



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Agaty Jolanty Barszcz

pt: „*Rola białek RBMXL3 oraz DDX53 w regulacji
metabolizmu RNA w komórkach linii płciowej człowieka*”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. n. med. Natalii Rozwadowskiej, prof. IGC. Rozprawa doktorska została przygotowana w formie cyklu publikacji naukowych poprzedzonych syntetycznym opracowaniem w języku polskim. Tematyka pracy koncentruje się na molekularnych mechanizmach regulujących proces spermatogenezy, ze szczególnym uwzględnieniem roli białek wiążących RNA oraz ich potencjalnego znaczenia w patogenezie niepłodności męskiej. Problematyka ta wpisuje się w aktualny nurt badań z zakresu biologii rozrodu i biologii molekularnej, a poznanie funkcji regulatorów potranskrypcyjnych może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów zaburzeń płodności u mężczyzn.

Na dysertację składają się trzy opracowania naukowe:

1. Agata J. Barszcz, Natalia Rozwadowska: “In vitro models for human germ cells and spermatogenesis research: concepts and perspectives” (praca przeglądowa - manuskrypt)

praca przeglądowa stanowiąca podstawę części teoretycznej rozprawy (w przedstawionej dokumentacji nie wskazano jednak, czy maszynopis został przesłany do redakcji czasopisma naukowego, ani jaki jest jego status wydawniczy)

2. Agata J. Barszcz, Katarzyna Tutak, Joanna Zyprych-Walczak, Erik Dassi, Erkut Ilaslan, Małgorzata Dąbrowska, Agnieszka Malcher, Marta Olszewska, Dominik Cysewski, Agnieszka Nadel, Tomasz Kolanowski, Zofia E. Madeja, Michał Hrab, Alexander Yatsenko, Maciej Kurpisz, Zbigniew Warkocki, Natalia Rozwadowska: “Multi-omic screening identifies RBMXL3 as a primate-specific RNA-binding protein and candidate

regulator of RNA metabolism in human spermatogenesis” (praca oryginalna - przyjęta do druku) *Cellular & Molecular Biology Letters* (Springer Nature), 2026. Impact Factor: 9.4 Punkty MNiSW: 100 pkt; doi: 10.1186/s11658-026-00959-z

zaakceptowana do druku publikacja w czasopiśmie naukowym *Cellular & Molecular Biology Letters*

3. Agata J. Barszcz, Katarzyna Tutak, Agnieszka Malcher, Małgorzata Dąbrowska, Joanna Zypych-Walczak, Erik Dassi, Erkut Ilaslan, Marta Olszewska, Dominik Cysewski, Michał Hrab, Tomasz Kolanowski, Alexander Yatsenko, Maciej Kurpisz, Natalia Rozwadowska “The RNA helicase DDX53 (CAGE) contributes to RNA metabolism in a human germ cell model” (praca oryginalna - w trakcie recenzji) bioRxiv doi: 10.64898/2026.02.03.703580

oraz manuskrypt pracy oryginalnej udostępniony na platformie BioRxiv, poddany procesowi recenzowania, jednak bez informacji w jakim czasopiśmie praca podlega recenzji.

Doktorantka jest pierwszym autorem w/w maszynopisów a Jej wkład w ich powstanie, jak wynika z załączonych oświadczeń pozostałych współautorów, był znaczący i obejmował m.in. udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, prowadzenie hodowli komórkowych oraz wykonanie transfekcji i transdukcji, optymalizacja metodologii, przygotowanie materiału badawczego do RT-qPCR i Western Blot, wykonanie barwień immunofluorescencyjnych, analizy bioinformatyczne danych NGS, napisanie oryginalnych wersji publikacji oraz przygotowanie większości załączników i rycin, udział w przygotowywaniu odpowiedzi dla recenzentów w procesie publikacyjnym a także przygotowanie ostatecznej wersji publikacji. Praca doktorska została przygotowana w języku polskim, a integralną jej część stanowią maszynopisy trzech opracowań naukowych.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Opracowanie rozpoczyna się przydatnym wykazem skrótów, po którym zamieszczono wstęp liczący 14 stron, który należy ocenić bardzo pozytywnie. Został on opracowany w sposób logiczny, przejrzysty i napisany poprawnym językiem naukowym. We wstępie rozprawy



Doktorantka przedstawiła szeroki przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego molekularnych mechanizmów regulujących rozwój męskich komórek płciowych i spermatogenezę człowieka. Omówiła kolejne etapy rozwoju linii płciowej – od specyfikacji pierwotnych komórek płciowych, poprzez różnicowanie spermatogonialnych komórek macierzystych, przebieg mejozy i spermiogenezy, aż do powstania dojrzałych plemników. Zwróciła uwagę na wyjątkową złożoność tego procesu, wymagającego precyzyjnej regulacji ekspresji genów, zmian epigenetycznych oraz współdziałania komórek somatycznych jądra. Istotnym elementem wprowadzenia było również omówienie różnic pomiędzy spermatogenezą człowieka a organizmów modelowych, podkreślające potrzebę prowadzenia badań z wykorzystaniem modeli bardziej adekwatnych dla biologii człowieka. Znaczną część wstępu poświęcono zagadnieniom związanym z metabolizmem RNA, który przedstawiono jako jeden z kluczowych mechanizmów regulujących spermatogenezę. Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała procesy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, obejmujące alternatywny splicing, kontrolę długości ogonów poli(A), stabilność i translację mRNA oraz rolę kompleksów rybonukleoproteinowych (mRNP). Przedstawiła także funkcję białek wiążących RNA (RBPs), ich domen funkcjonalnych oraz znaczenie tych białek w kontroli losu transkryptów podczas różnicowania komórek germinalnych. Na podstawie licznych przykładów z literatury wykazała, że zaburzenia funkcji białek RBPs prowadzą do nieprawidłowego przebiegu spermatogenezy i mogą stanowić jedną z przyczyn męskiej niepłodności. Doktorantka, wykazała także wybór linii komórkowej TCam-2 jest adekwatny do planowanych badań. W sposób logiczny i spójny uzasadniła także wybór białek *RBMXL3* i *DDX53* jako przedmiotu badań własnych. Przedstawione informacje świadczą o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz szerokiej wiedzy Doktorantki dotyczącej badanego zagadnienia. Jednocześnie należy zauważyć, że treść wstępu została w znacznej części opracowana na podstawie pierwszej publikacji wchodzącej w skład dysertacji, tj. pracy przeglądowej. W dokumentacji nie podano jednak informacji, czy manuskrypt ten został złożony do czasopisma naukowego, ani jaki jest jego aktualny status wydawniczy. Z punktu widzenia oceny dorobku naukowego stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej informacja ta powinna zostać jednoznacznie przedstawiona.

Po części teoretycznej Autorka formułuje hipotezę badawczą oraz cele rozprawy. W tym miejscu zwracam uwagę na niefortunne sformułowanie, iż „cel został zrealizowany przez...”. Z metodologicznego punktu widzenia to hipoteza badawcza podlega weryfikacji, natomiast cele określają zakres podejmowanych badań prowadzących do jej sprawdzenia.

Cele przedstawiono odrębnie dla każdej z trzech publikacji, przy czym dla dwóch prac oryginalnych sformułowano po pięć bardzo zbliżonych celów badawczych. Z uwagi na niemal identyczny zakres zastosowanych metod oraz podobną koncepcję eksperymentalną bardziej uzasadnione wydawałoby się przedstawienie wspólnych celów dla obu prac, wskazując jedynie różnice wynikające z analizy różnych genów i kodowanych przez nie białek. Obecna forma powoduje wrażenie powtarzalności.

Kolejno następuje omówienie pierwszej publikacji, które zajmuje około 3,5 strony i przedstawia zakres zagadnień poruszonych w pracy przeglądowej (co zostało w dużym zakresie wykorzystane do przygotowania polskojęzycznego wstępu dysertacji doktorskiej). W dalszej części następuje opis wkładu Doktorantki w przygotowanie dwuautorskiego maszynopisu. Opracowanie zostało przygotowane poprawnie i dobrze odzwierciedla zawartość publikacji. Ponownie jednak należy podkreślić brak informacji dotyczącej statusu wydawniczego tego opracowania.

Omówienie drugiej publikacji również liczy około 3,5 strony i koncentruje się głównie na przedstawieniu najważniejszych wyników oraz ich interpretacji. W mojej ocenie część ta jest zbyt skrótowa. Brakuje choćby syntetycznego opisu zastosowanej metodyki czy schematu przedstawiającego przebieg badań, co znacznie ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie kolejnych etapów eksperymentów. Być może wynika to ze sposobu przygotowywania opracowań dysertacji doktorskich przyjętych w Instytucie, aby unikać powtarzania tego co jest w publikacjach, jednak w przypadku prac wieloautorskich i na podstawie wyłącznie deklaracji innych współautorów trudno wywnioskować, czy Doktorantka opanowała metodologicznie przeprowadzone analizy które opisano w artykułach. Przykładowo, z opracowania wynika, że po raz pierwszy zidentyfikowano białko RBMXL3 w męskiej gonadzie. Jednocześnie przez większą część opisu Autorka wskazuje, iż badania prowadzono na linii komórkowej TCam-2. Dopiero lektura właściwej publikacji pozwala stwierdzić, że wykonano również analizy preparatów histologicznych gonad. Informacja ta powinna zostać jednoznacznie przedstawiona już w polskim omówieniu. Bardzo interesujące są wyniki wskazujące, że nadekspresja białka RBMXL3 istotnie ogranicza aktywność retrotranspozonów LINE-1. Proszę o próbę biologicznej interpretacji tego zjawiska. Jakie mechanizmy molekularne mogłyby tłumaczyć obserwowany efekt i czy, zdaniem Doktorantki, wynika on z bezpośredniego oddziaływania RBMXL3 z transkryptami L1, czy raczej z pośredniej regulacji procesu retrotranspozycji? Intrygujące jest także, że w analizie Western blot dla białka RBMXL3 zaobserwowano różnice we wzorze prążków pomiędzy komórkami po transfekcji i transdukcji. W pracy zasugerowano, że może to wynikać z degradacji białka, ale nasuwa się pytanie czy można wykluczyć, że część



obserwowanych prążków wynika z nieswoistego rozpoznawania przez przeciwciała innych białek należących do rodziny RBMXL lub alternatywnych izoform RBMXL3? Jakie eksperymenty pozwoliłyby rozstrzygnąć tę kwestię?

W podsumowaniu drugiej publikacji Autorka stwierdza, że uzyskane wyniki wskazują, iż warianty genetyczne zaburzające funkcję RBMXL3 mogą stanowić przyczynę niepłodności męskiej. Wniosek ten wydaje się zbyt daleko idący, ponieważ w ramach przedstawionych badań nie analizowano wariantów DNA genu *RBMXL3*. Hipoteza ta wynika raczej z wcześniejszych doniesień literaturowych niż z wyników uzyskanych w rozprawie.

Dodatkowe pytania nasuwają się po analizie samej publikacji:

- nie jest jasny sposób doboru grup kontrolnych – w części doświadczeń wykorzystano komórki WT i GFP-FLAG, natomiast w innych jedynie komórki WT;
- metoda Co-IP-MS wydaje się być przeprowadzona tylko w jednym powtórzeniu biologicznym, co wymaga uzasadnienia;
- w większości analiz zastosowano jedynie dwa powtórzenia biologiczne, co ogranicza moc statystyczną badań;
- zastosowano różne wartości progowe dla logarytmicznej krotności zmiany ($|\log FC| > 2$, > 1 oraz $> 0,585$), jednak nie przedstawiono uzasadnienia wyboru tych kryteriów.

Należy również zwrócić uwagę, że publikacja posiada 17 współautorów, natomiast do dokumentacji dołączono jedynie sześć oświadczeń określających udział poszczególnych autorów. Brakuje zatem oświadczeń pozostałych współautorów.

Sposób omówienia trzeciej publikacji jest bardzo zbliżony do poprzedniego artykułu. Również tutaj przedstawiono głównie najważniejsze wyniki, pomijając opis metodyki oraz przebiegu eksperymentów. Z uwagi na bardzo podobny projekt badawczy (oba oryginalne maszynopisy mają prawie identyczny układ, zastosowane są te same metody, sposób prezentacji wyników – wykresy, ryciny są bardzo zbliżone) powtarzają się także te same wątpliwości dotyczące liczby powtórzeń biologicznych, doboru grup kontrolnych oraz zastosowanych kryteriów analizy danych. Uwagę zwracają wyniki dotyczące lokalizacji subkomórkowej białka DDX53 oraz próba weryfikacji jego potencjalnych oddziaływań z DNA metodą ChIP-seq. Autorka wykazała, że DDX53 lokalizuje się przede wszystkim w cytoplazmie komórek TCam-2, natomiast jedynie niewielka jego frakcja (około 11%) występuje w jądrze komórkowym. Jednocześnie przeprowadzona analiza ChIP-seq nie wykazała istotnego wzbogacenia sekwencji DNA, mimo że wcześniejsze publikacje sugerowały możliwość wiązania DDX53 z regionami promotorowymi genów. Wyniki te

wydają się spójne z dominującą cytoplazmatyczną lokalizacją badanego białka i wskazują raczej na jego udział w procesach potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów niż na bezpośrednią regulację transkrypcji. Nasuwa się pytanie jak Doktorantka interpretuje brak sygnału w analizie ChIP-seq w kontekście dominującej cytoplazmatycznej lokalizacji białka DDX53? Czy, zdaniem Doktorantki wyniki te przemawiają za tym, że DDX53 nie jest bezpośrednim białkiem wiążącym chromatynę, a wcześniejsze dodatnie wyniki ChIP mogły wynikać z pośrednich oddziaływań z kompleksami białko–DNA lub ograniczeń metodologicznych? W jakich warunkach biologicznych 11% jądrowej frakcji DDX53 mogłoby być wystarczające do pełnienia funkcji regulatorowej w jądrze komórkowym? Pewne zastrzeżenia budzi także sformułowanie zawarte w podsumowaniu, w którym Autorka stwierdza, że zaburzenia genetyczne genu *DDX53* mogą prowadzić do niepłodności męskiej. Podobnie jak w przypadku *RBMXL3*, w przedstawionych badaniach nie analizowano wariantów genetycznych tego genu, dlatego wniosek ten wykracza poza zakres uzyskanych wyników. Publikacja została przygotowana przez 14 autorów, natomiast dokumentacja zawiera jedynie sześć oświadczeń współautorów.

Po omówieniu publikacji zamieszczono rozdział zatytułowany „Wnioski”, który w mojej ocenie trafniej należałoby określić jako „Podsumowanie i wnioski”, gdyż zawiera zarówno syntetyczne omówienie uzyskanych rezultatów, jak i końcowe konkluzje wynikające z całego cyklu badań.

Na końcu rozprawy umieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim. Ich lokalizacja jest dość nietypowa, gdyż zwyczajowo zamieszcza się je na początku dysertacji. Rozprawę kończy bibliografia obejmująca 172 pozycje literaturowe, z których blisko połowa pochodzi z ostatnich sześciu lat, co świadczy o wykorzystaniu aktualnego piśmiennictwa. W końcowej części dokumentacji zamieszczono oświadczenia współautorów publikacji. Zwraca jednak uwagę fakt, że nie obejmują one wszystkich autorów prac wieloautorских, co wymaga wyjaśnienia w kontekście wymagań formalnych dotyczących rozpraw doktorskich opartych na cyklu publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy zrealizowano za pomocą odpowiednio dobranych metod badawczych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poznanie molekularnych podstaw rozwoju męskich komórek płciowych i spermatogenezy człowieka poprzez identyfikację sieci oddziaływań dla białek *RBMXL3* i *DDX53*. Do niewątpliwych atutów rozprawy należy zaliczyć wielopoziomą strategię badawczą, obejmującą m.in. wysokoprzepustowe analizy genomiczne i proteomiczne, barwienia immunohistochemiczne oraz zaawansowane analizy bioinformatyczne. Tak szeroki



zakres metod umożliwia wielowymiarową interpretację wyników i istotnie zwiększa wartość poznawczą pracy. Podsumowując, rozprawa stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, które w istotny sposób poszerza wiedzę na temat roli białek wiążących RNA w kontekście rozwoju męskich komórek płciowych człowieka. Pomimo wskazanych ograniczeń w niniejszym opracowaniu, całość pracy spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim i stanowi solidną podstawę do dalszych, bardziej ukierunkowanych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt.: „*Rola białek RBMXL3 oraz DDX53 w regulacji metabolizmu RNA w komórkach linii płciowej człowieka*” autorstwa Pani mgr Agaty Jolanty Barszcz spełnia wszystkie wymogi formalne określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Agaty Jolanty Barszcz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Poznań, dn. 9 lipca 2026r.

prof. dr hab. Joanna Nowacka-Woszuk