

Warszawa 10 lipca 2023

Recenzja Rozprawy Doktorskiej magistra Adama Mamota
pt: „Synteza podwójnie znakowanego oraz kolistego RNA:
narzędzia do bioobrazowania i terapii genowej”

Rozprawa doktorska magistra Adama Mamota zatytułowana „Synteza podwójnie znakowanego oraz kolistego RNA: narzędzia do bioobrazowania i terapii genowej” wykonana została w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Jemielitego. Podjęta w dysertacji tematyka wpisuje się w aktualny nurt badawczy poszukiwania nowych, regioselektywnych, a zarazem wydajnych metod modyfikacji cząsteczki RNA. RNA odpowiedzialny jest za przepływ informacji genetycznej, dlatego też może być wykorzystany do opracowywania terapii genowych, w tym regulowania ekspresji patologicznego genu. Może być również użyty jako nośnik terapeutycznej informacji genetycznej, w szczepionkach przeciwko chorobom zakaźnym, spersonalizowanych terapiach przeciwnowotworowych czy terapiach genetycznych chorób rzadkich. Modyfikowane cząsteczki RNA można wykorzystać również jako sondy molekularne oraz dzięki obrazowaniu znakowanego mRNA śledzić ekspresję genu w komórkach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest monografią, składającą się z przeglądu literatury (część I), wyników własnych wraz z podsumowaniem i wnioskami (część II), opisu syntez chemicznych oraz bibliografii (część III). Doktorant szczegółowo opisał budowę kwasu rybonukleinowego z podziałem na resztę cukrową, resztę fosforanową – stanowiące szkielet biopolimeru i zasad azotowych. Dokładnie przedstawił skład chemiczny tych kluczowych elementów RNA uwzględniając rolę najistotniejszych grup funkcyjnych i atomów, które bezpośrednio odpowiadają za strukturę przestrzenną i właściwości RNA. Następnie zaprezentował wybrane funkcje biologiczne cząsteczek RNA tj. zdolność do wiązania ligandów, katalizy reakcji chemicznych oraz tą najistotniejszą, czyli przenoszenie informacji genetycznej. Następnie przedstawiał opis terapii genowych. Wyróżnił w tym miejscu kilka podejść, w tym tych polegających na bezpośrednim wpływie na genom dzięki czynnikom o charakterze regulatorów

ekspresji patologicznego genu lub za pomocą nośników terapeutycznej informacji genetycznej.

W kolejnym paragrafie Doktorant przedstawił możliwość wykorzystania mikroskopii fluorescencyjnej do lokalizacji mRNA wykorzystując zdolność fluorogenicznych aptamerów do wiązania małowymiarowych fluoroforów lub układów koniugatów białek wiążących RNA i białek fluorescencyjnych; bądź syntetycznych sond oligonukleotydowych z kowalencyjnie związanym fluoroforem, które selektywnie hybrydują z endogennym mRNA. Kluczowym z punktu widzenia tej pracy jest paragraf poświęcony metodom modyfikacji kodującego RNA. W nim Doktorant zawarł obszerny przegląd dotychczasowych dokonań w zakresie znakowania RNA, w tym reakcji enzymatycznych, cykloaddycji azydkowo-alkilowej katalizowanej jonami miedzi czy poprzez naprężenie pierścienia oraz wielu innych. Szczegółowo opisał reakcję utleniania nadjodaniem 2',3'-diolu będącego fragmentem rybozy na końcu 3' RNA do acyklicznej 1,5-dialdehydowej pochodnej, która w następnej reakcji aminowania redukcyjnego prowadzi do powstania stabilnej pochodnej morfoliny (z ang. *PORA*). Rozdział zakończył przeglądem dotychczas wykorzystanych reakcji do cyklizacji RNA, w tym reakcji chemicznych, z udziałem enzymów, czy tych autokatalitycznych.

Podsumowując, część literaturowa została bardzo dobrze przemyślana i przedstawiono w niej najistotniejsze zagadnienia dotyczące cząsteczki RNA zarówno od strony jej struktury chemicznej, przestrzennej, jak i funkcji biologicznych. Za niezmiernie cenne uważam zaprezentowanie skomplikowanych mechanizmów za pomocą schematów oraz krytyczne uwagi Doktoranta do niektórych publikacji, gdyż podkreśla to jego wiedzę i zdolność do prowadzenia badań naukowych.

W części eksperymentalnej Doktorant zaprezentował opracowaną przez siebie metodę modyfikacji chemicznej struktury końca 3' RNA. W tym celu wybrał reakcję PORA ze względu na wysoką regioselektywność i możliwość kontroli liczby wprowadzonych modyfikacji oraz łagodne warunki w jakich ona zachodzi. Było to niezmiernie ważne ze względu na stabilność RNA. Ponadto do momentu podjęcia badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej nie określono wpływu struktury stosowanych amin, czy rozmiaru i stężenia RNA na przebieg i wydajność reakcji PORA. Z tego względu przeprowadził on systematyczne badania, które doprowadziły do opracowania uniwersalnej i wydajnej metody modyfikowania końca 3' RNA dla różnych długości tej cząsteczki i różnych analogów etylenodiaminy.

Do modyfikacji końca 5' RNA Doktorant wykorzystał metodę kotranskrypcji stosując zsyntezowane w ramach projektu nowe inicjatory azydkowe (N3-AG, N3-Cap0, N3-Cap1) z ponad 50% wydajnością. Następnie wykorzystał reakcję azydkowo-alkilowej cykloaddykcji katalizowanej naprężeniem pierścienia (SPAAC) do modyfikacji końca 5' RNA fluoroforami wykorzystując ich cyklooktynyłowe pochodne fluoresceiny i cyjaniny 5. Reakcję SPAAC użył do modyfikacji w tym samym czasie końców 5' i 3' RNA uprzednio podstawionych grupą azydkową. Doktorant postawił sobie jednak cel prowadzenia jednoczesnej modyfikacji dwóch końców regioselektywnie. Dlatego przeprowadził w jednym naczyniu zarówno reakcję PORA i SPAAC, uzyskał podobne wydajności jak w przypadku, gdy reakcje te były prowadzone oddzielnie. Na wybranych modelowych podwójnie znakowanych cząsteczkach RNA zaprezentował ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Cząsteczki RNA zmodyfikowane cyjaniną 5 oraz fluoresceiną wykorzystał jako sondy molekularne do badań zmian pH w zakresie odpowiadającym pH wewnątrz komórki. Następnie pokazał jak zmodyfikowane RNA cyjaniną 3 i cyjaniną 5 można wykorzystać jako sondy FRET do wyznaczania odległości między położeniem końca 5' i 3' w zależności od: długości RNA, hybrydyzacji z DNA, zmiany konformacji pod wpływem czynników środowiskowych na podstawie parametru bliskości. Zsyntezowane przez siebie sondy FRET wykorzystał również do badań aktywności enzymów nukleolitycznych w czasie rzeczywistym. Wykazał jak modyfikacje końców 5' i 3' wpływają na ekspresję kodowanych przez nich białek. W kolejnym kroku wykorzystał fluorescencyjnie znakowane RNA kodujące eGFP do bioobrazowania. Ponadto Doktorant opracował chemoenzymatyczną metodę do otrzymywania wielkocząsteczkowego cyklicznego RNA (circRNA). W porównaniu do struktury liniowej circRNA jest bardziej odporne na działanie części destrukcyjnych enzymów i może być zatem cennym nośnikiem terapeutycznej informacji genetycznej.

Opis wyników własnych zakończył podsumowaniem, w którym wyróżnił najistotniejsze swoje osiągnięcia oraz wymienił ograniczenia stosowanych reakcji i przybliżeń w analizie wyników. Krytyczne podejście do własnych wyników badań na tym etapie kariery świadczy o jego dojrzałości naukowej.

W trakcie lektury niniejszego doktoratu znalazłam kilka kwestii do dyskusji:

Połączenie reakcji PORA i SPAAC Doktoranta nazwał „sprzężeniem reakcji”. Równoczesne modyfikowanie końca 5' i 3' przy użyciu wyżej wymienionych reakcji prowadzi do uzyskania podobnych wydajności znakowania obu końców przy długości RNA 30-300 nt do tych prowadzonych rozdzielnie, zaś dla dłuższych RNA wydajność reakcji spada, gdy jest prowadzona równolegle. Wygląda na to, że jedna reakcja nie wpływa na spontaniczny przebieg drugiej reakcji, zatem czy w tym przypadku mamy do czynienia ze sprzężeniem reakcji?

Proszę o podanie definicji „kotwiczenia” i wyjaśnienie jaka jest różnica pomiędzy „kotwiczeniem” a siłą i charakterem oddziaływania modelowej cząsteczki RNA opisanej na stronie 97 z fazą stacjonarną w układzie RP-HPLC. Czy „kotwiczenie” oznacza powinowactwo do fazy stacjonarnej? Nie jasny z mojego punktu widzenia jest opis zmian składu fazy ruchomej i jego wpływ na „efekt kotwiczenia” dla przykładu przedstawionego na rys. 2.3.1c. Ponadto, w tym miejscu rozważając długość RNA powinno się stosować masę cząsteczkową, a nie masę molową (strona 97).

Podwójnie znakowane RNA zostało wykorzystane jako sonda FRET do oznaczania odległości położenia końca 5' i 3'. Proszę o wyjaśnienie różnicy w wartościach parametru B dla sondy Cy5-RNA01-Cy3 w tekście na stronie 102 i wykresie C na rysunku 3.1.3.

Pod względem edytorskim praca jest bardzo dobrze przygotowana. Duża ilość wzorów strukturalnych, schematów czyni pracę bardzo czytelną. Doktorant nie ustrzegł się jednak przed nielicznymi błędami edytorskimi, w tym: braku przecinków, stosowania niepoprawnych formy gramatycznych. W kilku miejscach zastosowane są duże skróty myślowe o ile nie stanowi to zapewne problemu dla osób zajmującej się chemią biologiczną to dla innych czytelników powodują, że fragmenty tekstu wymagają sięgnięcia do materiałów źródłowych.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się treścią przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mogę jednoznacznie stwierdzić, że Doktorant ma merytoryczne przygotowanie do prowadzonych przez siebie badań. Uwidacznia się to w sposobie przedstawienia zagadnień dotyczących budowy i skompilowanej biologii RNA w przystępny sposób oraz krytycznego weryfikowania danych literaturowych. Bardzo wysoko oceniam wybór reakcji PORA do modyfikacji końca 3' RNA i opracowanie na jej podstawie bezpośredniej i wydajnej metody modyfikacji końca 3' RNA

wieloma podstawnikami. Wszystkie zsyntezowane związki zostały scharakteryzowane za pomocą odpowiednich technik analitycznych, głównie HPLC i elektroforezy żelowej oraz HRMS. Wszystkie analizy wykonano za pomocą technik, które umożliwiły wyciągnięcie poprawnych wniosków w odniesieniu do prób referencyjnych. Znaczna część uzyskanych wyników stanowiących podstawę niniejszej rozprawy ukazała się w 3 artykułach naukowych w czasopismach: *Nucleic Acids Research*, *Chemistry – A European Journal*, *Angewandte Chemie International Edition*. W dwóch z nich jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorant jest współautorem międzynarodowego zgłoszenia patentowego. Zawarte w tej recenzji krytyczne uwagi nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę niniejszej pracy. W związku z powyższym, uważam, że rozprawa doktorska magistra Adama Mamota pt. „Synteza podwójnie znakowanego oraz kolistego RNA: narzędzia do bioobrazowania i terapii genowej” spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie magistra Adama Mamota do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Mając na uwadze opisane w niniejszej pracy badania naukowe, które doprowadziły do opracowania procedur otrzymania nowych analogów RNA, w tym kolistego, które zachowały swoje funkcje biologiczne, skłoniły mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie tej dysertacji. Jak już wspomniałam wyżej wyniki badań zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, a w dwóch pracach Doktorant miał znaczący wkład w ich powstanie.



Joanna Niedziółka-Jönsson