Dr hab. Magdalena Masłoń
Małopolska Centre of Biotechnology

Magdalena.maslon@uj.edu.pl

20th March 2026

JAGIELLONIAN
UNIWERSITY
IN KRAKÓW

MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Recenzja pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska pt. „*Modulation of endogenous MBNL1 expression via RNA activation (RNAa) as a novel therapeutic approach for myotonic dystrophy type 1 (DM1)*" została wykonana przez Nikolę Musiała-Kierklo pod kierunkiem dr hab. inż., prof. UPP Ewy Stępniak-Koniecznej w Laboratorium Biologii RNA Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest chorobą nerwowo-mięśniową spowodowaną ekspansją powtórzeń trinukleotydowych CTG w regionie 3′ UTR genu *DMPK*. Transkrypty te tworzą struktury typu spinki do włosów, które sekwestrują białka wiążące RNA, w tym MBNL, prowadząc do rozległych zaburzeń splicingu. Obecnie nie istnieje skuteczna terapia DM1. W tym kontekście tematyka rozprawy jest aktualna i klinicznie istotna, co potwierdza publikacja głównego wyniku w czasopiśmie Nucleic Acids Research jako artykułu typu NAR Breakthrough.

Celem pracy było zbadanie, czy zwiększenie poziomu endogennego MBNL1 może stanowić strategię terapeutyczną w DM1. Doktorantka wykorzystała mechanizm aktywacji RNA (RNAa) w celu zwiększenia ekspresji MBNL, celując w transkrypt regulowany przez promotor P2. Zidentyfikowano dwa małe RNA aktywujące (saRNA), które zwiększały poziom białka MBNL1 oraz częściowo odwracały zmiany w alternatywnym splicingu związane z DM1. Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę mechanizmu działania tych cząsteczek, wykazując udział kompleksu AGO oraz rekrutację kompleksów transkrypcyjnych, prowadzącą do zwiększenia ekspresji genu.

Wprowadzenie zawiera obszerny opis dystrofii miotonicznych, w tym jasne porównanie DM1 i DM2, oraz przedstawia kluczową rolę białek MBNL w regulacji alternatywnego splicingu. Omówienie funkcji MBNL, ich izoform oraz mechanizmów kompensacyjnych jest dobrze rozwinięte. Opis patomechanizmu DM1 jest poprawny i łączy defekty molekularne z fenotypem klinicznym. Przegląd aktualnych strategii terapeutycznych jest szeroki i aktualny, a uzasadnienie ukierunkowania na zwiększenie poziomu MBNL1 jest dobrze osadzone w literaturze. Wprowadzenie RNAa jako nowego podejścia terapeutycznego jest adekwatne i jasno przedstawione na poziomie mechanistycznym. Cała sekcja jest napisana w sposób dojrzały i dobrze uporządkowany.

Moim zdaniem mogłaby ona zostać poszerzona o krótkie omówienie regulacji transkrypcji, w szczególności sekwencji regulatorowych, co ma znaczenie w kontekście badanych procesów. Są to jednak sugestie rozszerzenia, a nie istotne braki, gdyż wprowadzenie jest spójne i dobrze opracowane.

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków

JAGIELLONIAN
UNIWERSITY
IN KRAKÓW

MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Część opisująca wyniki została podzielona na dwie części: prace opublikowane oraz wyniki niepublikowane, przedstawione w odrębnych rozdziałach. Wkład doktorantki w publikacje jest jasno określony

Artykuł #1

Nikola Musiała-Kierklo, Patryk Konieczny, Patrycja Plewka, Adam Jasiok, Ewa Stępniak-Konieczna. MBNL proteins in health, disease and theraputic applications [under peer-review]

Przegląd literatury przedstawia kompleksowe omówienie rodziny białek MBNL, w tym porównanie paralogów oraz ich funkcji. Dyskusja dotycząca regulacji splicingu zależnego od MBNL oraz jego zaburzeń w chorobach jest bardzo dobrze przedstawiona, podobnie jak podsumowanie modeli zwierzęcych i fizjologicznej roli tych białek. Praca oparta jest na obszernej bibliografii (259 cytowań), a ryciny są wysokiej jakości i skutecznie ilustrują omawiane zagadnienia. Praca to świadczy to o bardzo szerokiej wiedzy kandydatki w zakresie tematyki pracy.

Artykuł #2

Nikola Musiała-Kierklo, Patrycja Plewka, Adam Jasiok, Ewa Stępniak-Konieczna. Promoter-targeted small RNA duplexes increase MBNL1 transcription and mitigate myotonic dystrophy-associated spliceopathy. Nucleic Acids Research, Volume 53, Issue 15, 28 August 2025, gkaf756, https://doi.org/10.1093/nar/gkaf756

Praca przedstawia wysokiej jakości badania nad możliwością wykorzystaniem RNAa do zwiększenia ekspresji MBNL. W pracy zaprojektowano saRNA oraz wykonano ich szczegółową analizę funkcjonalną i mechanistyczną. Wykorzystano nowoczesne metody eksperymentalne, wykazując aktywację transkrypcji genu *MBNL* oraz identyfikując zaangażowane w tą regulację czynniki transkrypcyjne. Badania w sposób przekonywujący wskazują na potencjał terapeutyczny RNAa w kontekście DM1.

Przeprowadzono różnorodne eksperymenty, obejmujące m.in. metody biochemiczne, mikroskopię, analizę danych z eksperymentów wysokoprzepustowych oraz RNA-FISH, co świadczy o wysokich kompetencjach doktorantki. Istotną zaletą pracy jest są eksperymenty badające mechanizmy aktywacji, w szczególności wykazanie, że zwiększona ekspresja MBNL wynika z aktywacji transkrypcji, a nie z niespecyficznych efektów pośrednich

Uwagi i pytania:

Jest to eleganckie i dobrze umotywowane mechanistycznie badanie. Niemniej jednak kilka kwestii wymaga dalszego doprecyzowania lub dyskusji.

1. W odniesieniu do mechanizmu transportu saRNA do jądra, który - jak rozumiem - pozostaje obecnie niewyjaśniony, jakie dodatkowe eksperymenty mogłyby pogłębić zrozumienie tego procesu?

2. Czy doktorantka mogłaby odnieść się do pytania, jaki poziom indukcji ekspresji byłby wystarczający do uzyskania trwałego efektu terapeutycznego, jak długo utrzymuje się odpowiedź oraz jak często interwencja musiałaby być powtarzana?

3. Kwestia ta została częściowo omówiona, jednak chciałabym prosić o szerszą dyskusję roli chromatyny w aktywacji zależnej od RNAa. Czy aktywujące RNA promują przebudowę nukleosomów i zwiększenie dostępności promotora, czy też polimeraza

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków

JAGIELLONIAN
UNIWERSITY
IN KRAKÓW

MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

RNA II jest już związana z promotorem, a RNAa ułatwia rekrutację dodatkowych kofaktorów transkrypcyjnych? Czy aktywacja promotora P2 może prowadzić również do aktywacji promotora P3?

W **rozdziale 4** przedstawiono dotychczas niepublikowane wyniki; poniżej krótko je podsumowuję oraz przedstawiam uwagi i pytania odnoszące się do tej części pracy.

W Rozdziale 4 doktorantka podejmuje próbę mapowania miejsca startu transkrypcji (TSS) genu MBNL1 z wykorzystaniem metody 5'RACE. Cel tych analiz w kontekście całej rozprawy mógłby zostać wyraźniej sformułowany. Choć można domniemywać, że zrozumienie aktywności promotorów genu jest kluczowe dla racjonalnego projektowania strategii opartych na saRNA, uzasadnienie to powinno zostać przedstawione i lepiej wkomponowane w narrację pracy.

4. Jakie dodatkowe, komplementarne metody można by zastosować, aby uzyskać bardziej precyzyjny i ilościowy obraz wykorzystania miejsc startu transkrypcji (TSS)?

Screening małych dupleksów RNA został przeprowadzony w komórkach mysich, co stanowi uzasadniony i powszechnie stosowany punkt wyjścia.

5. W kontekście rosnącego nacisku na ograniczenie wykorzystania modeli zwierzęcych (np. zalecenia FDA), warto byłoby rozważyć alternatywne systemy badawcze. Czy dostępne są modele bardziej zbliżone do warunków ludzkich, takie jak organoidy lub komórki mięśniowe różnicowane z iPSC, które mogłyby dostarczyć bardziej translacyjnych danych?

Badanie roli AGO1 w mechanizmie RNAa jest technicznie wymagające, szczególnie ze względu na jego kluczowe funkcje komórkowe. W związku z tym, w Rozdziale 4 utrata żywotności komórek w wyniku deplecji AGO1 uniemożliwiła bardziej szczegółową analizę jego roli w RNAa.

6. Choć zastosowane podejście jest zrozumiałe, jakie alternatywne strategie mogłyby umożliwić bardziej kontrolowane badanie funkcji AGO1?

Uwagi ogólne dotyczące struktury pracy:

Choć podział na wyniki opublikowane i nieopublikowane jest zrozumiały z formalnego punktu widzenia, ogólna spójność rozprawy mogłaby zostać poprawiona poprzez bardziej zintegrowaną prezentację wyników. Powiązanie danych nieopublikowanych z opublikowanymi badaniami eksperymentalnymi w głównej części pracy zwiększyłoby czytelność oraz lepiej podkreśliło ciągłość prowadzonych badań.

Ponadto, biorąc pod uwagę centralne znaczenie regulacji transkrypcji w tej pracy, wybrane aspekty mogłyby zostać wprowadzone wcześniej, na przykład już we Wstępie.

Podsumowanie

Rozprawa została dobrze zaprojektowana i rzetelnie wykonana, co zaowocowało publikacjami o wysokiej jakości. W mojej ocenie praca dowodzi, że Nikola posiada solidne kompetencje w zakresie biologii molekularnej oraz głębokie zrozumienie omawianej tematyki. Uważam ponadto, że rozprawa w pełni spełnia kryteria nadania stopnia doktora.

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków

Na zakończenie stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Modulation of endogenous MBNL1 expression via RNA activation (RNAa) as a novel therapeutic approach for myotonic dystrophy type 1 (DM1)" spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.; tekst jednolity: Dz.U. z 2024 r., poz. 1571, z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Nikoli Musiała-Kierklo do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

ENIGMA

Podpisany elektronicznie przez
Magdalena Maria Masłoń
01.04.2026
13:47:28 +02'00'

JAGIELLONIAN
UNIWERSITY
IN KRAKÓW

MALOPOLSKA
CENTRE
OF BIOTECHNOLOGY

Address:
Gronostajowa 7a st.
30-387 Kraków