



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 28 maja 2023 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Adama Mamota pt. „Synteza podwójnie
znakowanego oraz kolistego RNA: narzędzia do bioobrazowania i terapii genowej”**

Badania naukowe są niewątpliwie bardzo satysfakcjonującym zajęciem, ale przede wszystkim stanowią fundament naszego postępu jako społeczeństwa. Inwestujemy czas, energię i zasoby w prowadzenie eksperymentów licząc na to, że przynoszą nam nowe odkrycia i innowacyjne rozwiązania. Dążymy do tego, aby nie tylko ułatwić sobie życie codzienne, ale móc także skutecznie zapobiegać wielu niebezpiecznym chorobom. Z ogromną nadzieją wsłuchujemy się więc w informacje medialne o stosunkowo niedawnym odkryciu i zaprezentowaniu wyników II fazy badań nad szczepionką onkologiczną opartą na platformie mRNA. To stwarza nadzieję nie tylko dla pacjentów z zaawansowanymi postaciami czerniaka, ale można przypuszczać, że technologia szczepionek mRNA ma potencjał do wykorzystania jako narzędzie w leczeniu innych rodzajów nowotworów. Ta technologia już udowodniła swoją skuteczność poprzez opracowanie szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, która znacznie przyczyniła się również do zmniejszenia obaw związanych z jej stosowaniem.

Cykl badań wykonanych przez Pana mgr. Adama Mamota oraz zaprezentowanych w ramach Jego rozprawy doktorskiej jest ściśle związany z tym właśnie obszarem. Celem Jego pracy było opracowanie możliwie prostych i skutecznych (w stosunku do już istniejących)

metod znakowania oraz cyklizacji RNA tak, aby mogły pełnić jednocześnie rolę narzędzi do wizualizacji procesów dostarczania, ekspresji i degradacji RNA w organizmach, nie tracąc przy tym funkcji nośników terapeutycznych dla informacji genetycznej. Znaczny potencjał aplikacyjny przedłożonej pracy stanowi, że podjęta przez Pana magistra tematyka badań jest w mojej opinii opracowaniem interesującym oraz niezwykle ważnym.

Praca doktorska została przygotowana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w grupie badawczej prof. dr. hab. Jacka Jemiletego, którego zespół naukowy od lat z dużymi sukcesami specjalizuje się w modyfikacjach mRNA. Doktorant zdobywał doświadczenie badawcze poprzez udział w licznych projektach współfinansowanych przez Unię Europejską: Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „TEAM” (TEAM POIR.040400-00-20A2/16) i „START” (START 044.2022) oraz w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój „DESCARTES”. Rezultaty tych badań ukazały się w trzech publikacjach naukowych oraz jednym zgłoszeniu patentowym. Doktorant prowadził swoje badania naukowe w oparciu o syntezy chemiczne wykorzystując dalej techniki spektrometrii mas, fluorescencji i chromatografii. Rezultaty swoich badań publikował w okresie od 2017 do 2022 roku. Prace te cechują się wysokimi wskaźnikami oddziaływania. Czasopismo *Angewandte Chemie-International Edition* (IF 12,102), *Chemistry – A European Journal* (IF 5.236) oraz *Nucleic Acids Research* (IF 19,16) - indeksowane odpowiednio dla różnych lat przyjęcia ich do druku.

Praca doktorska została zredagowana w języku polskim na 171 stronach maszynopisu i przyjęto w niej typowy układ charakterystyczny dla prac doświadczalnych. Po streszczeniu (przygotowanym zgodnie z wymogami formalnymi w języku polskim i angielskim) oraz spisie treści, Autor zamieścił również wykaz używanych skrótów i symboli, co znacząco ułatwia lekturę tekstu. Część pierwsza, zatytułowana "Stan wiedzy i techniki", stanowi syntetyczne wprowadzenie do podstawowych zagadnień biofizyki kwasów rybonukleinowych. Autor, szczególną uwagę poświęca ich właściwościom, funkcjom oraz metodom służącym monitorowaniu wybranych procesów biologicznych, w których zaangażowana jest struktura obydwu końców mRNA. Omawiane są również znakowanie fluorescencyjne, znane strategie syntezy nukleotydów znakowanych w różnych pozycjach, a także wykorzystanie bioobrazowania i markerów molekularnych. Ten niezwykle obszerny materiał publikacyjny, którego streszczenie przedstawił Pan magister Mamot, jest prezentowany w sposób

systematyczny, za pomocą przejrzystych i starannie opracowanych grafik. Dalej, w ramach krótkiego podrozdziału części II swojej rozprawy doktorskiej pt. "Cele badań" Doktorant przedstawił główny cel pracy, który zakłada opracowanie metod selektywnej modyfikacji chemicznej końców 5' i 3' RNA. Ponadto, zestawiał dodatkowe wyzwania badawcze, które obejmują analizę mobilności chromatograficznej, elektroforetycznej oraz właściwości fluorescencyjne nowoutworzonych struktur.

Kolejne kroki eksperymentalne Pana magistra służące osiągnięciu celu polegały na użyciu metody określonej w pracy skrótem PORA (opierającej się na rozszczepieniu 2',3'-diolu rybozy i aminowaniu redukcyjnym). Co podkreślił, metoda umożliwiła mu prowadzenie reakcji na niemodyfikowanym RNA, wykorzystując naturalne elementy jego struktury. Za cel modyfikacji, Pan magister obrał 5'-monofosforan guanozyny (GMP) z uwagi na pożądane właściwości, tego związku takie jak: rozpuszczalność w wodzie i właściwości chromatograficzne. Przebieg aminowania redukcyjnego był badany przy użyciu metod spektroskopii masowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej analizując różne czynniki, takie jak struktura N-nukleofila, stężenie reduktora i pH. Stwierdził On, iż GMP-dial najskuteczniej przechodził przemianę w zamierzony produkt z etylenodiaminą, co skłoniło też Pana magistra do zbadania analogów tej ostatniej z wykorzystaniem 5'-monofosforanu triurydyny. W wyniku tych skrupulatnych badań opracowano kompleksowy protokół znakowania fluorescencyjnego końca 3' RNA charakteryzujący się wysoką efektywnością procesu na poziomie kilkudziesięciu procent. Badania prowadzono początkowo dla krótkich odcinków kwasów, a po optymalizacji procesu (takich jak temperatura, pH, czas aminowania redukcyjnego, określeniu stałej szybkości reakcji, mobilności elektroforetycznej) rozszerzono je o modyfikacje wielocząsteczkowych mRNA (w zakresie do 2000 nukleotydów).

Dalsze wysiłki badawcze Pana Mamota polegały na modyfikacji końca 5' kwasu. W tym celu zastosował odpowiednie analogi substratów polimerazy, które pełniły rolę inicjatorów transkrypcji. Podczas tego procesu, polimeraza wykorzystuje analog jako pierwszy nukleotyd transkrybowany, co skutkuje selektywną modyfikacją końca 5' nowo powstałego RNA. Zsyntetyzowane zostały nowe inicjatory na bazie par zasad AG umożliwiające wprowadzenie grupy azydkowej, odpowiedniej do przeprowadzenia później znakowania fluoroforem. Wprowadzenie grupy azydkowej zostało osiągnięte poprzez reakcję SPAAC (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition).

Pan Mamot połączył procedury modyfikacji i znakowania końców 5' i 3' RNA, umożliwiając przeprowadzenie obu reakcji w jednym naczyniu i otwierając tym samym nowe perspektywy w badaniach biologii molekularnej. Prowadził znakowanie obu końców różnymi barwnikami, na przykład Cy3/Cy5, Cy5/Biotyna oraz Cy5/karboksyfluoresceina (FAM) należącymi do różnych obszarów spektralnych. Procedury oczyszczania tak wyznakowanych nici metodą HPLC pozwoliły mu wysunąć hipotezę dotyczącą efektu kotwiczenia. Mimo swej intensywnej pracy nad syntezą chemiczną związków, mgr Mamot znalazł czas na wykonanie eksperymentów spektroskopowych, które wzbogaciły Jego badania. Starannie przemyślana strategia oparta na stosowaniu par znaczników fluorescencyjnych w zależności od pożądaných informacji, otworzyła drogę do uzyskiwania bardzo precyzyjnych wyników dotyczących sond środowiskowych czułych na zmiany pH, temperaturę topnienia nici, odległości końców 5' - 3' oraz czułych na działanie enzymów.

Stosując parę znaczników niebezpośrednio zależnych - FAM oraz Cy5 uzyskał ok. 100 krotną rozpiętość skali intensywności tego pierwszego towarzyszącą zmianom pH środowiska od 3 do 8.

Do oddziaływań interaktywnych Pan magister stosował fluorofory Cy3 oraz Cy5, które posłużyły mu w badaniach struktury i właściwości RNA. Przy ich użyciu wyznaczał tzw. parametr bliskości (B), którego wartość jest odwrotnie skorelowana z odległością pomiędzy wspomnianymi barwnikami. Przyznam, że nie spotkałem się z takim opisem układu badanego i w moim odczuciu lepiej byłoby wyznaczyć tzw. R_0 oraz pozostać przy czynniku wartości wydajności transferu energii typu försterowskiego, tym bardziej, że dalej Autor odnosi wprowadzony parametr B do orientacyjnej odległości końców 3' i 5' RNA wyrażonej w nm . Pan Mamot zbadał przedziały zmian parametru B w funkcji temperatury oraz rodzaju roztworu, w którym zawieszał RNA. Na tej podstawie wnioskował o warunkach dla stabilnych postaci nici i przesunięciu ich temperatur topnienia.

Pan Mamot przeprowadził obszerne badania monitorujące efektywność i kinetykę działania egzo- i endo-nukleaz. Na podstawie zaniku fluorescencji akceptora skorelowanej z jednoczesnym wzrostem intensywności emisji donora opisywał odłączanie 7-metyloguanozyny bądź powstawanie 5' monofosforanów nukleozydów. Kolejne kroki badawcze dotyczyły obrazowania sond fluorescencyjnych w układach biologicznych takich jak:

lizaty komórkowe, komórki oraz w komórki w środowisku *in vivo*. Obrazowanie prowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Badania wskazywały na to, że mRNA dostarczane do wnętrza komórek występuje w ich wnętrzu w postaci skupisk. Wg Autora jest to rezultat sposobu dostarczania materiału (lipofekcji) oraz tworzenia endosomów. Mikroinjekcje znakowanego mRNA do komórek danio pręgowanego pozwoliły na dalsze badania podziału materiału pomiędzy komórki potomne.

Pan Magister, we współpracy z innymi badaczami, opracował metodę cyklizacji cząsteczek RNA. Jej kluczowym atutem jest dominacja formy cyklicznej nad liniową, co wynika z eliminacji zakończeń, które mogłyby być podatne na działanie egzonukleaz. Takie podejście przyczynia się do zwiększenia ekspresji terapeutycznej informacji genetycznej. Tak przygotowane cykliczne analogi RNA były następnie izolowane i analizowane za pomocą różnorodnych technik, takich jak chromatografia oraz elektroforeza.

Warto zauważyć, że Doktorant zdawał sobie sprawę z ograniczeń wynikających z przeprowadzonego zestawu badań i uzyskiwanych w ten sposób wyników. Klarownie wyraził swoje wątpliwości w rozdziale 5, zatytułowanym "Podsumowanie i wnioski".

Procedury syntez chemicznych zostały przedstawione w części III rozprawy. Doktorant wykazał się otwartością na współpracę naukową, co znalazło odzwierciedlenie w przeprowadzeniu części eksperymentów we współpracy z innymi badaczami. Ta kooperacja świadczy o Jego gotowości do nawiązywania partnerstw w celu osiągnięcia wyznaczonych celów badawczych.

Na podkreślenie zasługuje ponadto bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy. Mogłbym zaproponować jedynie kilka poprawek:

- Str. 45, bezpromienisty w miejsce bez promienisty,
- Str. 52, rys. 2.3.3 w miejsce 3.2.3,
- Str. 80, „zwiększono” w miejsce „zwieszono”,
- Str. 103, „bezwzględnych odległości” w miejsce „bezwzględnych odległość”,
- Str. 106, „Cy5-RNA02-Cy3 i Cy5-ArcaRNA02-Cy3” w miejsce „Cy5-RNA02-Cy3 lub Cy5-ArcaRNA02-Cy3”,

- Str. 106, 108 oraz 110, rys 3.1.4, 3.1.5 oraz 3.1.6, Sugeruję zamianę kolorów dla schematycznych położeń znaczników fluorescencyjnych. W obecnej postaci tych rysunków transfer energii zachodzi od barwnika „czerwonego” do „niebieskiego”,
- Str. 134, „na drodze” w miejsce „ na drodze”,
- Str. 135, „sondy” w miejsce „sądy”,

Przedstawione w rozprawie wyniki dostarczają niewątpliwie interesujących informacji. Chciałbym jednak zachęcić Doktoranta do refleksji nad poniższymi kwestiami, aby mógł wyrazić swoje poglądy oparte na zdobytych już doświadczeniach podczas pracy nad rozprawą:

1. Czy warto zawsze skupiać się na maksymalnej wydajności znakowania RNA, biorąc pod uwagę rosnące zastosowanie różnorodnych technik badawczych operujących na poziomie pojedynczych cząsteczek? Czy mając świadomość tych postępów nie byłoby bardziej korzystnym przesunąć również znakowanie barwnikami ku emisji w spektralnym obszarze czerwieni? Jakie zalety i wady zastosowania takiego podejścia widzi Pan magister?
2. Czy Pan magister rozważał wykorzystanie w swoich badaniach technik fluorescencji czasowo-rozdzielczej oraz, czy wybór barwników Cy3, FAM, pHrodo i Cy5 był podyktowany określonym wymogiem chemicznym? Istnieje możliwość skorzystania z innych barwników, które mają znacznie dłuższy czas życia fluorescencji, co umożliwiłoby obserwację barwnika (wraz ze znakowanym RNA) bez zakłóceń spowodowanych np. autofluorescencją komórek. Poprzez obserwację sygnałów tylko długożyciowych np. powyżej 2-4 ns (typowe wartości mierzone dla wyżej wymienionych barwników) można wyeliminować efekt tła autofluorescencyjnego.

W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone ustawą z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Adama Mamota do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Podsumowując, chciałbym zaznaczyć, iż Pan magister przedstawił wartościową rozprawę doktorską, opartą na wynikach precyzyjnie zaplanowanych badań

eksperymentalnych. Prace te wymagały wszechstronnej znajomości różnych podejść metodologicznych. Rozprawa doktorska opiera się na oryginalnych wynikach i analizach, które zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych, oraz jednym międzynarodowym zgłoszeniu patentowym, co jednoznacznie świadczy o wyjątkowej dojrzałości naukowej Doktoranta. Pan Mamot udoskonalił metody chemicznej modyfikacji struktury końca 3' RNA, a następnie końca 5' RNA. Połączenie tych dwóch modyfikacji pozwoliło mu na otrzymanie podwójnie znakowanego i kolistego RNA, które zostały wykorzystane jako sondy molekularne do badania dynamiki strukturalnej wybranych cząsteczek RNA oraz aktywności enzymów nukleolitycznych. Ponadto, przeprowadził badania nad biologicznymi właściwościami podwójnie znakowanego RNA oraz wykonał obrazowanie procesów lokalizacji i ekspresji RNA zarówno w komórkach, jak i w organizmach *Danio pręgowanego*. Z uwagi na to, dostrzegam duży uniwersalny potencjał zastosowania przeprowadzonych badań, a wysoki poziom naukowy osiągniętych rezultatów sprawia, że postrzegam rozprawę jako wyjątkową.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną i naukową przeprowadzonych przez Pana magistra eksperymentów oraz ich ogromny potencjał aplikacyjny, rekomenduję Radzie Dyscypliny Nauk Fizycznych Uniwersytetu Warszawskiego rozważenie możliwości uznania przedmiotowej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.

Gratuluję Doktorantowi oraz Panu Promotorowi osiągnięcia tak cennych rezultatów. Jest to szczególne osiągnięcie, które z pewnością przynosi dumę i podkreśla wysoką jakość pracy badawczej.

