



JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKÓW



MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Dr hab. Magdalena Masłoń
Małopolskie Centrum Biotechnologii

Magdalena.maslon@uj.edu.pl

4 sierpnia 2025r

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Sztachery

Rozprawa Pani mgr Marty Sztachery miała na celu opracowanie metody izolacji kompleksów RNA-białko oraz stworzenie protokołu umożliwiającego badanie interakcji kolistych RNA z białkami i miRNA w tkance zwierzęcej. Tematyka pracy wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad oddziaływaniami RNA-białko oraz RNA-RNA i przedstawia skuteczną próbę stworzenia narzędzia przydatnego zarówno w badaniach podstawowych, jak i potencjalnie aplikacyjnych (np.: w kontekście wspomnianych w pracy chorób neurodegeneracyjnych i neurorozwojowych).

Wstęp do pracy został napisany umiejętnie. Przedstawia zarówno zagadnienia z zakresu biologii RNA, w tym rolę białek wiążących RNA (RBP) w zdrowiu i chorobie oraz funkcję kolistych RNA; jak i metodykę badania interakcji RNA-białko *in vitro*. Taki sposób prezentacji tematu wprowadza czytelnika w problematykę i logicznie uzasadnia konieczność opracowania nowej metody umożliwiającej analizę funkcji RNA i RBP w warunkach *in vivo*.

W części teoretycznej Doktorantka omawia różne strategie stabilizacji oddziaływań RNA-białko, w tym sieciowanie promieniowaniem UV o długościach 254 i 365 nm, wspominając o ich ograniczonej wydajności. Zalecałabym uzupełnienie tej części o konkretne dane na temat skuteczności crosslinkingu UV, dyskusję na temat potencjalnych problemów (jeśli takie mogą się pojawić) wynikających z różnic fotoreaktywności zasad i aminokwasów (wspomniane w pracy), i wpływ typu homogenatu wykorzystanego w pracy (proszkowany vs płynny) na skuteczność sieciowania.

Tabela 2 we wstępie, to bardzo dobry/przydatny przegląd metod używanych do badania interakcji RNA-białko z użyciem oligonukleotydów antysensownych (ASO).

Słabszym elementem wstępu są ryciny. Choć są one estetycznie bardzo dopracowane, to w kontekście pracy doktorskiej czy innej rozprawy naukowej, powinny przede wszystkim wspierać zrozumienie omawianych zagadnień. W obecnej formie są one zbyt uproszczone. Na przykład Rycina 5, przedstawiająca cząsteczkę circRNA- kluczową z punktu widzenia rozprawy, mogłaby być bardziej informacyjna, gdyby zawierała oznaczenia 5'ss i 3'ss, oraz schematyczne przedstawienie procesów backsplicingu i retencji intronu. Podobne zastrzeżenia dotyczą Ryciny 7, ilustrującej funkcję circRNA. Ze względu na złożoność omawianych mechanizmów (m.in. translacja zależna od IRES), ilustracja ta powinna zostać rozbudowana i lepiej wspierać zrozumienie prezentowanych treści.

Metodykę opisano w sposób bardzo szczegółowy, umożliwiający odtworzenie zaprezentowanych eksperymentów. W przypadku opisanej normalizacji miRNA, zastosowano U6 i sno-202 jako geny referencyjne. Są one często używane do normalizacji poziomu miRNA, ale niekoniecznie są jedynym sposobem normalizowania ekspresji miRNA. Jak jest uzasadnienie ich wyboru w przypadku opisanych

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków

eksperymentów? W przypadku przygotowywania kulek pokrytych streptawidyną, liczba komórek była szacowana na podstawie Blue Brain Atlas. Odniesienie do Blue Brain Atlas wymaga doprecyzowania- czyli jaka liczba i jakich komórek (cały mózg) została określona/użyta? Lizaty wstępnie oczyszczano w celu usuwania endogennie biotynylowanych białek. Jakie białka mogłyby być naturalnie biotynylowane? Wymaga to uściślenia.

Wyniki podzielono na kilka części, przedstawiające optymalizację metody, identyfikację RBP w różnych modelach mysich oraz optymalizację pull-downu circRNA z interaktorami białkowymi i miRNA.

Jednym z osiągnięć tej pracy jest optymalizacja metody homogenizacji-biopulweryzacja, która umożliwia zastosowanie opracowanej metody nie tylko do tkanki mózgowej, lecz także do innych rodzajów tkanek. Drugim istotnym osiągnięciem jest opracowanie metody do specyficznego pull-downu kolistych RNA wraz z partenrami białkowymi i miRNA.

Uwagi szczegółowe:

1. Na rycinie 21 w przypadku metody H zaobserwowano zwiększoną ilość białka AGO zarówno w frakcji INT, jak i organicznej - czy można to wyjaśnić?
2. Białko PCBP - W tekście wspomniano o inkluzjach białkowych z udziałem PCBP, ale nie zaprezentowano żadnych danych, odniesiono się do publikacji, w której Doktorantka jest współautorem.
3. Brak detekcji białka MBNL1 w ekstraktach z mózgów myszy typu dzikiego (WT) jest zaskakujący, biorąc pod uwagę jego znaną funkcję w mózgu. Dyskusja tego wyniku powinna zostać rozszerzona. Czy to może świadczyć o zwiększonej wydajności metody dla jądrowej części ekstraktu skoro zaobserwowano zwiększoną lokalizację MBNL1 w jądrach komórkowych modelu *Shi*?
4. Wyniki dotyczące splicingu *Mbnl1* są ciekawie zaprezentowane, ale pewne aspekty wymagają doprecyzowania. Na rycinie 33 pokazano ekspresję izoform *Mbnl1* w modelu WT i modelu *Shi*, natomiast na rycinie 35 pokazano analizę subkomórkowej lokalizacji białka MBNL1 w różnych obszarach mózgu. Dla stworzenia bardziej pełnego obrazu, warto byłoby uzupełnić rycinę 33 o np. wyniki Western blot potwierdzające poziom białka MBNL1 w lizatach tożsamyh do tych użytych do analizy splicingu. Dodatkowo analizę ryciny 33 ułatwiłoby odwołanie się do ryciny 32 ze starterami – np. numeracja par eksonów na rycinie 32 i umieszczenie tej numeracji na rycinie 33 (w opisie lub obok wykresów/żelu). Dalej, w kontekście analizy poziomu *circMbnl1* w różnych częściach mózgu i innych tkankach myszy WT i *Shi*, i hipotezy, że ta związana może być ściśle ze splicingiem genu *Mbnl1*, a w konsekwencji z lokalizacją białka MBNL1, należałoby uzupełnić analizę przedstawioną na Rycinie 34 i 35 o analizę splicingu *Mbnl1* mRNA w tych samych tkankach.
5. Porównanie metody XRNAS z eRIC i pCLAP wykazało niewielkie pokrycie zbiorów RBP. Rycina 36 przedstawia ilościowe porównanie wyników tych trzech różnych metod. Czy Doktorantka może podjąć próbę interpretacji tych różnic: czy np. 82 białek wspólnych dla metod pCLAP i XRNAS są białkami wiążącymi stricte mRNA? Czy 67 białek wykrytych wyłącznie metodą XRNAS to białka specyficzne dla niekodujących RNA? Czy analiza GO terms lub posiadania IDR ułatwia interpretację tych wyników?
6. Czy można uściślić, które miejsca wiązania RBP pokrywają się z eksonami circHIPK3? Czy te RBP zostały zidentyfikowane w tej pracy?



JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKÓW



MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Address:

Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków



JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKÓW



MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

7. Na rycinie 40 przedstawiono wyniki 3 powtórzeń, ale brak jest słupków błęd. Dlaczego zastosowano hybrydyzację 3h z pojedynczą sondą, skoro dla sond 10x20nt, czas 12h daje lepszą efektywność? Różnice w efektywności dla tych samych warunków - kulki C1 + 12h, 300 pm dające 80% inputu na rycinie 40B vs niższa efektywność na rycinie 40C wymagają komentarza.
8. Pokazano, że niektóre sondy circRNA odzyskują nie tylko dane circRNA, ale również mRNA z tego samego genu. Może to być rzeczywiście efekt częściowej komplementarności do eksonów mRNA, tak jak zasugerowała Doktorantka. Czy możliwe jest, że nie jest to niespecyficzne tło, a raczej rzeczywista interakcja pomiędzy circRNA i ich mRNA macierzystym?
9. Czy do skutecznej eliminacji mRNA konieczne jest wcześniejsze trawienie RNAzą R przed zastosowaniem oligo-dT? Czy oligo-dT samo w sobie nie wystarcza?
10. Jakie są zalety NanoString względem wysokoprzepustowego RNAseq lub small RNAseq, do identyfikacji partnerów RNA wybranych circRNA?
11. Analiza LC-MS/MS po pull-downie *Cdr1as*, przedstawiona na Rycinie 47, nie wykazała obecności PCBP1, natomiast analiza wszystkich wykrytych i wzbogaconych peptydów (Rycina 48) ujawniła obecność tego białka. Nie do końca jasne jest zatem, w jaki sposób przeprowadzono analizę na rycinie 47- czy nie jest również oparte na identyfikacji peptydów? Czy na podstawie zidentyfikowanych peptydów rzeczywiście możliwe jest wskazanie miejsca interakcji białka z RNA?
12. W **Dyskusji** Doktorantka omawia zmiany w RBPomie między myszami WT i *Shi*, zauważając, że nie są spowodowane różnicą poziomu ekspresji wybranych RBP pomiędzy tymi modelami. W jaki sposób różnice w ekspresji genów mogły przyczynić się do tych obserwacji?
13. W pracy znaleziono 40 motywów wiążących CELF2 do *Cdr1as* - jak wyglądałaby stechiometria wiązania z *Cdr1as*? Czy struktura CELF2 (lub przewidywana przez AlphaFold) sugeruje konkretny tryb wiązania?

Pozostałe uwagi:

- Nomenklatura: sugeruję precyzyjniejsze stosowanie terminów w odniesieniu do stężeń/molarności białek, kilkakrotnie użyto terminu „obfitość”.
- Zwroty potoczne np.: „masowa przebudowa” warto zastąpić bardziej precyzyjnym opisem procesów molekularnych.
- Temperatura hybrydyzacji została określona „empirycznie” - warto wskazać, jak dokładnie ustalono tę wartość.
- Ryciny z żelami agarozowymi i poliakrylamidowymi: na niektórych rycinach zauważono brak opisów markerów.
- Rycina 22 - brakuje przedstawienia inputu.

Podsumowując, rozprawa ma w dużej mierze charakter „method development”, a jej silnym atutem jest aspekt edukacyjny: doktorantka miała możliwość dogłębnego zapoznania się z eksperymentalnymi metodami biologii molekularnej, wymagającymi precyzji i dbałości o szczegóły (m.in. optymalizacja warunków homogenizacji, parametrów temperaturowych, składu buforów, warunków hybrydyzacji sond: stężenie, czas i temperatura). Przedstawiona metodyka oraz uzyskane wyniki otwierają wiele interesujących kierunków badawczych, zarówno w kontekście zrozumienia funkcji kolistych RNA, jak i mechanizmów leżących u podstaw chorób mózgu.

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków

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.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Marty Sztachery do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Marysielene Janczyk



JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKÓW



MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków