



dr hab. Magdalena Matecka, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Katedra Chemii Fizycznej
ul. Pomorska 163/165, 90-236 Łódź
e-mail: magdalena.malecka@chemia.uni.lodz.pl
tel.: +48 (42) 635 57 31

Łódź, 12 lutego 2026 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Martyny Matei-Pluty zatytułowanej „*Chemical Methods for Stabilizing RNA in Crystallographic Research*”.

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie na recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z dnia 12 stycznia 2026 roku.

Praca doktorska została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Kiliszek, prof. ICHB, pełniącej rolę promotora. Rozprawa dotyczy opracowania nowych strategii stabilizacji struktur cząsteczek RNA. Tematyka rozprawy jest aktualna gdyż podejmuje wyzwania związane z charakterystyką strukturalną cząsteczek RNA, co jest istotnym elementem w zrozumieniu mechanizmów patogenezы chorób, a w konsekwencji wyłonienia potencjalnych terapeutyków. Poznanie struktury RNA to niezwykle trudne zadanie ze względu na znaczną elastyczność konformacyjną RNA, skłonność łańcuchów oligorybonukleotydowych do przyjmowania alternatywnych struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych i ich podatność na zmiany strukturalne indukowane m.in. warunkami eksperymentalnymi.

Pod względem formalnym rozprawa doktorska została napisana w formie hybrydowej angielskojęzycznej i stanowi dzieło naukowe z niezbędnymi danymi eksperymentalnymi. Rozprawa ma klasyczny układ jest opisana na 121 stronach, zawiera abstrakt, streszczenie w języku polskim i kolejno następujące rozdziały: cel rozprawy, wstęp, opis materiałów i metod oraz opis wyników: syntezy modelowych oligonukleotydów, krystalizacji i analizy struktur krystalicznych. W części wstępnej rozprawy znajduje się spis rysunków, których jest 39 i tabel (8) oraz spis skrótów. Pod względem edytorskim, rozprawa jest napisana starannie, nie zauważyłam błędów edytorskich. Na pochwałę zasługuje szata graficzna pracy. Dodatkowo na kolejnych 42 stronach zamieszczone są dwa artykuły naukowe, w których opublikowano wyniki badań włączone do dysertacji uzyskane przez mgr Martynę Mateję-Plutę. Obydwie publikacje opublikowane zostały w liczących się czasopismach specjalistycznych z listy JCR, *Applied*

Sciences (IF 2,7) i *Nucleic Acids Research* (IF 13,1). Doktorantka zawarła też informację, że kolejny artykuł z jej współautorstwem jest obecnie w recenzji. Rola Doktorantki w tych publikacjach została potwierdzona Jej oświadczeniami oraz oświadczeniami części współautorów, choć nie wszystkich, co nie jest standardową praktyką i wymaga komentarza podczas publicznej obrony. Jednak z oświadczeń promotora wynika, że udział Doktorantki w tych publikacjach był wiodący.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie protokołu syntezy i stabilizacji cząsteczek RNA oraz ich charakterystyka strukturalna. Doktorantka przedstawiła kilka szczegółowych celów, do których należą: (i) zaprojektowanie i synteza serii łącznikowych cząsteczek otrzymanych z piromelitytowych i naftalenowych związków i włączenie ich do oligonukleotydów RNA, tak by osiągnąć stabilizację RNA w formie spinki i dupleksu, (ii) przeprowadzenie krystalizacji i wyznaczenie struktury przestrzennej stabilizowanego RNA oraz określenie wpływu cząsteczek łącznikowych na strukturę RNA, (iii) wyjaśnienie mechanizmu stabilizacji RNA i tworzenia sieci krystalicznej przez cząsteczkę dimeru karbaminianu naftyrydyny (NCD), (iv) ocena parametrów biofizycznych i biochemicznych stabilizowanego konstruktów RNA przy użyciu denaturacji termicznej.

Kolejny rozdział w pracy to wprowadzenie do tematyki badawczej. Doktorantka opisuje kolejno struktury RNA i ich stabilność, podkreśla i podaje przykłady kluczowej roli RNA, nie tylko jako nośnika informacji genetycznej, ale również jako dynamicznego regulatora i katalizatora w podstawowych procesach biologicznych. Wskazuje, że w wielu przypadkach aktywność biologiczna RNA jest determinowana przez trójwymiarową strukturę tej biocząsteczki. Jednak nie jest to łatwe zadanie ze względu na fakt, że krystalizacja cząsteczek RNA mimo wielu prób i różnych warunków krystalizacji nie zawsze (a nawet rzadko, rzadziej niż w przypadku struktur białkowych) kończy się powodzeniem i nie jest możliwe otrzymanie kryształów nadających się do badań dyfrakcyjnych. Doktorantka kolejno opisuje metody stabilizacji RNA poprzez łączniki nienukleozydowe, aromatyczne, pochodne stylbenu, fenantrenu i pirenu oraz ligandy wiążące niesparowane nukleotydy.

Rozdział „Materiały i Metody” podzielony jest na dwie części. W części materiały wyszczególnione są odczynniki, roztwory oraz tabela z sekwencjami RNA wykorzystanymi w pracy i użyta aparatura. Metodyka rozpoczyna się od opisu chromatografii cienkowarstwowej, za pomocą której monitorowano postęp reakcji chemicznych, następnie Doktorantka opisała zasady wykorzystania spektroskopii NMR, wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) z użyciem jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI-MS). W kolejnym podrozdziale opisana została synteza chemiczna łączników aromatycznych (łącznie 21 związków), a następnie automatyczna synteza oligonukleotydów RNA i metody oczyszczania otrzymanych konstruktów. Tutaj wykorzystano technikę elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, elektroelucję RNA oraz strącanie RNA. Omówiono także metodykę transkrypcji *in vitro*,

defosforylacji transkryptów oraz ich cyrkularyzacji. Doktorantka opisała także metody biofizyczne (analiza termo-denaturacji dupleksów RNA oraz analiza dichroizmu kołowego CD) i degradacji enzymem Dicer zastosowane do charakterystyki oligonukleotydów/dupleksów RNA. W kolejnych rozdziałach opisane są procedury krystalograficzne, takie jak: krystalizacja RNA, pomiary dyfrakcyjne, redukcja danych, rozwiązywanie oraz udokładnianie struktury RNA.

W rozdziale „Wyniki” opisane zostały eksperymenty mające na celu przygotowanie stabilizowanych konstruktów RNA poprzez włączenie łączników pochodnych fenantrenu do łańcucha oligonukleotydowego (synteza na stałym nośniku). Doktorantka w pierwszej kolejności zsyntezowała jeden zestaw oligonukleotydów (klasa I) złożony z łańcucha 5'-CUGCUGCUG-3' połączonych odpowiednimi łącznikami z drugim łańcuchem o tej samej sekwencji. Częsteczka referencyjna utworzyła *self*-komplementarny dupleks, natomiast dwa połączone łańcuchy RNA, zawierające łącznik utworzyły strukturę pseudo-spinkową. Po syntezie chemicznej oligomery zostały oczyszczone, a ich czystość i integralność strukturalną oceniono metodą analizy MALDI-TOF. Wyniki wskazały, że większość oligonukleotydów RNA klasy I uległa rozszczepieniu. W obliczu tych problemów Doktorantka zaprojektowała inną grupę oligonukleotydów RNA-DNA (klasa II), gdzie zastąpiła łańcuch rybonukleotydowy deoksyrybonukleotydowym (RNA/DNA) w bliskim sąsiedztwie łącznika. Tym razem oligomery składały się z krótszej sekwencji 5'-GCUGdC-łącznik-dGCUGC-3'. Długości oligomerów klasy II potwierdzono oczyszczając wykorzystaniem elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (PAGE).

Na tym etapie, w mojej ocenie kilka zagadnień wymaga wytłumaczenia. Po pierwsze, dlaczego, zdaniem Doktorantki, konstrukty typu I są chemicznie nietrwale. Poza tym, dobrze byłoby, aby Doktorantka wytłumaczyła interpretację widm masowych przedstawionych na Rysunku 16 i zanalizowała czystość związków ocenianych tą techniką.

Kolejnym zadaniem badawczym realizowanym w ramach tej tematyki było wykrywanie i wyznaczenie struktury przestrzennej stabilizowanego RNA. Doktorantka zaprojektowała i zsyntetyzowała pięć zestawów oligonukleotydów, i dla produktu z pomyślnie przeprowadzonej syntezy przeprowadziła krystalizację. Odpowiednie do badań dyfrakcyjnych kryształy otrzymała tylko dla RNA o sekwencji 5'-CUGCUGCUG-3a-CUGCUGCUG-3'. Pomiary dyfrakcyjne do rozdzielczości 1.5Å zostały wykonane w Hamburgu w ośrodku synchrotronowym DESY na linii pomiarowej P13. Oligonukleotyd T2 krystalizuje w układzie trygonalnym w grupie przestrzennej R32. Mimo, że wspomniana wcześniej rozdzielczość pomiaru była satysfakcjonująca nie udało się dobrze udokładować struktury, końcowe parametry R_{work}/R_{free} wynoszą około 25% i 36%. Przyczynę Doktorantka upatruje w złej jakości kryształów o dużym nieuporządkowaniu struktury krystalicznej. Doktorantka szczegółowo opisała strukturę i porównała jej model

ze strukturą referencyjną zawierającą trzy powtórzenia CUG, które zaczerpnięto ze struktury krystalicznej 3GM7. Parametry obydwu duplexów są porównywalne, nałożenie dwóch struktur dało parametr RMSD wynoszący 1,095 Å. Drugą strukturą krystaliczną opisaną przez Doktorantkę jest struktura spinki RNA oparta na motywie pętli sarcynoworycynowej o sekwencji 5'-AGGACCGGAGCG-S18-UGCUCUAGUACGAG-3' T42, gdzie łącznik S18 umieszczony jest u podstawy trzonu. Rozdzielczość pomiaru obrazu dyfrakcyjnego mieściła się w granicach 1,35-1,27 Å. Struktura krystalizuje w grupie przestrzennej C2 w układzie jednoskośnym. Udokładnienie struktury zakończono przy parametrach R_{work}/R_{free} wynoszących około 15% i 20%. Również ta struktura została porównana z fragmentem 5'-CUC CUA GUA CGA GAG GAC CGG AGU-3' białka 1Q9A i wykazano wysokie podobieństwo z RMSD równym 0,8 Å.

Innym podejściem stabilizacji struktury RNA jest wykorzystanie małocząsteczkowego liganda dimeru karbaminianu naftyrydyny (NCD). Doktorantka wykazała, że wiązanie małocząsteczkowego liganda może stabilizować strukturę RNA poprzez indukowanie lokalnej stabilizacji w pętli UGGAA działając jako „molekularny klej” pomiędzy cząsteczkami związanymi przez symetrię. Jest to inny mechanizm niż w metodach kowalencyjnych.

Ostatni etap pracy dotyczył analizy właściwości fizykochemicznych i biochemicznych otrzymanych konstruktów RNA. Obejmuje on badania denaturacji termicznej z wykorzystaniem spektroskopii UV, pomiary dichroizmu kołowego, a także ocenę cięcia RNA *in vitro* przy użyciu nukleazy Dicer. Doktorantka zastosowała te techniki by ocenić wpływ zastosowanych strategii stabilizacji na zachowanie struktury RNA, jej zdolność do prawidłowego fałdowania oraz aktywność biologiczną.

W mojej ocenie Doktorantka przedstawiła rozprawę doktorską zgodnie ze standardami naukowymi. Korzystając jednak z przywileju bycia recenzentem chciałabym wywołać publiczną dyskusję z Doktorantką w oparciu o kilka zagadnień poruszanych w doktoracie:

1. Biorąc pod uwagę słabe wyniki udokładnienia struktury I, czy przeprowadzała Pani jeszcze jakieś próby udokładnienia, redukcji danych, pomiarów dyfrakcyjnych?
Dla tego kryształu, przy jakiej długości promieniowania był prowadzony pomiar?
2. Jak była przeprowadzana redukcja danych dla obydwu pomiarów i na jakie parametry zwracała Pani uwagę generując zbiór intensywności (programy, metody skalowania itd.)?
3. Zaskakująca jest dla mnie długość fali dla pomiaru kryształu II. W tekście na stronie 81 podaje Pani długość fali 91,7 Å, proszę o komentarz.
4. Czy dane strukturalne zostały już zdeponowane?

5. Dla syntezowanych związków, których synteza jest opisana w rozdziałach 5.2.3.3 – 5.2.3.21 brakuje wzorów strukturalnych/schematów. Byłoby to znaczne ułatwienie w interpretacji. Z kolei synteza łączników przedstawiona jest w innej kolejności niż synteza wyjściowych związków na schemacie 1 (strona 61), co jest prezentowane w innej kolejności niż łączniki przedstawione na rysunku 12.

Podsumowując stwierdzam, że **Doktorantka Martyna Mateja-Pluta** wykazała się wiedzą w tematyce rozprawy, zrealizowała założone cele badawcze i uzyskała oryginalne nowe wyniki naukowe. Ze względu na wysoki poziom merytoryczny i znaczenie rozwiązanego przez Panią Martynę problemu badawczego rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Matei-Pluty zasługuje na wyróżnienie. Przedstawione przez Doktorantkę wyniki wzbogacają opracowanie nowych strategii stabilizacji struktur cząsteczek RNA. Jak ważny i trudny eksperymentalnie problem pokonują badacze zajmujący się tą tematyką obrazuje fakt, ile jest obecnie zdeponowanych struktur w bazie danych białkowych PDB: 9511 struktur RNA a 244275 struktur białkowych.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania 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 o 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.

Signature valid

Dokument podpisany przez
Magdalena Małecka
Data: 2026.02.13 12:38:48 CET



