

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marcina Ryczka pt. „Badania strukturalne RNA o znaczeniu w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych”

Praca doktorska pana Marcina Ryczka została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji Biomolekuł Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Przeprowadzone badania naukowe były finansowane z Grantu NCN SONATA BIS 2017/26/E/NZ1/00950, który otrzymała pani Promotor tejże pracy, dr hab. Agnieszka Kiliszek, na „Opracowanie metodologii umożliwiającej stabilizację RNA w formie spinki do badań krystalograficznych”.

Doktorant postawił sobie kilka celów; pierwszy związany był *stricte* z tematyką grantu, czyli opracowaniem protokołu produkcji RNA o strukturze spinki, stabilizacji takiego RNA do krystalizacji oraz wyznaczenie struktury przestrzennej RNA w formie spinki stabilnej w warunkach krystalizacyjnych. Nadrzędnym celem badań pana Ryczka jest przyczynienie się do zrozumienia mechanizmów działania chorób neurodegeneracyjnych oraz neuromięśniowych w kontekście struktur jakie przyjmują powtórzenia wielonukleotydowe będące przyczyną tych chorób. Drugim zadaniem było określenie struktury przestrzennej kompleksu RNA, zawierającego sekwencję G₂C₄, z syntetyczną cząsteczką ANP77. Otrzymanie struktury takiego kompleksu miało dostarczyć informacji o sposobie oddziaływania i potencjale terapeutycznym cząsteczki ANP77.

Praca doktorska ma bardzo klasyczny układ: Cel pracy, Wprowadzenie, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Oprócz tych głównych rozdziałów zawiera również Streszczenie w języku polskim i Abstract w języku angielskim, Spis rycin i tabel oraz Wykaz skrótów.

Głównym celem pracy było otrzymanie cząsteczek RNA, które w swojej sekwencji posiadałyby powtórzenia nukleotydów charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych oraz poznanie ich struktur przestrzennych metodami krystalograficznymi lub kriomikroskopii elektronowej. Realizacja tego zadania wymagała opracowania protokołu produkcji RNA o strukturze spinki stabilnej w warunkach krystalizacyjnych, przeprowadzenie samego procesu krystalizacji oraz wyznaczenie struktury przestrzennej zaprojektowanych cząsteczek

RNA. Jak wynika z dalszej lektury rozprawy Doktorant w pełni zrealizował pierwszy etap, czyli zaprojektował i otrzymał cząsteczki RNA, jednakże nie udało mu się ich wykrystalizować. Kolejnym celem było wyznaczenie struktur przestrzennych kompleksu RNA zawierającego sekwencję G_2C_4 z syntetyczną cząsteczką ANP77 oraz identycznego fragmentu RNA w formie bez cząsteczki terapeutycznej. Ten cel został zrealizowany w całości.

W części literaturowej rozprawy, zatytułowanej „Wprowadzenie”, opisane są zagadnienia istotne dla pełnego zrozumienia koncepcji i znaczenia prowadzonych badań. Doktorant przybliży czytelnikowi choroby neurodegeneracyjne związane z nadmierną ekspansją nukleotydów, takie jak: stwardnienie zanikowe boczne i otępienie czołowo-skroniowe. Opisuje struktury RNA i ich znaczenie w biologii oraz badania krystalograficzne form spinkowych RNA. Następnie porusza problem produkcji RNA do badań krystalograficznych, omawiając transkrypcję *in vitro*, syntezę RNA za pomocą rybozymów typu spinki i typu głowa młotka. Opisuje syntezę chemiczną i analizuje zależność wydajności syntezy od wydajności pojedynczej reakcji sprzęgania i długości syntezowanego RNA oraz pokazuje jak warianty syntezy DMT-ON/ DMT-OFF wpływają na sposób oczyszczania końcowego produktu. Omawia również, jak ilość sześci nukleotydowych powtórzeń sekwencji G_4C_2/G_2C_4 w regionie promotorowym lub w pierwszym intronie genu C9orf72 jest skorelowana z chorobami neurodegeneracyjnymi. Na zakończenie tego rozdziału Doktorant opisuje budowę i działanie małych cząsteczek określanych jako ligandy wiążące niesparowane nukleotydy. Jedną z takich cząsteczek jest ligand ANP77 użyty w tej pracy do utworzenia kompleksu RNA/ANP77. Ze względu na obecność dwóch pierścieni 2-amino-1,8-naftyrydiny połączonych elastycznym linkerem, ligand ten wykazuje zdolność do oddziaływań z resztami cytozyny tworząc pseudo-pary zasad.

Rozdział „Materiały i Metody” jest podzielony na dwie części. W części materiały wypisane są odczynniki, roztwory oraz tabela z sekwencjami RNA wykorzystanymi w pracy. Metodyka rozpoczyna się od opisu nadprodukcji i oczyszczania białek użytych do syntezy, czyli polimerazy T7 i ligazy RNA T4 oraz białka U1a-RBD, stabilizującego pożądaną strukturę przestrzenną RNA. Zazwyczaj preparaty te są kupowane od firm biochemicznych, ale ze względów oszczędnościowych pan Marcin Ryczek przeprowadził ich produkcję samodzielnie. W dalszej części opisana jest synteza chemiczna RNA i oczyszczanie uzyskanych konstruktów z użyciem HPLC. Do produkcji dłuższych fragmentów Autor użył transkrypcji *in vitro* i opisał procedury związane z ich oczyszczaniem w żelach poliakrylamidowych, elektroelucję RNA, strącanie RNA izopropanolem, cyrkularyzację oraz ekstrakcję fenolem. Badał również interakcje RNA – białko metodą EMSA. Kolejno opisane są procedury krystalograficzne, takie jak: krystalizacja RNA, pomiary dyfrakcyjne,

procesowanie danych, rozwiązanie oraz udokładnianie struktury oligomeru G_2C_4 i kompleksu G_2C_4 z ANP77. Do pomiaru temperatury topnienia konstruktów G_2C_4 i $G_2C_4/ANP77$ w różnych warunkach pH Doktorant użył skaningowej kalorymetrii różnicowej. Z uwagi na to, że próby krystalizacji dużych konstruktów nie powiodły się, to pan Marcin Ryczek starał się określić ich strukturę w kompleksach z białkiem U1a metodą kriomikroskopii elektronowej i opisał sposób oraz warunki przeprowadzenia testowego pomiaru.

W rozdziale „Wyniki” przedstawione są eksperymenty mające na celu uzyskanie odpowiednich ilości konstruktów RNA do badań krystalograficznych i optymalizacja tych protokołów do otrzymywania stabilnych struktur spinkowych. Jest to trudne zagadnienie, gdyż w warunkach wysokiego stężenia soli oraz wysokiego stężenia RNA preferowane jest formowanie się dupleksu RNA nad strukturą spinkową. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu, zastosowanym przez Doktoranta, była cyrkularyzacja spinki RNA z wykorzystaniem ligazy RNA T4, która powoduje kowalencyjne połączenie końców 5' i 3' przez co uniemożliwia rozfałdowanie struktur. Enzym ten wymaga substratów posiadających monofosforan na 5' końcu oraz grupę hydroksylową na 3' końcu.

W celu przetestowania produkcji RNA na drodze syntezy chemicznej pan Marcin Ryczek sprawdzał dwa protokoły otrzymywania oligomerów: DMT-ON i DMT-OFF. Wykazał, że synteza DMT-ON jest szybsza oraz łatwiejsza przy produkcji relatywnie krótkich konstruktów RNA.

Do syntezy RNA o dłuższej sekwencji Doktorant przeanalizował różne warianty transkrypcji *in vitro*. Transkrypcja z wykorzystaniem polimerazy T7 napotyka na problemy prowadzące do powstania zanieczyszczeń konstruktów o zaburzonej sekwencji, które mogą być trudne do usunięcia i przeszkadzać w badaniach krystalograficznych. Pierwszy dotyczy 5' końca RNA gdyż podczas reakcji polimeraza T7 jako pierwsza transkrybuje resztę guanozyny. Drugim problemem jest dodawanie przez polimerazę T7 nukleotydów na 3' końcu, które nie występują w matrycy. Doktorant przetestował rozwiązanie tych problemów przez zastosowanie dwóch typów rybozymów o różnej lokalizacji. Najwyższą wydajność transestryfikacji posiadał konstrukt RNA-HH. W celu poprawy homogenności na końcu 3' RNA Doktorant zastosował modyfikację matrycy DNA, polegającą na wprowadzeniu grupy metoksylowej do drugiego atomu węgla C2' dwóch reszt nukleotydowych na końcu 5' nici antysensowej matrycy DNA. Otrzymanie RNA z grupą OH lub grupą monofosforanową na końcu 5' było możliwe, gdy transkrypcję *in vitro* przeprowadzono w obecności guanozyny lub GMP. W końcowym protokole po transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem modyfikowanej matrycy w obecności GMP następowała złożona procedura oczyszczania: w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, elektroelucja z żelu, strącanie izopropanolem, cyrkularyzacja RNA przy użyciu ligazy RNA T4, oczyszczanie

cyrkularyzowanej spinki RNA fenolem i chloroformem, strącanie RNA przy użyciu izopropanolu. Na zakończenie tworzono kompleks RNA z białkiem U1a-RBD. W ten sposób Doktorant otrzymał trzy konstrukty: CUG11-U1a, CUG12-U1a i CUG21-U1a o długościach odpowiednio: 51, 54 i 81 nukleotydów, dla których przewidział struktury drugorzędowe za pomocą programu RNAStructure. Pomimo, że podjął się szeroko zakrojonych eksperymentów krystalizacyjnych otrzymanych konstruktów, zmieniając stężenia konstruktów, proporcje molowe RNA:U1a oraz temperaturę krystalizacji, to nie udało mu się otrzymać kryształów. Po niepowodzeniach podjął próbę określenia struktury tych konstruktów za pomocą kriomikroskopii elektronowej, które też nie zakończyły się sukcesem. Uważam jednak, że opracowanie wydajnego sposobu otrzymywania RNA o sekwencjach mających wpływ na patogenezę chorób neurodegeneracyjnych, jest znaczącym osiągnięciem tego projektu doktorskiego.

Drugim zadaniem badawczym realizowanym w ramach doktoratu było określenie struktury krystalicznej RNA, zawierającego sekwencję 5' GGCCCC 3' (G_2C_4) w formie bez ligandu oraz w kompleksie z cząsteczką ANP77. Oligomer RNA G_2C_4 został zsyntetyzowany chemicznie i oczyszczony metodą DMT-ON. Ligand ANP77 użyty w pracy był zaprojektowany i otrzymany w grupie prof. Nakataniego. Kryształy otrzymane w warunkach, w których głównym czynnikiem strącającym był MPD miały bardzo dobre właściwości dyfrakcyjne i rozpraszały promienie Roentgena z rozdzielczością odpowiednio 1.6Å i 1.1Å. Oligomer G_2C_4 jak również jego kompleks z ligandem ANP77 wykryzalizowały w układzie rombowym, w tej samej grupie przestrzennej ($C222_1$) ale z zupełnie innymi stałymi sieciowymi. Struktura kompleksu jest gęściej upakowana (objętość komórki elementarnej o 7% mniejsza) co może być przyczyną lepszych właściwości dyfrakcyjnych. Obie struktury zostały rozwiązane i udokładnione do bardzo dobrych parametrów statystycznych. Mimo odmiennego upakowania struktury G_2C_4 z cząsteczką ANP77 oraz bez tej cząsteczki są do siebie bardzo podobne. Składają się z dwóch oddziałujących ze sobą dupleksów, które tworzą jeden tetramer. Dwie wystające reszty cytozyny z tetrameru G_2C_4 są idealnym miejscem wiązania ANP77. W strukturze kompleksu G_2C_4 /ANP77 ligand przyjmuje konformację typu *stacked* i oddziałuje z dwiema wystającymi resztami cytozyny w nici A poprzez trzy wiązania wodorowe tworząc pseudokanoniczne pary zasad.

Temperatury topnienia struktur formowanych przez G_2C_4 w formie *apo* i w obecności ANP77 były mierzone za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej w trzech warunkach pH: 5,26, 6,0 oraz 7,0. Eksperyment pokazał, że zarówno wartość temperatury topnienia, jak i liczba pików, zależą od pH oraz od obecności ligandu. W pH 6, obserwowane były dwa piki T_{m1} i T_{m2} , a obecność ligandu powodowała ich przesunięcie w kierunku wyższych wartości temperatury.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant omawia uzyskane wyniki eksperymentalne. Szkoda, że rozdział ten nie jest podzielony na sekcje tożsame z paragrafami w rozdziale „Wyniki”. Doktorant szczegółowo omawia trudności jakie można napotkać podczas syntezy RNA do badań krystalograficznych i przedstawia sposoby rozwiązania tych problemów. Dyskusja ta jest przeprowadzona zarówno dla syntezy chemicznej, jak i dla transkrypcji *in vitro*.

Określenie przez Doktoranta struktury sekwencji G_2C_4 , związanej ze stwardnieniem zanikowym bocznym oraz otępieniem czołowo-skroniowym, pozwoliło na podjęcie prób skorelowania struktury powtórzeń wielonukleotydowych z patogennością. Chociaż doniesienia literaturowe przewidują, że sensowy RNA $(GGGGCC)_n$ może formować strukturę G-kwadrupleksu i spinki, to struktura antysensowego RNA $(GGCCCC)_n$ była słabo zbadana. Struktura krystaliczna G_2C_4 uwidacznia cały szereg niestandardowych oddziaływań. Na bazie tych obserwacji można wnioskować, że wydłużone powtórzenia G_2C_4 obecne w antysensowej nici RNA genu *C9orf72* mogą tworzyć skomplikowane struktury. Pan Marcin Ryczek zaproponował model, w którym długie ciągi powtórzeń G_2C_4 mogą formować potrójną helisę. Helisa ta składa się z ciągu trzech różnych trypletów: C-C+•C, C+•G-C i G•C-G. Obecność regionu trójniciowego i formowanie w roztworze tetrameru potwierdza pomiar DSC. Tworzenie tetrameru zaobserwowano przy pH 6,0, gdzie w skanie DSC widoczne były dwa piki. Pierwszy pik prawdopodobnie odpowiadał rozpadowi struktury tetramerycznej, podczas gdy drugi reprezentował rozpad regionu dwuniciowego. Mimo wysokiej rozdzielczości uzyskanych struktur krystalograficznych trudno było jednoznacznie określić stan protonacji reszt cytozyny. Doktorant dyskutuje konieczność uprotonowania reszt cytozyn do utworzenia kontaktów trzeciorzędowych na podstawie własnych obserwacji, jak i doniesień literaturowych, a na zakończenie dyskutuje sposób oddziaływania ligandu ANP77 z RNA. Ciekawą obserwacją jest to, że cząsteczka ligandu ANP77 wpasowuje się w helisę RNA rozszerzając długość regionu podwójnej nici. Ligand w konformacji *stacked* dopasowuje się do dwu kolejnych cytozyn tworząc wiązania wodorowe, a krótki łącznik pomiędzy pierścieniami 1,8-naftyrydyny zapobiega występowaniu oddziaływań niespecyficznych.

Część opisowa doktoratu zakończona jest 6 wnioskami z którymi w całości się zgadzam. Dopisałbym do nich jeszcze jeden: oligomery RNA o długości od 20 do 100 nukleotydów są niezmiernie trudne do krystalizacji i konieczne jest poszukiwanie warunków stabilizujących ich trzeciorzędową strukturę.

W podsumowaniu stwierdzam, że pan mgr inż. Marcin Ryczek przedstawił rozprawę doktorską posiadającą walory poznawcze, wykazał wiedzę w zakresie otrzymywania preparatów RNA, badań biochemicznych oraz procedur krystalograficznych. Wykazał się umiejętnością analizy wyników eksperymentalnych i wyciągnięcia z nich wniosków. Uzyskane

wyniki są oryginalne i stanowią niewątpliwie nowość naukową. Doktorant dysponuje solidnym i różnorodnym warształem eksperymentalnym i właściwie dobierał metody do rozwiązywania postawionych problemów badawczych. Praca napisana jest dobrym językiem naukowym, a blisko 250 odnośników literaturowych świadczy o wnikliwym śledzeniu literatury w całym okresie wykonywania badań.

W pracy pojawiają się nieliczne zwroty anglojęzyczne i angielska składnia niektórych zdań, co nie przeszkadza w przekazie naukowym dysertacji. To, czego brakowało mi najbardziej w pracy, to niezdeponowanie w bazie PDB struktur krystalicznych: G_2C_4 i kompleksu $G_2C_4/ANP77$. Podejrzewam, że autorzy czekają z depozycją na przygotowanie publikacji, ale w takim przypadku dobrze byłoby dołączyć do manuskryptu płytę CD z odpowiednimi zbiorami, analogicznymi do tych, które umieszcza się podczas depozycji struktury w PDB. W rozdziale „Wyniki” struktura cząsteczki ligandu ANP77 pojawia się tylko na rysunkach w postaci wzorów „patyczkowych”. W rozdziale „Wprowadzenie” przed rysunkiem pokazującym zmiany konformacji i protonacji ligandu, gdzie łańcuch boczny linkera zaznaczony jest jako R, brak jest jego wzoru strukturalnego.

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.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana mgr inż. Marcina Ryczka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Marcin Ryzka