

Poznań, 12 lutego 2026 r.

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM
Zakład Krystalografii
Wydział Chemii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Martyny Matei - Pluty

zatytułowanej

„Chemical Methods for Stabilizing RNA in Crystallographic Research”

Dynamiczny rozwój biokrystalografii przekłada się na rosnącą liczbę depozytów w strukturalnej bazie danych Protein Data Bank. Sprzyjają temu: wysokoprzepustowa krystalizacja białek, coraz lepsze źródła promieniowania rentgenowskiego, krioprotekcja oraz narzędzia bioinformatyczne. Na tle ogromnego zainteresowania strukturami białek krystalografia kwasów nukleinowych, które w istocie nie są kwasami tylko solami diestrów kwasu fosforowego (V), wygląda dużo skromniej. O ile struktury szeregu 2'-deoksyrybo czyli DNA są częściej badane, to RNA nie ma tylu entuzjastów wśród krystalografów. Dlaczego szereg rybo jest tak mało atrakcyjny? W połowie XX wieku bardziej interesowano się strukturą DNA ze względu na jego znaczenie jako nośnika informacji genetycznej. Wtedy badania włókien DNA prowadzone przez niezrównaną krytalograf - Rosalind Franklin i właściwa interpretacja słynnego zdjęcia nr 51 pozwoliły na zaproponowanie prawidłowej struktury podwójnej helisy B-DNA. Równolegle prowadzone prace przez Watsona, Cricka i Wilkinsa zostały uhonorowane Nagrodą Nobla w 1962, już po śmierci Franklin. Natomiast znaczenie RNA przez długie lata było niedoceniane.

Obecnie wiadomo, że RNA tworzy złożone struktury trójwymiarowe, wykazuje właściwości katalityczne oraz pełni istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Może również działać jako czynnik toksyczny, uczestnicząc w patogenezie wielu chorób

człowieka. Jednocześnie RNA znajduje szerokie zastosowanie w biotechnologii i medycynie - jednym z najbardziej znanych przykładów są szczepionki oparte na mRNA, wykorzystane podczas pandemii COVID-19.

RNA jest zatem kluczową „cząsteczką życia”, zaangażowaną w niemal wszystkie etapy ekspresji genów. Zaburzenia jego struktury i funkcji mogą prowadzić do rozwoju poważnych chorób, co czyni RNA atrakcyjnym i perspektywnym celem badań oraz terapii.

W tym miejscu spodziewalibyśmy się już dużego zainteresowania krystalografów strukturą RNA. Niestety, wbrew oczekiwaniom jest to obiekt badań nielicznych grup naukowych.

Jedną z głównych trudności wynika ze specyficznych cech strukturalnych RNA – cząsteczki o silnie ujemnym ładunku, preferującej wiązanie ligandów zawierających dodatnio naładowane grupy funkcyjne lub kationy metali. Dodatkowym wyzwaniem jest architektura kieszeni wiążących w RNA, odmienna od obserwowanej w białkach – zazwyczaj płytka, polarna i silnie solwatowana. RNA cechuje się także znaczną dynamiką konformacyjną, co może prowadzić do współistnienia różnych struktur tej samej cząsteczki oraz do przegrupowań po związaniu ligandu. Nasza wiedza na temat natury oddziaływań RNA–ligand pozostaje wciąż ograniczona, co potwierdzają dane zgromadzone w Protein Data Bank.

Znajomość trójwymiarowej struktury RNA ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia jego funkcji biologicznych i dynamiki konformacyjnej, a także stanowi podstawę racjonalnego projektowania leków.

Mimo iż krystalografia rentgenowska jest świetną metodą określania struktury RNA o wysokiej rozdzielczości, to proces krystalizacji – szczególnie w przypadku motywów typu spinka – stanowi istotne wyzwanie. W warunkach wysokiego stężenia soli oraz makrocząsteczek, RNA łatwo przyjmuje alternatywne konformacje, co utrudnia uchwycenie jego biologicznie istotnej struktury w uporządkowanej sieci krystalicznej.

Z powyższych powodów zainteresowanie Pani mgr Martyny Matei-Pluty tą tematyką zasługuje na uznanie, a w szczególności praca nad stabilizacją „niesfornego” RNA metodami chemicznymi.

Praca została wykonana w Zakładzie Badań Strukturalnych RNA, kierowanym przez specjalistę w tej tematyce - dr hab. Agnieszki Kiliszek, prof. IChB PAN, która pełni funkcję promotora.

i tworzenia sieci krystalicznej przez cząsteczkę dimeru karbaminianu naftyrydyny (NCD), określenie struktury krystalicznej kompleksów RNA–ligand oraz niezwiązanego RNA należało do zadania trzeciego. W czwartym zaplanowano fizykochemiczną i biochemiczną ocenę stabilizowanego konstruktu RNA z wykorzystaniem denaturacji termicznej RNA monitorowanej spektroskopią UV, pomiary dichroizmu kołowego oraz analizy cięcia RNA *in vitro* z użyciem nukleazy Dicer.

Na 16 stronach rozdziału czwartego (Introduction) Doktorantka bardzo rzeczowo i w oparciu o bogatą literaturę opisuje strukturę krystaliczną i sposoby stabilizacji RNA za pomocą alifatycznych (*n*-dodekan oznaczony jako C12, glikol hexaetylenowy o nazwie komercyjnej Spacer-18) i aromatycznych (pochodne stilbenu, fenantrenu i pirenu) nienukleozydowych łączników. Następnie omawia cząsteczki określane jako ligandy wiążące niesparowane nukleotydy (MBLs, z *ang.* *mismatch binding ligands*), które są obiecującymi związkami chemicznymi do identyfikacji niesparowanych nukleotydów, występujących w strukturach RNA z nadmiernymi powtórzeniami. Ostatni podrozdział Autorka poświęca na zaznajomienie czytelnika z wybranym przez Nią ligandem - dimerem karbaminianu naftyrydyny, oznaczonym skrótem NCD. Ta część rozprawy odzwierciedla szeroką wiedzę Doktorantki i umiejętności syntetycznego opracowania zagadnienia.

W rozdziale piątym (strony 35-59) Autorka przedstawia różnorodną (13 rodzajów), specjalistyczną aparaturę wykorzystaną w czasie realizacji doktoratu, stosowane odczynniki chemiczne i biochemiczne, użyte oligonukleotydy (od T1 do T42), enzymy, roztwory. Wrażenie robi skrupulatny opis przebiegu syntezy 21 łączników i wykonanych analiz chemicznych. Pominę tutaj szczegółowy opis wszystkich etapów, procedur i badań, które są zgodne z przyjętymi protokołami. Skupię się bardziej na przykładowym elemencie, który wymagał inwencji Doktorantki. Wstępne eksperymenty wykazały, że modyfikowane oligonukleotydy RNA były niestabilne. Pani Mateja - Pluta odkryła iż problem ten można rozwiązać, zastępując rybonukleotyd deoksyrybonukleotydami znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie łącznika. Zaprojektowała drugą klasę oligomerów (klasa II) zawierających hybrydowe oligonukleotydy RNA-DNA. Tym razem oligomery złożone były z krótszej sekwencji 5'-GCUGdC-łącznik-dGCUGC-3' (gdzie dC i dG odpowiadają odpowiednio resztom deoksycytozyny i deoksyguanozyny). Długość oligomerów klasy II potwierdziła za pomocą 15% denaturującej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE) i analiz ESI-MS. Rozdział oligomerów metodą PAGE wykazał, że związane oligomery miały oczekiwaną szybkość migracji w porównaniu z linią kontrolną. Po zakończeniu fazy projektowania, zmodyfikowane oligonukleotydy poddano ocenie fizykochemicznej w celu weryfikacji ich właściwości fałdowania i stabilności termodynamicznej. Analizy

te dostarczyły kluczowych informacji na temat tego, które geometrie łączników i składy chemiczne były najbardziej zgodne ze strukturą RNA. Ten rozdział pokazuje Jej bogaty warsztat badawczy i bardzo duże umiejętności Doktorantki w stosowaniu różnorodnych technik.

W rozdziale szóstym (strony 60-93) omawiane są rezultaty badań. Oto niektóre z nich. Na podstawie analizy konformacji cukru C3'-endo i parametrów helikalnych, które odpowiadają typowym wartościom dla A-RNA, Doktorantka prawidłowo rozpoznała formę duplexu RNA. Odchylenia dotyczą wyłącznie terminalnej pary zasad, w której jeden nukleotyd przyjmuje konformację O4'-endo i wykazuje podwyższone wartości czynników B.

Superpozycja z referencyjną strukturą zawierającą trzy powtórzenia CUG (PDB: **3GM7**) dała RMSD 1,095 Å dla atomów szkieletu, potwierdzając wysokie podobieństwo uporządkowanej części helisy. W obszarze łącznika jednoznacznie zidentyfikowano jedynie grupę fosforanową. Podwyższone wartości B w sąsiednich nukleotydach wskazywały na zwiększoną lokalną elastyczność. Nasuwa się pytanie: „Jaki model nieuporządkowania przyjęto podczas udokładniania struktury?”

W celu ograniczenia tworzenia struktur alternatywnych zastosowano strategię kowalencyjnej cyrkularyzacji RNA z użyciem syntetycznych łączników (Spacer-18). Oligomery poddano fosforylacji i ligacji z użyciem ligazy RNA T4, a produkty zweryfikowano metodą MALDI-TOF. Efektywną cyrkularyzację (~50%) uzyskano dla wybranych konstruktów, w tym wariantu ze Spacerem-18. Formy koliste migrowały szybciej w żelu denaturującym, wskazując na bardziej zwartą topologię.

Analiza topnienia za pomocą spektroskopii UV wykazała wzrost stabilności termodynamicznej po cyrkularyzacji (ΔG_{37} +1,22 kcal/mol; T_m +2,1°C). Widma CD potwierdziły zachowanie globalnej struktury drugorzędowej przy niewielkim ograniczeniu dynamiki konformacyjnej.

Referencyjny konstrukt oparty na motywie pętli sarcyna–rycyna (SRL) stabilizowany łącznikiem Spacer-18 krystalizował powtarzalnie i dostarczał danych wysokiej jakości. Struktura zachowuje klasyczną architekturę SRL i wykazuje wysokie podobieństwo do modelu referencyjnego (PDB: **1Q9A**; RMSD 0,8 Å). Rdzeń tworzy helisę typu A z pięcioma parami Watsona–Cricka oraz trzema parami niekanonicznymi. Tetrapętla GAGA zachowuje konserwatywną organizację przestrzenną. Wprowadzenie elastycznego segmentu nie zaburzyło globalnej konformacji motywu.

Funkcjonalność zmodyfikowanych konstruktów oceniono *in vitro* z użyciem ludzkiego enzymu **Dicer**.

Uzyskane wyniki wskazują, że kowalencyjna stabilizacja oraz wprowadzenie motywów funkcjonalnych nie zaburzają globalnej architektury RNA ani jego zdolności do przetwarzania przez Dicer.

W rozdziale siódmym (strony 94 – 97) krótko omówiono najistotniejsze zagadnienia zawarte w dwóch załączonych publikacjach. Pierwszy artykuł pt. *Overview of Methods for Large Scale RNA Synthesis*, który ukazał się w *Applied Sciences* w 2022 roku, przedstawia przegląd metod syntezy RNA na dużą skalę, stosowanych w badaniach strukturalnych, uzupełniony o wyniki badań grupy badawczej prof. Kiliszek oraz o praktyczne zastosowanie dostępnych protokołów. W pierwszej części opisano metody syntezy RNA i omówiono ich zalety i ograniczenia. Następnie przedstawiono implementację tych metod oraz wytyczne dotyczące adaptacji strategii syntezy RNA.

W drugim artykule, pt. *Naphthyridine carbamate dimer ligand induces formation of Z-RNA-like fold of disease-related RNA and exhibits a molecular glue characteristics in crystal lattice formation*, opublikowanym w 2025 roku w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* (MNiSW 200 pkt), gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem, nawiązano do wcześniejszych badań NMR, które wykazały, że dwie cząsteczki NCD wiążą się z 5UGGAA-3/5-UGGAA-3 RNA. Każdy ligand NCD oddziaływał z dwiema resztami guanozyny znajdującymi się na przeciwległych niciach RNA i tworzył niekanoniczne pary guanozyna-naftyrydyna. Aby lepiej wyjaśnić sposób wiązania NCD, autorzy pracy z Doktorantką na czele przeprowadzili rentgenowską analizę strukturalną oligomerów RNA zawierających motyw 5-UGGAA-3/5-UGGAA-3. W niniejszym artykule przedstawiono dwie struktury krystaliczne kompleksu RNA-NCD oraz jedną, dotychczas nieopisaną, strukturę RNA bez ligandu. W modelach kompleksów zaobserwowano dwie cząsteczki NCD związane z wewnętrzną pętlą motywu UGGAA. Sposób wiązania różni się od wcześniej opisanej struktury NMR.

Ta część rozprawy doktorskiej Pani Matei – Pluty zamyka zebrany materiał doświadczalny i uzyskane rezultaty.

W dyskusji wyników (strony 98 - 102) Doktorantka podkreśla, że celem pracy było opracowanie strategii chemicznych umożliwiających zwiększenie stabilności strukturalnej RNA bez naruszania jego natywnej architektury. W tym celu zaprojektowano serię nienukleozydowych łączników kowalencyjnie spinających końce 5' i 3' nici RNA. Związki te są łatwe w syntezie, wysokowydajne i ekonomiczne, co stanowi ich istotną zaletę praktyczną. Najsilniejsze efekty stabilizujące wykazały dwa łączniki aromatyczne: pochodna naftalenowa **3d** oraz pochodna piromelitowa **3a**. Oba związki znacząco zwiększały stabilność termodynamiczną struktur typu spinka i dupleksów. Doktorantka zauważa, że wzrost stabilności nie przełożył się bezpośrednio na sukces w krystalizacji. Sztywność aromatycznych rdzeni wymagała

precyzyjnego dopasowania geometrycznego i sprzyjała powstawaniu alternatywnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Tylko jeden konstrukt (T35 z łącznikiem **3d**) uległ skutecznej cyrkularyzacji z użyciem ligazy RNA T4. W modelu SRL wprowadzenie elastycznego łącznika Spacer-18 wymagało modyfikacji sekwencji (usunięcia urydyny 5'), jednak globalny fałd RNA został zachowany. Co istotne, modyfikacja wpłynęła na sposób upakowania w kryształach – w przeciwieństwie do natywnych struktur SRL (PDB: 1Q9A, 3DVZ), które krystalizowały w tetragonalnej grupie przestrzennej $P4_3$, zmodyfikowany konstrukt krystalizuje w jednoskośnej grupie $C2$, wskazując na reorganizację oddziaływań międzycząsteczkowych.

Porównanie z literaturą pokazuje, że sztywne łączniki aromatyczne były skutecznie stosowane w systemach DNA, jednak RNA – ze względu na większą dynamikę i różnorodność konformacyjną – wykazuje większe wymagania adaptacyjne. Sukces krystalizacji zależy nie tylko od stabilizacji fałdu, lecz także od zachowania równowagi między sztywnością a zdolnością do tworzenia specyficznych kontaktów sieciowych.

Alternatywną strategię stanowiła stabilizacja za pomocą ligandu NCD, który lokalnie reorganizował motyw UGGAA, indukując geometrię podobną do Z-RNA i jednocześnie pełniąc funkcję jak to określiła Pani Mateja-Pluta, „kleju molekularnego”, sprzyjającego tworzeniu uporządkowanej sieci krystalicznej. Wyniki te pokazują, że lokalna stabilizacja oraz promowanie specyficznych kontaktów międzycząsteczkowych mogą być skuteczniejsze niż globalne usztywnienie struktury.

Istotnym aspektem pracy jest również potencjał aplikacyjny opracowanych łączników. Testy z ludzkim enzymem Dicer wykazały, że modyfikacje – w tym wprowadzenie Spacera-18 do pre-miR-21 – nie zaburzały przetwarzania RNA, co wskazuje na zachowanie funkcjonalnej struktury drugorzędowej. W przeciwieństwie do kosztownych i technicznie wymagających modyfikacji nukleozydowych, łączniki nienukleotydowe oferują większą swobodę projektowania i mogą znaleźć zastosowanie w stabilizacji terapeutycznych RNA i ochronie przed degradacją.

Trafne wnioski, poparte odpowiednimi dowodami oraz prowadzenie wielowątkowej dyskusji świadczą o dojrzałości naukowej Kandydatki do stopnia naukowego doktora.

Cele nakreślone przez Doktorantkę na początku rozprawy zostały zrealizowane, co bardzo dobrze przedstawiła w *Podsumowaniu*.

Pod względem edytorskim praca jest wyjątkowo staranna. Niech o tym świadczą nieliczne usterki. W tytule podrozdziału 4.3.1.1 i spisie treści wkradła się tzw. literówka: zamiast „non-nuclosidic” powinno być „non-nucleosidic” (strona 23). W opisie syntez Autorka stosuje np. ml zamiast mL. W podrozdziale 6.3.5

zatytułowanym *Initial Biochemical Studies* na stronie 89 nieco zmieniono nazwisko Pani prof. Anny Kurzyńskiej – Kokorniak.

Pytania, które nasunęły się mi po lekturze tej rozprawy są następujące:

- 1) Czy sprawdzono wpływ długości łącznika na wydajność ligacji?
- 2) Czy możliwa jest degradacja łącznika podczas deprotekcji?
- 3) Jak Dicer inicjuje cięcie w RNA cyrkularyzowanym, skoro klasycznie wymaga wolnego końca 3' ?
- 4) Proszę o wyjaśnienie natury chemicznej oddziaływań między RNA a ligandem. Co kryje się pod sformułowaniem „klej molekularny” ?
- 5) Czy w wyniku procesowania danych otrzymujemy czynniki struktury, jak napisano w rozprawie?
- 6) Dlaczego dla kryształu z układu tetragonalnego parametr sieciowy a nie jest identyczny z parametrem b ? (Suplement drugiej publikacji). Taki podstawowy błąd w pracy opublikowanej w wysokopunktowanym czasopiśmie może się zdarzyć, ale poznając skrupulatność Doktorantki, doszukuję się innej przyczyny.
- 7) Niektóre dane w Tabeli 6 nie zgadzają się z opisem.
- 8) Czym podyktowany jest wybór długości fali stosowanej w pomiarach dyfrakcyjnych?
- 9) Jaki jest obecny status publikacji nr 3 i do jakiego czasopisma została wysłana?

Praca jest merytorycznie dojrzała, logicznie skonstruowana i oparta na szerokim kontekście literaturowym. Autorka wykazuje bardzo dobrą znajomość problematyki chemii i biologii strukturalnej RNA oraz umiejętność krytycznej interpretacji wyników. Szczególnie wartościowe jest zestawienie strategii kowalencyjnych i ligandowych oraz wskazanie ich ograniczeń i potencjału aplikacyjnego. Nieliczne uchybienia redakcyjne nie wpływają na wysoką jakość merytoryczną pracy.

Pani Martyna Mateja – Pluta ma na swoim koncie 5 opublikowanych prac w prestiżowych czasopismach. Przygotowała trzy dalsze manuskrypty. Prezentowała 5 posterów i wygłosiła 6 komunikatów ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w tym na 26th Congress and General Assembly of the Union of Crystallography (IUCr 2023) w Melbourne, Australia (2023). To dowodzi Jej dużej aktywności naukowej.

O randze prowadzonych badań świadczy pozyskanie środków przez Panią

Promotor, dr hab. Agnieszka Ludmiła Kiliszek w ramach dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki. Pierwszy z nich to SONATA BIS 2017/26/E/NZ1/00950 pt. *Opracowanie metodologii umożliwiającej stabilizację RNA w formie spinki do badań krystalograficznych*. Drugi projekt NCN to OPUS23 nr 2022/45/B/NZ7/03543 zatytułowany *Analiza krystalograficzna kompleksów RNA-ligand. W kierunku racjonalnego projektowania cząsteczek wiodących w rozwoju terapii chorób neurodegeneracyjnych*, który jest obecnie realizowany.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny i wagę podejmowanych problemów rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Matei - Pluty zasługuje na **wyróżnienie**. W **uzasadnieniu** chciałabym zwrócić uwagę na następujące aspekty: (i) nowatorskie opracowanie i wykonanie syntez prowadzących do stabilizacji RNA, (ii) praca została przygotowana bardzo starannie i ma bogatą szatę graficzną, (iii) dojrzała dyskusja (iv) uzyskane dane strukturalne mogą służyć w projektowaniu leków.

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 o dopuszczenie Pani mgr **Martyny Matei - Pluty** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną składam wniosek o **wyróżnienie** rozprawy.

E. Bartoszak-Adamska

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM