

Warszawa, 08-08-2025

dr hab. Roman Szczęsny, prof. IBB PAN

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Sztachery
“Charakterystyka białek wiążących RNA oraz oddziaływań kolistych RNA z białkami
w mózgu myszy”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Marty Sztachery została wykonana w Zakładzie Niekodujących RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Moniki Piweckiej.

Cząsteczki RNA należą do jednych z kluczowych elementów świata ożywionego. Ich lokalizacja, stabilność oraz funkcja w znaczącym stopniu zależą od oddziaływania z białkami. Białka te tworzą grupę funkcjonalną określoną jako białka wiążące RNA, w skrócie RBP. Sieć interakcji między różnymi klasami RNA a białkami RBP pozwala utrzymać podstawowy poziom ekspresji informacji genetycznej oraz dostosowywać go do zmieniających się warunków wewnątrzkomórkowych, w organizmie oraz w odpowiedzi na zmiany środowiska zewnętrznego. Znaczenie oddziaływań RNA-RBP jest dwukierunkowe, RBP regulują działanie RNA, ale jednocześnie opisano przypadki gdzie oddziaływanie z RNA kontroluje funkcję danego białka, np. poprzez rearanżację strukturalną białka, odsłonięcie sekwencji sygnałowych w białku i zmianę jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej.

W ujęciu klasycznym identyfikacja białek wiążących RNA opiera się głównie na analizie sekwencji aminokwasowej białka, identyfikacji obecności domen wiążących RNA oraz ukierunkowanych badaniach biochemicznych weryfikujących zdolność danego białka do wiązania RNA. W ostatniej dekadzie nastąpił znaczący rozwój metod globalnej identyfikacji białek wiążących RNA. W metodach tych oddziaływanie białko-RNA jest utrwalane, a następnie takie kompleksy są oczyszczane i białka związane do RNA są identyfikowane za pomocą spektrometrii mas. Zastosowanie tych metody doprowadziło do znaczącego rozszerzenia repertuaru białek klasyfikowanych obecnie jako białka wiążące RNA. Wiele z tych badań było wykonanych z użyciem hodowli komórek ssaczych w warunkach *in vitro*. Taki model badawczy może dostarczyć wielu cennych informacji. Niemniej, wiadomo, że przebieg niektórych procesów biologicznych nie jest dobrze reprezentowany w komórkach ssaczych hodowanych *in vitro*, zwłaszcza gdy dotyczy to procesów specyficznych tkankowo. Wzbogacenie danych dotyczących interakcji białko-RNA uzyskanych w warunkach *in vitro* o wyniki badań z użyciem modeli zwierzęcych stanowi istotny krok poznawczy. Dotychczas tego typu analizy były przeprowadzone w niewielkim stopniu, zwłaszcza w tak wymagającym organie jak mózg. Tę lukę

w naszej wiedzy postanowiła wypełnić mgr inż. Marta Sztachera podejmując się trudu opracowania metody analizy białek wiążących RNA w mózgu myszy.

Opisana powyżej strategia badawcza pozwala na globalną identyfikację białek wiążących RNA. Jednakże, bardzo często dla zrozumienia roli i biologii danego RNA, w szczególności niekodującego RNA, ważna jest identyfikacja białek oddziałujących z danym RNA. Dotychczas tego typu badania w większości były przeprowadzone dla trzech głównych klas RNA - mRNA, rRNA i tRNA. Znacznie mniej wiadomo o białkach wiążących kolisty RNA (circRNA). Warto zwrócić uwagę, że dopiero badania ostatnich lat i rozwój technik sekwencjonowania RNA pozwoliły na identyfikację i zrozumienie powszechności występowania cząsteczek kolistego RNA w komórkach ssaków, w tym człowieka. Mgr Marta Sztachera podjęła się również opracowania metody identyfikacji białek wiążących określony kolisty RNA w tkance mózgowej myszy. Zadanie to było o tyle trudne, że należało opracować metodę, która pozwalałaby identyfikować białka wiążące kolisty RNA, ale nie jego liniowy odpowiednik powstający w wyniku transkrypcji tego samego *locus* genomowego.

Identyfikacja białek RBP i poznanie ich oddziaływania z cząsteczkami różnych klas RNA, w tym kolistego RNA, jest kluczowym obszarem biologii RNA, niezbędnym do zrozumienia kluczowych procesów związanych z ekspresją informacji genetycznej. Tematykę badań podjętych przez mgr inż. Martę Sztachere uważam za bardzo interesującą i ważną poznawczo. Warto podkreślić, że postawione cele badawcze i wykorzystane modele badawcze są ambitne i reprezentują międzynarodowy poziom badań naukowych. Oba główne cele badań zostały osiągnięte, a opracowane metody i uzyskane wyniki stanowią cenne źródło wiedzy, w tym dla badań naukowych przeprowadzonych w przyszłości.

Pierwszym etapem prac badawczych przeprowadzonych przez Doktorantkę było opracowanie metody nazwanej przez Autorkę XRNAX służącej do globalnej identyfikacji białek RBP w mózgu myszy. Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów optymalizujących, w których stwierdziła istotną różnicę w utrzymaniu integralności RNA w zależności od sposobu homogenizacji tkanki. Autorka przetestowała dwie metody – proszkowanie zamrożonego materiału oraz dezintegrację materiału za pomocą homogenizatora. Okazało się, że metoda proszkowania pozwala zachować integralność RNA co pozwala przypuszczać, że jest to metoda, która umożliwia zachowanie fizjologicznie istotnych interakcji. Co więcej Autorka wykazała, że sposób homogenizacji tkanki wpływa na profil identyfikowanych interakcji RNA-białko. Stosując obie metody Autorka zidentyfikowała około 700-800 białek jako potencjalne białka RBP, z czego 109 (proszkowanie) i 81 (homogenizator) zostały zaklasyfikowane jako znacząco wzbogacone. Około 30% z puli białek wzbogaconych było wspólnych dla obu metod.

Po ustaleniu optymalnych warunków metody Autorka zweryfikowała jej przydatność do badań funkcjonalnych. W tym celu porównała profil białek RBP z mózgu myszy zdrowej z profilem RBP z mózgu myszy szczepu *shiverer*, stanowiącym model wrodzonego deficytu mieliny. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła w mózgu myszy *shiverer* wzmocniony poziom oddziaływania z RNA białka MBNL1 (Muscleblind-like 1), o którym wiadomo, że uczestniczy w regulacji alternatywnego składania pre-mRNA. Na tej podstawie Autorka postawiła hipotezę, że w mózgu myszy z wrodzonym niedoborem mieliny dochodzi do zaburzenia alternatywnego składania pre-mRNA, co potwierdziła eksperymentalnie dla niektórych ze zbadanych genów.

Na podstawie kolejnych eksperymentów mgr inż. Marta Sztachera zaproponowała molekularny mechanizm wzmocnionego oddziaływania MBNL1 z RNA w mózgu myszy *shiverer*. Po pierwsze Autorka wykazała, że ekspresja *locus Mbnl1* prowadzi do powstawania nie tylko mRNA, ale także kolistego RNA. W kolejnym etapie badań wykazała zmiany w poziomie *circMbnl1* w mózgu myszy *shiverer* i uzyskała

wyniki, które wskazują, że zmieniony poziom *circMbnl1* może prowadzić do zmienionego profilu składania pre-mRNA *Mbnl1*, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej produkcji białka MBNL1 zlokalizowanego w jądrze komórkowym. Ten ostatni efekt został potwierdzony przez Doktorantkę eksperymentalnie za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego i analizy z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej. W konsekwencji, zwiększona pula białka MBNL1 zlokalizowana w jądrze komórkowym może prowadzić do zmian w alternatywnym składaniu pre-mRNA, co również zostało zaobserwowane przez Doktorantkę.

W drugiej części badań mgr inż. Marta Sztachera podjęła się opracowania metody identyfikacji białek oddziałujących z wybranym kolistym RNA. Jako główny model eksperymentalny Autorka wybrała circRNA *Cdr1as*. W celu dobrania odpowiednich warunków metody Autorka przetestowała: (a) różną liczbę sond dla danego circRNA, (b) złoże stosowane do analizy typu pull-down, (c) temperaturę hybrydyzacji oraz (d) różną ilość stosowanych sond. Doktorantka wykazała, że opracowana przez nią metoda pozwala na specyficzną izolację badanego circRNA, przy czym nie dla każdego z testowanych circRNA metoda była w pełni skuteczna. W kolejnym etapie potwierdziła, że z wyizolowanym *Cdr1as* oddziałuje białko AGO2, o którym z wcześniejszych prac wiadomo było, że oddziałuje z *Cdr1as*. Ostatecznie na podstawie przeprowadzonych izolacji circRNA *Cdras1* połączonych z analizą proteomiczną Autorka zaproponowała kilka białek, w tym białko PCBP1, jako potencjalne białka wiążące się do badanego circRNA. W następnym etapie Doktorantka wykazała na przykładzie *circDtnb(5,6,7,8)*, że opracowana przez nią metoda może być wykorzystana do identyfikacji miRNA oddziałujących z badanym circRNA.

Rozprawa doktorska została przygotowana w postaci monografii, w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Wstęp został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Przedstawiona do recenzji praca zawiera bogate piśmiennictwo. Autorka głównie wykorzystuje literaturę z ostatnich lat, co podkreśla fakt, że tematyka badań, którą podjęła jest nowa. Doktorantka dołożyła starań aby starannie przygotować rozprawę pod względem edycyjnym. W pracy zauważyłem nieliczne błędy/pomyłki edycyjne. Te nieliczne błędy nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przygotowania rozprawy. Pracę czyta się z przyjemnością i zainteresowaniem. Uważam, że Kandydatka opanowała umiejętność przygotowywania tekstów naukowych w stopniu wyróżniającym.

Rozdział „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badań. Kandydatka przygotowując tę część rozprawy wykazała się znajomością literatury dotyczącej tematyki badań. Autorka bardzo dobrze dobrała poziom szczegółowości przedstawianych informacji.

W rozdziale „Materiały i metody” w dokładny sposób opisane zostały stosowane metody oraz materiały badawcze. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. Zamieszczone w rozprawie liczne schematy procedur i zdjęcia poszczególnych etapów ułatwiają zrozumienie stosowanych metod. Chciałbym podkreślić, że bardzo wysoko oceniam zakres zastosowanych przez Doktorantkę metod badawczych. Autorka swobodnie posługuje się różnymi metodami biologii molekularnej, potrafi twórczo i konsekwentnie rozwiązywać problemy badawcze/techniczne co świadczy o opanowaniu warsztatu badawczego na wysokim poziomie.

W rozdziale „Wyniki” Autorka zaprezentowała wyniki przeprowadzonych badań w sposób ułatwiający ich analizę oraz zasadność wykonania poszczególnych eksperymentów. Autorka bardzo dobrze uzasadnia poszczególne etapy swoich badań. Doktorantka w dojrzały i ciekawy sposób interpretuje rezultaty swojej pracy naukowej w rozdziale „Dyskusja”. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy

są omawiane i analizowane na tle danych literaturowych. Jednocześnie Autorka wykazała się umiejętnością krytycznej oceny wyników swojej pracy opisując dostrzegane ograniczenia wykonanych przez siebie eksperymentów i analiz. Dowodzi to, że mgr inż. Marta Sztachera jest ukształtowanym i świadomym naukowcem zdolnym do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Główne wyniki uzyskane przez Autorkę zostały opisane powyżej. W tym miejscu chciałbym poprosić Autorkę o komentarz do następujących zagadnień:

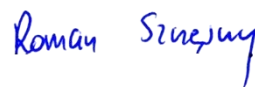
- Ile z białek RBP zidentyfikowanych za pomocą XRNAX to białka mitochondrialne? Wiadomo, że niektóre z mitochondrialnych RBP są utrzymywane w komórce na wysokim poziomie, podobnie mitochondrialny RNA stanowi znaczącą część transkryptomu. Z tego powodu spodziewałbym się identyfikacji tych białek w globalnej analizie XRNAX. Na wykresach wśród podpisanych białek dostrzegłem pojedyncze białka mitochondrialne. Czy w trakcie analizy danych ze spektrometrii mas białka mitochondrialne były odrzucane ze względu na niespełnienie jednego z przyjętych kryteriów? Czy istnieje możliwość, że metoda XRNAX preferencyjnie identyfikuje niemitochondrialne RBP?
- Dlaczego do analizy XRNAX potrzeba aż tak dużo materiału początkowego/wyjściowego? Który z etapów metody należy postrzegać jako etap najbardziej wymagający i skutkujący tym, że wymagana jest tak duża ilość materiału początkowego?
- Czy ekspresja genomów mitochondrialnych i chloroplastowych prowadzi do powstawania kolistego RNA?
- W dyskusji Autorka zwraca uwagę na stosunkowo niewielki zbiór białek RBP zidentyfikowanych przez wszystkie trzy analizowane metody: XRNAX, pCLAP i eRIC. Autorka sugeruje, że różnice wynikają prawdopodobnie z różnic w przygotowaniu tkanki przed sieciowaniem UV oraz strategii izolacji kompleksów RNA-białko. Czy istnieje możliwość, że różnice powstają na etapie analizy za pomocą spektrometrii mas?
- Jaka jest powtarzalność wyników uzyskanych w pull-down *Cdr1as*, który przeprowadzono w czterech powtórzeniach? Jakie jest pokrycie zbiorów białek zidentyfikowanych w poszczególnych powtórzeniach dla analizy przeprowadzonej z wykorzystaniem myszy typu dzikiego?
- Jak wyznaczono podprogową wartość intensywności peptydów (rozdz. 3.24.10)?
- Czy zweryfikowano poziom białka MBNL1 za pomocą western blot w ekstraktach białkowych z mózgu myszy dzikich i *shiverer* (podobnie jak przedstawiono na Ryc. 29C)?
- Na Ryc. 24C i 25C przedstawiono liczby białek z kanonicznymi RBD zidentyfikowanymi w eksperymencie wykorzystującym metodę XRNAX. Jaka jest liczba białek z wymienionymi kanonicznymi RBD, które wykrywane są w mózgu myszy? Czy metoda XRNAX ma preferencje w stosunku do którejś z analizowanych domen RBD?

Osiągnięcia Doktorantki w upowszechnianiu wyników swoich badań oceniam bardzo wysoko. Doktorantka jest pierwszą autorką pracy eksperymentalnej opisującej część wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Praca ta została opublikowana w bardzo dobrym, rozpoznawanym czasopiśmie *Cell Reports*. Doktorantka jest również równorzędną pierwszą autorką artykułu przeglądowego. Ponadto, wyniki swoich badań prezentowała podczas konferencji naukowych w formie prezentacji ustnych i plakatów. Dorobek publikacyjny mgr inż. Marty Sztachery z pewnością zostanie jeszcze rozszerzony o artykuły naukowe opisujące wyniki badań przedstawione w rozprawie.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Marty Sztachery **oceniam pozytywnie i bardzo wysoko**. Podkreślić należy jednoznacznie sprecyzowane cele badawcze, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, odkrycie potencjalnego związku między kolistym RNA powstającym z genu *Mbnl1*, a lokalizacją wewnątrzkomórkową białka MBNL1 oraz zaproponowanie roli zmian w składaniu RNA jako jednej z przyczyn zaburzeń formowania mieliny. Szczególnie doceniam wysiłek Autorki w opracowaniu metod badawczych. Praca mgr inż. Marty Sztachery stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że 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.).

Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Marty Sztachery do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora. Ze względu na opracowanie metod badawczych o wysokim potencjale poznawczym, szereg nowych obserwacji, bardzo dobre przygotowanie rozprawy i jej wartość merytoryczną wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



dr hab. Roman Szczęsny