



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

5 sierpnia 2025, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Sztachery

zatytułowanej

"Charakterystyka białek wiążących RNA oraz oddziaływań kolistych RNA z białkami w mózgu myszy"

Praca doktorska Pana mgr Marty Sztachery została wykonana pod opieką prof. Moniki Piweckiej w Zakładzie Niekodujących RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tematyka pracy doktorskiej dotyczy funkcji cząsteczek RNA oraz oddziałujących z nimi białek w ośrodkowym układzie nerwowym człowieka, czyli zagadnień, które stanowią dominującą linię badawczą zespołu promotorki pracy. Głównym celem pracy jest optymalizacja metod służących do wykrywania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA a białkami w celu uzyskania narzędzi do badania tych oddziaływań w tkance nerwowej, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym.

Wprowadzenie literaturowe zapoznaje czytelnika z najważniejszymi właściwościami białek wiążących RNA oraz ze stanem wiedzy na temat kolistych RNA, szczególnie w kontekście ich występowania w układzie nerwowym. Informacje te są niezbędne dla zrozumienia tematyki biologicznej rozprawy a Doktorantka przedstawiła je w jasny i logiczny sposób. Kolejną częścią wstępu literaturowego jest wyjaśnienie zasad metod badawczych służących do identyfikacji oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA a białkami, które pozwalają na globalne profilowanie oddziaływań. Opis ten stanowi szeroki przekrój dotychczas stosowanych metod, z podkreśleniem ich możliwości oraz ograniczeń i przez to kreśli niezbędne tło dla wyjaśnienia wyboru metod dla celów badawczych podjętych w rozprawie oraz znaczenia udoskonaleń wprowadzonych do nich przez Doktorantkę. Ta część wprowadzenia jest trudniej czytelna, głównie ze względu na dużą liczbę stosowanych skrótowców opisujących liczne, używane dotąd metody. Ogólnie wprowadzenie literaturowe jest bardzo pomocnym wprowadzeniem do tematyki

pracy, a także dobrym wytłumaczeniem metod, które były optymalizowane i następnie stosowane w niniejszej rozprawie.

Badania objęte rozprawą koncentrowały się wokół dwóch głównych problemów. Pierwszym było zaadaptowanie istniejącej metody, używanej poprzednio do analiz proteomu RNA w liniach komórkowych, do analizy oddziaływań RNA-białko w mózgu myszy i sprawdzenie funkcjonalności zoptymalizowanej metody. Drugim natomiast było udoskonalenie metody identyfikacji kolistych RNA oraz ich oddziaływań z białkami oraz z innymi RNA. W ramach pierwszego celu Doktorantka zoptymalizowała metodę XRNAX opartą o ekstrakcję RNA fotoszzytego z białkami, głównie pod względem warunków homogenizacji i sieciowania światłem UV. Następnie zastosowała tę metodę do porównania oddziaływań RNA-białko w mózgach myszy zdrowych oraz myszy z defektem mielinizacji. Spośród zidentyfikowanych białek o innym profilu wiązania do RNA w mózgach myszy zdrowych i chorych Doktorantka m. in. zbadała rolę białka MBNL1 w regulacji alternatywnego splicingu, a także znaczenie występowania izoform liniowych i kolistych mRNA tego białka dla jego lokalizacji subkomórkowej. Ciekawe wnioski wynikały także z porównania zestawu białek zidentyfikowanych jako wiążące RNA w tkance mózgowej przez Doktorantkę z zestawami zidentyfikowanymi uprzednio za pomocą innych metod. Porównanie to wykazało małe nakładanie się uzyskanych wyników, co potwierdza potrzebę badań mających na celu opracowanie nowych metod analizy interaktomów RNA-białko w tkance nerwowej.

W ramach drugiego celu Doktorantka zoptymalizowała procedurę identyfikacji kolistych RNA i związanych z nimi białek. Procedurę tę rozpoczynała od homogenizacji i fotoszzywania próbek w warunkach opracowanych podczas realizacji pierwszego celu rozprawy. Następnie koliste RNA wraz ze związanymi białkami były izolowane za pomocą hybrydyzacji z komplementarnymi oligonukleotydami połączonymi z biotyną. Efektywność tej procedury została zbadana na przykładzie dobrze znanego kolistego RNA Cdr1as, które nie występuje w wersji zlinearyzowanej, a także 4 innych kolistych RNA o znanym występowaniu w tkance nerwowej. Na przykładzie RNA Cdr1as Doktorantka zoptymalizowała procedurę jego izolacji za pomocą komplementarnych oligonukleotydów oraz za pomocą spektrometrii mas zidentyfikowała ponad 60 wiążących się z nim białek. Skuteczność wzbogacania pozostałych czterech RNA tą

metodą była jednak niższa, ponadto metoda nie pozwalała na odróżnienie białek związanych do form kolistych oraz do form liniowych odpowiadających im mRNA.

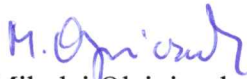
Wśród białek zidentyfikowanych przez Doktorantkę jako wiążące Cdr1as było m.in. białko CELF2, które rozpoznaje motywy sekwencji RNA zawierające urydyny i guanozyny. W trakcie obrony pracy doktorskiej poprosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie jaki jest proponowany mechanizm rozpoznawania RNA przez CELF2, a także za pomocą jakich eksperymentów można by sprawdzić, czy białko to specyficznie rozpoznaje RNA Cdr1as oraz gdzie w sekwencji tego RNA znajduje się jego miejsce wiązania.

Podsumowując, w swojej pracy Doktorantka opracowała metody identyfikacji proteomów związanych z RNA w tkance mózgowej dla dowolnych RNA (w pierwszej części rozprawy) oraz dla kolistych RNA (w drugiej części). Opracowanie tych metod jest ważnym krokiem w stronę poznania znaczenia oddziaływań RNA-białko w ośrodkowym układzie nerwowym. Warto podkreślić, że Doktorantka jest pierwszą autorką publikacji dotyczącej zmian w oddziaływaniach RNA z białkami w mysich mózgach pod wpływem dysmielinizacji (*Cell Reports*, 2025), a także wspólną pierwszą autorką publikacji przeglądowej na temat roli miRNA mir-7 w układzie neuroendokrynowym (*FEBS Lett.*, 2025), które obie dotyczą pracy doktorskiej. Szeroki zakres prac badawczych dotyczących opracowania nowych metod, przeprowadzonych w ramach rozprawy, świadczy o bardzo dobrych zdolnościach eksperymentalnych Doktorantki i Jej dużej pracowitości, a także o ciekawości naukowej i odwadze do podejmowania nowych zagadnień naukowych, czyli o cechach, które będą przydatne na dalszych etapach pracy naukowej.

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 Pani mgr Marty Sztachery do dalszych



etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych. Jednocześnie ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Mikołaj Olejniczak