

Poznań, 15 grudnia 2023 r.

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM
Zakład Krystalografii
Wydział Chemii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Inż. Marcina Ryczka

zatytułowanej

***„Badania strukturalne RNA o znaczeniu w patogenezie chorób
neurodegeneracyjnych”***

Zgodnie z przesłanym pismem z dnia 17 października 2023 r. rozprawa została przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w celu uzyskania stopnia doktora w dziedzinie: nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplina: nauki biologiczne. Praca została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji Biomolekuł Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Kiliszek, prof. IChB PAN.

Rozprawę Pana mgr. inż. Marcina Ryczka stanowi klasyczna praca w języku polskim, licząca 120 stron. Składa się z siedmiu rozdziałów w następującej kolejności: *Cel pracy, Wprowadzenie, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Literatura*. Na dodatkowych stronach umieszczono spis treści, spis 35 rycin i 9 tabel, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim. Bibliografia obejmuje 248 właściwie cytowanych odnośników literaturowych w postaci oryginalnych publikacji naukowych w języku angielskim. Na podkreślenie zasługuje fakt, że prace te były opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, a dodatkowo wiele z nich pochodzi z ostatnich kilku lat, co świadczy o aktualnym stanie wiedzy z tego zakresu.

W rozdziale pierwszym wyraźnie sformułowano cel pracy, polegający na poznaniu struktur przestrzennych RNA, które mają znaczenie w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Postawiono dwa główne zadania do realizacji. Pierwsze polegało na opracowaniu protokołu produkcji RNA o strukturze spinki, opracowaniu warunków krystalizacji i stabilizacji RNA oraz wyznaczeniu struktury przestrzennej

zaprojektowanych cząsteczek RNA. Drugie zadanie obejmowało wyznaczenie struktury trójwymiarowej kompleksu RNA z syntetyczną cząsteczką ANP77, pochodną 2- amino-1,8-naftyrydyny, oraz określenie jej potencjału terapeutycznego.

Rozdział drugi to bardzo dobre opracowanie zagadnień dotyczących chorób neurodegeneracyjnych związanych z nadmierną ekspansją nukleotydów. Zwróciłam szczególną uwagę na bardzo przejrzystą Tabelę 1, w której Doktorant zestawiał liczby powtórzeń nukleotydów w DNA u zdrowych osobników z liczbą powtórzeń w stanach patologicznych. W kolejnych podrozdziałach omówił znaczenie struktury RNA w biologii, opisał struktury spinkowe RNA w świetle badań krystalograficznych, poruszył problem niestabilności spinki RNA w wysokich stężeniach RNA i soli oraz jej skłonność do tworzenia dupleksów. Dalej Doktorant pokazał dwa sposoby otrzymywania RNA do badań krystalograficznych: syntezę chemiczną na podłożu stałym dla stosunkowo krótkich oligomerów i transkrypcję *in vitro* dla dłuższych. Zwrócił uwagę na czystość i jednorodność produktów. Docenił tutaj użyteczność rybozymów, które umożliwiają produkcję jednorodnych końców cząsteczek RNA oraz zwiększają efektywność transkrypcji *in vitro*. W dalszej części *Wprowadzenia* scharakteryzowano stwardnienie zanikowo-boczne (ALS, z *ang.* *amyotrophic lateral sclerosis*) i otępienie czołowo-skroniowe (FTD, z *ang.* *frontotemporal dementia*) oraz wskazano przyczynę patologii jaką jest mutacja w genie *C9orf72*, w tym powtórzenia G_2C_4 . Poruszono zagadnienia związane ze strategią projektowania leków, uwzględniającą interakcję małych cząsteczek ze specyficznymi regionami RNA poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania warstwowe, koordynacyjne, elektrostatyczne oraz oddziaływania van der Waalsa. Wspomniano o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych cyklofanów jako inhibitorów proteazy HIV. Z kolei pochodne 1,8-naftyrydyny przedstawiono jako obiecujące związki chemiczne do identyfikacji niesparowanych nukleotydów występujących w strukturach RNA z nadmiernymi powtórzeniami. Grupa prof. Nakataniego otrzymała cząsteczki określane jako ligandy wiążące niesparowane nukleotydy (MBLs, z *ang.* *mismatch binding ligands*), w tym ligand ANP77, który został użyty w tej pracy. W zależności od pH może on wystąpić w formie mono- lub dikationu o różnej konformacji. Badania krystalograficzne mają pozwolić na określenie konformacji oraz sposobu interakcji pomiędzy ANP77 a RNA. Ta część pracy odzwierciedla szeroką wiedzę Doktoranta i bardzo dobre przygotowanie teoretyczne.

Niewątpliwie na uznanie zasługuje bogaty warsztat badawczy Doktoranta. W rozdziale trzecim Pan mgr Inż. Marcin Ryczek przedstawia różnorodną (18 rodzajów), specjalistyczną aparaturę wykorzystaną w toku realizacji doktoratu, stosowane odczynniki chemiczne i biochemiczne, bufory, roztwory, pożywki oraz

użyte konstrukty RNA. W *Metodach* Doktorant opisuje produkcję polimerazy T7 i ligazy RNA T4, produkcję białka U1a-RBD, syntezę chemiczną RNA, transkrypcję *in vitro*, sposoby oczyszczania, cyrkularyzację RNA, badanie interakcji RNA-białko metodą EMSA (z *ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay*) oraz rentgenowską analizę strukturalną. Skaningowa kalorymetria różnicowa została wykorzystana do pomiaru temperatury topnienia konstruktu G_2C_4 oraz kompleksu G_2C_4 z ANP77 w różnych warunkach pH. Mikroskopię elektronową w warunkach niskiej temperatury dla konstruktów RNA (CUG11U1a, CUG12-U1a, CUG21-U1a) Doktorant wykonał w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie.

Uzyskane wyniki Pan mgr Inż. Ryczek przedstawił w rozdziale czwartym. Udało się mu opracować protokół produkcji stabilnych struktur spinkowych RNA zarówno na drodze syntezy organicznej, którą prowadził w dwóch podejściach: DMT-OFF (grupa 5' DMT jest usuwana z ostatniego syntetyzowanego nukleotydu) i DMT-ON (grupa 5' DMT jest zachowana i dalej wykorzystana w dodatkowym etapie oczyszczania) jak i na drodze transkrypcji *in vitro* (z wykorzystaniem polimerazy T7). W celu rozwiązania problemów dotyczących heterogenności 3'-końca RNA, Doktorant zaprojektował i zsyntetyzował trzy konstrukty: (i) RNA-HH z rybozymem typu głowa młotka (HH) na 3' końcu, (ii) HH-RNA-HH z rybozymem typu HH na 5' i 3'-końcu, (iii) HH-RNA-HP z rybozymem typu głowa młotka na 5'-końcu oraz rybozymem typu spinki (HP) na 3'-końcu. W celu poprawy jednorodności produktu, zaprojektował i zsyntetyzował matrycę DNA z dwiema resztami nukleotydowymi zawierającymi C2'-metoksył na 5'-końcu nici antysensownej kodującej docelowe RNA (bez lub w obecności guanozyny albo guanozyno-5'-monofosforanu, GMP). Zanim podjęto próby określenia struktury konstruktów RNA, wykonano predykcje ich struktury drugorzędowej przy użyciu programu RNAstructure, które potwierdziły, że zaprojektowane przez Doktoranta sekwencje formują strukturę spinki. Krystalizacja w 192 różnych warunkach nie dała upragnionych kryształów, więc podjęto próbę określenia struktury za pomocą mikroskopii elektronowej. Niestety i ta próba zakończyła się niepowodzeniem. Dopiero krystalizacja kompleksu G_2C_4 z ANP77 oraz oligomeru G_2C_4 doprowadziła do otrzymania monokryształów odpowiednich do badań dyfrakcyjnych. Strukturę rozwiązano i udokładniono do satysfakcjonujących wskaźników R i R_{free} . Autor rozprawy opisuje zarówno drugorzędową jak i trzeciorzędową strukturę G_2C_4 z cząsteczką ANP77 i bez ANP77. Zwraca uwagę na podobieństwa, które odnoszą się do dwóch oddziałujących ze sobą dupleksów, tworzących jeden tetramer, i różnice: dwie reszty cytydyny, które znajdują się na końcu 5' nici A oddziałują z cząsteczką ANP77. Analizowano pary kanoniczne Watsona-Cricka (G-C) oraz pary Hoogsteena (guanina z protonowaną resztą cytozyny). W strukturze oligomeru G_2C_4 układ C-C⁺C odgrywa ważną rolę w ułożeniu cząsteczek

G_2C_4 w sieci krystalicznej. Z kolei ligand ANP77 w konformacji *stacked* oddziałuje z dwiema wystającymi resztami cytozyny w nici A poprzez trzy wiązania wodorowe, tworząc pseudokanoniczne pary zasad. Doktorant szczegółowo opisał i zilustrował oddziaływanie liganda z resztami cytydyny nici A tetrameru G_2C_4 oraz oddziaływanie cząsteczki ANP77 i reszty cytydyny na pozycji 5 nici A tetrameru z cząsteczką wody. Zwrócił też uwagę na ułożenie reszt cytydyny w sieci krystalicznej struktury G_2C_4 z cząsteczką ANP77. Skaningową kalorymetrię różnicową oligomeru G_2C_4 wykonano w trzech warunkach pH: 5,26, 6,0 (warunki krystalizacji) i 7,0. i wyznaczono temperatury topnienia dla każdego warunku, co pokazano w Tabeli 9. Uzyskane wyniki zostały przedstawione rzetelnie i na wysokim poziomie naukowym.

Dyskusję wyników Autor rozprawy rozpoczyna od tego, jak rozwiązał główny problem w krystalizowaniu RNA o strukturze spinki poprzez kowalencyjne zamknięcie tejże spinki za pomocą ligazy RNA T4, dzięki czemu cyrkularyzowany łańcuch RNA jest bardziej stabilny. Pan mgr inż. Ryczek zwraca uwagę na szczegóły eksperymentalne, które były kluczowe w syntezy chemicznej RNA, na przykład: rozpuszczenie wszystkich reagentów w acetonitrylu o najniższej zawartości wody (do 20 ppm), użycie wysokiej jakości amidofosforynów z blokadą TOM nad TBDMS, oczyszczanie metodą DMT-ON lepsze niż DMT-OFF. Dalej Doktorant pokazuje zaletę metody wykorzystującej modyfikowaną matrycę DNA do transkrypcji *in vitro*, dzięki której łatwo otrzymuje się monofosforan na końcu 5' pożądanego RNA. Podkreśla, iż monofosforan na 5'-końcu RNA jest niezbędny do reakcji cyrkularyzacji RNA przy udziale ligazy RNA T4 i że stężenie MPG musi być około 3 razy wyższe niż guanozyno-5'-trifosforanu, GTP. Produkcja RNA przy użyciu polimerazy RNA T4 wymaga przynajmniej jednej reszty guanozyny na początku sekwencji do rozpoczęcia transkrypcji. Sposobem na to jest użycie rybozymów. Doktorant użył rybozymu typu głowa młotka oraz typu spinki. Kolejne problemy do rozwiązania to: niska wydajność transestryfikacji rybozymów i ich oddzielenie od pożądanego RNA. Doktorant zauważa, że rybozym nie może być tej samej długości co pożądanego RNA. Trzeci problem to grupy chemiczne, generowane podczas transestryfikacji łańcucha RNA. Kiedy użyjemy rybozymu typu głowa młotka i typu spinki na 5'-końcu RNA pojawia się grupa hydroksylowa, a na końcu 3' RNA powstaje 2',3'-cykliczny fosforan, który przed cyrkularyzacją należy usunąć. Fosforylacja końca 5' przy użyciu kinazy polinukleotydomowej T4 z aktywnością fosfatazy rozwiązuje ten problem, ale następuje wzrost kosztów i zmniejszenie wydajności. W dyskusji oprócz aspektów syntetycznych poruszane są aspekty strukturalne sekwencji G_2C_4 , która jest związana ze stwardnieniem zanikowym bocznym i otępieniem czołowo-skroniowym. Doktorant na podstawie własnych badań zaproponował model, w którym długie ciągi powtórzeń G_2C_4 mogą formować potrójną helisę (ciąg trzech różnych trypletów: C-C⁺•C, C⁺•G-C

i G•C-G). Zauważa, że protonowanie reszt cytozyn prowadzi do wzmocnienia interakcji Hoogsteena w trypletach. Autor wyjaśnia, dlaczego pomimo obecności dwóch miejsc wiązania tylko jedna cząsteczka ANP77 wiąże się w badanym kryształ. Dyskutuje również rolę łączników liganda ANP77 w dopasowywaniu się do kształtu helisy RNA. Pisze o optymalnej liczbie atomów węgla w łączniku ANP77. Trafne wnioski, poparte odpowiednimi dowodami oraz prowadzenie wielowątkowej dyskusji świadczą o dojrzałości naukowej Kandydata do stopnia naukowego doktora

Cele nakreślone przez Doktoranta na początku rozprawy zostały zrealizowane, co pokazano w *Podsumowaniu*.

Pracę czyta się bardzo dobrze. Autor w sposób jasny i zrozumiały przedstawia poszczególne kwestie. Używa poprawnego języka. Nie zauważyłam w tekście elementów żargonu laboratoryjnego. Znalazłam jedynie kilka tzw. literówek, na przykład na stronie 56 zamiast „programu CrysAllisPro” powinno być „programu CrysAlisPro”, na stronie 74 w wyrażeniu „para Hogsteena” należy dopisać drugie „o” w nazwisku znanego naukowca, natomiast w zdaniu „Wycięty prążek z pożądanym RNA poddałem elektrolecji” (strona 85) Autor miał zapewne na myśli „elektroelucję”. W spisie skrótów pominięto ANP77. Z kolei na stronie 86 w zdaniu „Z wyższą rozdzielczością zdeteminowano strukturę 40 kDa SAM-IV ryboprzełącznika RNA.” w miejsce wyrazu „zdeteminowano” wpisałabym „określono” lub „wyznaczono”.

Pytania, które nasunęły się mi po lekturze tej rozprawy są następujące:

- 1) Czy podejmował Pan próby wykorzystania rybozomu HDV pozyskanego z wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV, z ang. hepatitis delta virus) do przygotowania RNA do krystalizacji?
- 2) Czy rozpoznano konwersję grupy iminowej na aminową podczas protonowania reszty cytydyny?
- 3) Jakie kryterium zostało użyte do wyznaczenia wiązań wodorowych w badanych kryształach?
- 4) Jakie możliwości i ograniczenia napotkał Pan w trakcie wykonywania pomiarów dyfrakcyjnych dla obu monokryształów?
- 5) Proszę o doprecyzowanie czy dane w Tabeli 8 (str. 72) dotyczą wszystkich atomów czy tylko niewodorowych?
- 6) Jak określano pozycję atomu wodoru w mostkach wodorowych?

Część wyników tego doktoratu została opublikowana w wieloautorskiej pracy, w której Pan Marcin Ryczek jest pierwszym autorem. Praca pt. *Overview of Methods for Large Scale RNA Synthesis* ukazała się w *Applied Sciences* w 2022 roku. Na konferencji RNA meeting w 2021 Doktorant prezentował poster pt. *Overview of large scale RNA synthesis*. Z kolei na konferencji 23rd Heart of Europe Bio-Crystallography meeting wygłosił referat pt. *Large scale RNA synthesis for crystallographic studies*. Brał też udział w warsztatach z krystalografii białek ProtXRD zorganizowanych w Krakowie w lipcu 2019 roku.

O randze prowadzonych badań świadczy pozyskanie środków przez Panią Promotor, dr hab. Agnieszkę Kiliszek w ramach grantu NCN SONATA BIS 2017/26/E/NZ1/00950: pt. *Opracowanie metodologii umożliwiającej stabilizację RNA w formie spinki do badań krystalograficznych*.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny i wagę podejmowanych problemów rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Marcina Ryczka zasługuje na **wyróżnienie**.

W **uzasadnieniu** chciałabym podkreślić następujące aspekty: (i) opracowanie protokołu i przewodnika o tym jak skutecznie pozyskać RNA do badań krystalograficznych (ii) praca została napisana bardzo dobrym językiem i posiada bogatą szatę graficzną, (iii) dojrzała dyskusja (iv) dane strukturalne mogą służyć w projektowaniu leków .

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr. Inż. Marcina Ryczka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

E. Bartoszak-Adamska

dr hab. Elżbieta Bartoszak-Adamska, prof. UAM

