



Wrocław, 24 maja 2023

Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Marcin Drąg
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Adama Mamota

z Zakładu Biofizyki
Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

**pt. „Synteza podwójnie znakowanego oraz kolistego RNA: narzędzia do
bioobrazowania i terapii genowej”**

Badania kwasów nukleinowych stanowią obecnie jeden z głównych kierunków badawczych w wielu laboratoriach akademickich, a także w firmach biotechnologicznych czy farmaceutycznych. Wpływ na to ma intensywny w ostatnich latach rozwój terapii genowych, jak również sukces w pokonaniu pandemii COVID-19 przy dużym udziale technologii mRNA. Niemniej, nadal potrzebne są nowe technologie i udoskonalenia w tym zakresie, a przedstawiona do oceny praca doktorska wykonana przez mgra Adama Mamota doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy.

Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Jacka Jemielitego z Laboratorium Chemii Biologicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, który specjalizuje się w tego typu badaniach i śmiało można stwierdzić, iż w wielu aspektach jest światowym liderem.

Głównym celem pracy Doktoranta było opracowanie metod umożliwiających na selektywną modyfikację chemicznej struktury końców 5' oraz 3' RNA, ustalenie wpływu modyfikacji (funkcjonalizacja lub cyklizacja) RNA na jego właściwości biochemiczne, biofizyczne i biologiczne oraz otrzymanie i zastosowanie modyfikowanego RNA jako sond molekularnych czy nośników terapeutycznej informacji genetycznej. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie coraz liczniejszych doniesień literaturowych o kluczowej, acz dalej nie do końca zrozumiałej i wyjaśnionej roli tych układów w rozwoju wielu chorób uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 (71) 320 4526
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

Analiza pracy doktorskiej Doktoranta oraz bazy Pubmed wskazuje, iż jego dorobek badawczy stanowią trzy prace w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W dwóch z nich (Nucleic Acid Research, 2022 oraz Angewandte Chemie International Edition, 2017) Doktorant jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jego wkład w prowadzone badania. Należy także podkreślić, iż obydwie czasopisma należą do topowych w swoich dziedzinach. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej znajduje się także informacja, iż jej wyniki są przedmiotem międzynarodowego zgłoszenia patentowego. Tym samym, powyższy dorobek naukowy oceniam bardzo wysoko, zwłaszcza w aspekcie publikacji w czasopismach wiodących dla dziedziny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 171 stron i ma klasyczny układ. W pierwszej części będącej wstępem teoretycznym mgr Mamot w sposób wyczerpujący przedstawia zagadnienia będące przedmiotem postawienia hipotezy badawczej. Dokładnie opisuje budowę oraz zależności w badaniach oraz modyfikacjach RNA, terapii genowych jak również znane metody uzyskiwania sond molekularnych służących do obrazowania. Wstęp czyta się bardzo dobrze i dostarcza on wszystkich niezbędnych informacji. Cytowana literatura została poprawnie dobrana, a dużą jej część stanowią oryginalne prace źródłowe. Całkowita liczba cytowań literaturowych oraz źródeł internetowych w pracy jest imponująca i wynosi 221. Z całą pewnością wstęp jest materiałem do napisania pracy przeglądowej w tej tematyce, a zważając na obecnie intensywne badania w tym zakresie wielu grup badawczych, taka praca ma szansę spotkać się z dużym zainteresowaniem. Co więcej, należy dodać, iż wszystkie ryciny i rysunki zostały wykonane z najwyższą starannością i są w pełni informatywne.

Następnie, na jednej stronie mgr Adam Mamot przedstawił cele swojej pracy mające prowadzić do udowodnienia postawionej hipotezy badawczej. Ta część pracy jest również zobrazowana stosownym schematem.

W kolejnym rozdziale Doktorant w sposób dojrzały opisuje wyniki swoich badań, a także prowadzi dyskusję porównawczą w aspekcie już opublikowanych wyników. Analiza tego rozdziału pozwala z całą pewnością stwierdzić, iż dysertacja zawiera wiele wyników o wysokiej wartości naukowej i na bardzo dobrym poziomie merytorycznym. Wiele wyników ma zdecydowanie nowatorski charakter i otwiera całkowicie nowe kierunki badawcze. Niezwykle szeroki wachlarz zastosowanych metod eksperymentalnych dowodzi, iż mgr Adam Mamot opanował wiele różnych technik badawczych, a także potrafił ich użyć do osiągnięcia zaplanowanych celów badawczych. Należy tutaj podkreślić, iż praca ma charakter wybitnie interdyscyplinarny.

Moja uwaga dotyczy tutaj opisanego „efektu kotwiczenia”, a w szczególności do

fragmentu – „W układach RP-HPLC można zaobserwować zjawisko analogicznie jak w trakcie elektroforezy kwasów nukleinowych: zwiększenie stopnia polimeryzacji powoduje zmniejszenie szybkości migracji w układzie chromatograficznym. W konsekwencji cząsteczki RNA o większej masie molowej mają dłuższe czasy retencji. Na tej podstawie można by sformułować hipotezę, iż wydłużenie czasu retencji znakowanego RNA jest spowodowane zwiększeniem masy molowej, które towarzyszy przyłączeniu reszty barwnika.” - nie do końca mogę się zgodzić, iż jest to nowa i nieoczekiwana obserwacja. W mojej wieloletniej praktyce na czas retencji w przeważającym stopniu wpływ ma właśnie hydrofobowość analizowanej cząsteczki. Tym samym te najbardziej hydrofilowe są „wymywane” jako pierwsze, a te najbardziej hydrofobowe jako ostatnie. Niewielki wpływ ma tutaj rozmiar cząsteczki (oczywiście uwzględniając zastosowanie odpowiednich kolumn). Prosiłbym Doktoranta o komentarz w tej kwestii.

Kolejne moje pytanie dotyczy eksperymentów wykonywanych *in vivo* w danio pręgowanym. Opisane wyniki dotyczą tylko obrazowania w stadium zarodkowym. Zważając, iż obecnie jedną z głównych wytycznych przy tworzeniu, walidacji i zastosowaniu w bioobrazowaniu nowych sond jest parametr ich stabilności w układzie biologicznym, to w analizie opisanego eksperymentu rodzi się pytanie. Dlaczego eksperymentu nie prowadzono do uzyskania stadium dorosłej ryby? Umożliwiłoby to uzyskanie odpowiedzi w aspekcie całkowitej stabilności uzyskanej sondy, a także możliwości jej zastosowania w długoterminowych badaniach typu *in vivo*. Poproszę o komentarz.

W rozdziale Procedury doświadczalne mgr Mamot z niezwykłą precyzją opisuje wszystkie założenia eksperymentalne. Należy podkreślić, iż wszystkie eksperymenty są przedstawione w taki sposób, iż ich powtórzenie przez niezależnego badacza, wyłącznie na podstawie opisów w pracy, nie byłoby problemem. W opisie widać niezwykłą staranność w ich planowaniu, wykonaniu oraz późniejszej analizie. Jest to wzorcowy opis eksperymentalny.

Podsumowując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magistra Adama Mamota uważam:

1. zoptymalizowanie metoda PORA jest pierwszą co pozwala na bezpośrednią, wydajną i selektywną modyfikację końca 3' wielkocząsteczkowego RNA.
2. Opracowanie modyfikacji końca 5' za pomocą metody chemoenzymatycznej, będącej kombinacją transkrypcji *in vitro* (IVT) oraz reakcji SPAAC.
3. Opracowano metody podwójnego znakowania RNA, która umożliwia regioselektywne wprowadzenie różnych znaczników w obrębie końców 5' oraz 3'.

4. Przy wykorzystaniu powyższych odkryć, otrzymanie szeregu sond molekularnych i zademonstrowanie ich zastosowania w bioobrazowaniu.
5. Opracowanie metody cyklizacji cząsteczek RNA zawierających grupę 5'-EDA z zastosowaniem zoptymalizowanej metody PORA.

Reasumując wartość merytoryczną przedstawionej pracy doktorskiej, można zdecydowanie stwierdzić, iż otrzymane wyniki mają znamiona odkrycia naukowego, a przedstawiony w pracy materiał badawczy z pewnością ma szansę na kolejne publikacje w czasopiśmie o dużym współczynniku oddziaływania, a także bardzo duży potencjał komercjalizacyjny.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgra Adamam Mamota została przygotowana w niezwykle staranny sposób. Zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo wysoki poziom przygotowania oraz przedstawienia wszystkich rycin i rysunków w ocenianej pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magistra Adama Mamota z Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod tytułem „Synteza podwójnie znakowanego oraz kolistego RNA: narzędzia do bioobrazowania i terapii genowej” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorant w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, bardzo dobry dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg

