właściwy sposób użyta do dyskusji wyników.

Pierwszy rozdział, *Wstęp*, autorka rozpoczyna zwięzłym opisem historii odkrycia krótkich RNA asocjujących z rybosomami (rancRNA) oraz przybliża ich funkcje. Następnie opisuje budowę transferowego RNA, modyfikacje nukleozydów w tRNA, klasyfikację krótkich RNA powstających z tRNA (tRF), ich biogenezę oraz funkcję. Następnie, w analogiczny sposób autorka omawia krótkie RNA powstające ze snoRNA (sdRNA). W ostatniej części wstępu, autorka przybliża funkcję

białka AlkB, jego mutanta, który demetyluje RNA, co jest wykorzystywane w sekwencjonowaniu modyfikowanych RNA.

Następnie, autorka przedstawia szczegółowe *Cele pracy*, które skupiają się na (I) opisie ilościowym i jakościowym rancRNA oddziałujących z rybosomami, (II) wpływie demetylacji RNA na detekcję cząsteczek RNA, (III) określeniu funkcji wybranych tRF i sdRNA.

W rozdziale *Materiały i Metody*, autorka podaje listy aparatury, odczynników, wymienia przepisy na bufony, pożywki, opisuje proces prowadzenia hodowli w warunkach optymalnych i stresowych, oraz procedury wykorzystywane przy prowadzeniu badań. Opis sekwencjonowania wysokoprzepustowego opisany jest bardzo skromnie, nie jest podane jak były przygotowane biblioteki. Brakuje szczegółów jak było oczyszczane białko – np. bufony.

Sekcję *Wyniki i Dyskusja* autorka rozpoczyna opisem profili rybosomowych *S. cerevisiae* hodowanych w optymalnych warunkach i poddanych różnym stresom. Na podstawie tego eksperymentu wybiera stres głodu cukrowego i stres hiperosmotyczny do dalszych analiz. Autorka zbiera podjednostki, monosomy i polisomy, izoluje z nich RNA a następnie frakcje krótkich fragmentów RNA. Część izolowanego materiału jest poddana demetylacji, żeby usunąć modyfikacje RNA. A następnie próbki są sekwencjonowane. W kolejnym kroku autorka omawia zidentyfikowane w sekwencjonowaniu biotypy RNA, dla próbek natywnych i demetylowanych, analizuje sdRNA i tRF.

Z opisu wynika, że próbki były przygotowane w dwóch powtórzeniach, chociaż w niektórych przypadkach tylko jedną próbkę udało się zsekwencjonować?. Nie jest jasne czy dane i wyniki na wykresach, w tabelach, na diagramach są pokazywane dla jednego z powtórzeń, zbiorczo? Brakuje np. PCA by móc ocenić powtarzalność i jakość powtórzeń. Jedno powtórzenie jest niewystarczające dla wiarygodnych analiz.

Autorka przedstawia diagramy pokazujące jaka, w danym warunku, część wykrytych RNA jest wspólna dla próbek +/- demetylacja. Następnie autorka kataloguje wybrane zidentyfikowane w sekwencjonowaniu sdRNA i tRF. W rezultacie powstaje zestawienie rancRNA asocjujące z rybosomem (I) tylko w czasie stresu głodu cukrowego, (II) tylko w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny, (III) w czasie obu typów stresu. Autorka na bieżąco dyskutuje każde z opisanych rancRNA.

Autorka kończy rozprawę *Wnioskami* gdzie zestawia wyniki i odkrycia dla podjednostek, monosomów i polisomów.

Dodatkowy komentarz merytoryczny:

Brakuje typowej dyskusji, autorka omawia wyniki na bieżąco w kontekście wiedzy literaturowej, ale brakuje szerszego kontekstu uzyskanych wyników w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy na badany temat.

- Komórki *S. cerevisiae* są znane z tego, że można uzyskać duże wzbogacenie frakcji polisomów. W wynikach prezentowanych w niniejszej pracy polisomy komórek hodowanych w warunkach optymalnych są 'niskie'. Czy rybosomy były 'zamrażane' przed zbieraniem komórek? Komórki były zbierane poprzez wirowanie. Czy hodowle były szybko chłodzone by utrwalić polisomy? Czy filtrowanie komórek w temperaturze ich wzrostu nie byłoby odpowiedniejsze dla zachowania polisomów?
- Jak było przygotowane medium o wysokim pH, czy na pewno przez dodatek kwasu solnego? (str 30). Układ dla stresu anaerobowego nie wydaje się być efektywny.
- Dlaczego gradienty były przechowywane przez noc?
- Na Rys 8, próbka K3 różni się od pozostałych, jaka jest tego przyczyna i czy próbka była wykorzystana do dalszych analiz?
- Rys 12, żel przedstawiający czyszczone białko AlkB i mutantu tego białka jest bardzo niewyraźny. Jaki jest szacowany procent czystości białek? Czy zanieczyszczenia nie przeszkadzają w dalszych analizach? Czy w czasie oczyszczania było dodatkowy etap po elucji białka ze złoża niklowego? Czy był wymieniany bufor po elucji?
- Dlaczego liczby odczytów (Tab 6) są tak bardzo różne dla poszczególnych próbek? Czy przy multiplexowaniu (o ile było, brakuje informacji jak przygotowano biblioteki) nie było normalizacji dla próbek?
- Pojawiają się stwierdzenia o akumulacji pewnych fragmentów np. w warunkach natywnych (- AlkB) ale jednocześnie braku cząsteczek po demetylacji. Jaki jest powód znikania tych RNA po demetylacji? (przykładowo str 77). Czy można uznawać takie wyniki za wiarygodne? Czy była sprawdzana aktywność nukleazowa oczyszczonego białka? Na zamieszczonym żelu widać wiele zanieczyszczeń innymi białkami.
- Czy sekwencjonowanie 'direct RNA sequencing' techniką Oxford Nanopore miałaby szansę zadziałać w przypadku sekwencjonowania tRNA i fragmentów tRNA?
- W wielu miejscach używana jest fraza 'ilość odczytów', odczyty są podliczane i można określać ich liczbę.
- W tekście jest wiele literówek i spolszczeń wyrazów angielskich jak np. translatować.

Przedłożoną mi do oceny pracę oceniam minimalnie **pozytywnie**. Badania do doktoratu opierają się właściwie na jednym eksperymencie. Ta praca to swoisty katalog fragmentów RNA wykrytych w sekwencjonowaniu, ale brakuje opisu roli biologicznej tych cząsteczek. Nie ma żadnych dodatkowych eksperymentów walidujących wyniki.

Przedstawiona 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 wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN i dopuszczenie mgr Anny Wasilewskiej-Burczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAN

