



Dr hab. Anna Bujacz, prof. PŁ
Politechnika Łódzka
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Stefanowskiego 2/22, 90-573 Łódź
e-mail: anna.bujacz@p.lodz.pl

Łódź, 9.02.2026

Recenzja pracy doktorskiej mgr Martyny Matei-Pluty
pt. „Metody chemiczne stabilizujące RNA dla badań krystalograficznych”

Praca doktorska pani mgr Martyny Matei-Pluty została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji Biomolekuł Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Przeprowadzone badania naukowe były finansowane z dwóch grantów NCN: SONATA BIS 2017/26/E/NZ1/00950 i OPUS 2022/45/B/NZ7/03543, których kierownikiem była promotorka doktoratu – pani Dr hab. Agnieszka Kiliszek. Celem pierwszego projektu było „Opracowanie metodologii umożliwiającej stabilizację RNA w formie spinki do badań krystalograficznych”, natomiast drugiego - była „Analiza krystalograficzna kompleksów RNA-ligand w kierunku racjonalnego projektowania cząsteczek wiodących w rozwoju terapii i chorób neurodegeneracyjnych”. Drugi grant NCN OPUS 23 „Analiza krystalograficzna kompleksów RNA ligand. W kierunku racjonalnego projektowania cząsteczek wiodących w rozwoju terapii i chorób neurodegeneracyjnych” dotyczy analizy strukturalnej syntetycznych związków oddziałujących z cząsteczkami RNA związanymi z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Projekt ten oparty jest na współpracy z prof. Kazuhiko Nakatni z Uniwersytetu w Osace.

Część badań w ramach pracy doktorskiej, dotycząca opracowania metody uzyskania stabilnych i jednorodnych konformacyjnie struktur RNA, była prowadzona w celu krystalizacji i określenia struktur przestrzennych metodami krystalografii rentgenowskiej. Prace te są kontynuacją rozpoczętych kilka lat wcześniej badań przez panią promotor pracy i zdają sobie sprawę z tego, że będą one dalej kontynuowane, gdyż każde badania nad zrozumieniem struktury RNA są ważne ze względu na jego rolę w wielu procesach biologicznych.

Praca doktorska napisana jest w języku angielskim i ma prawie standardowy układ: Streszczenie, Wprowadzenie, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Referencje literaturowe. To, co nie jest standardowe – to rozdział 7: Podsumowanie publikacji zawartych w pracy doktorskiej, który stanowi formę szczątkowego autoreferatu.

Celem pracy doktorskiej pani Martyny Matei-Pluty było opracowanie metodologii stabilizacji struktur cząsteczek RNA, które miałyby się przyczynić do otrzymywania kryształów RNA, co umożliwiłoby prowadzenie analiz dowolnych struktur spinkowych, które są

najczęstszym motywem występującym w RNA. Do zrealizowania tego celu zastosowano dwa całkiem odmienne podejścia eksperymentalne: stabilizację RNA za pomocą nienukleozydowych aromatycznych linkerów łączących się kowalencyjnie do RNA oraz użycie małowcząsteczkowego ligandu, dimeru karbaminianu naftyrydyny, oddziałującego na zasadzie interkalatora. Obie strategie zostały ocenione metodami fizykochemicznymi i biochemicznymi, takimi jak: spektroskopią UV, dichroizmem kołowym DSC oraz poprzez zastosowanie nukleazy Dicer do analizy cięcia RNA *in vitro*. Pozwoliły one zwalidować postawione hipotezy w kierunku wpływu obydwóch podejść na integralność strukturalną RNA i aktywność biologiczną.

Wstęp literaturowy stanowi bardzo cenną część przedstawionej dysertacji i uzasadnia wagę naukową podjętych badań. Struktury RNA o wysokiej rozdzielczości są zazwyczaj określane za pomocą krystalografii rentgenowskiej, która umożliwia porównania pokrewnych RNA i identyfikację zmian konformacyjnych związanych z ich funkcją. Jednakże, krystalizacja jest „wąskim gardłem” w określaniu struktury krystalicznej, ponieważ uzyskanie dobrej jakości monokryształów, nadających się do eksperymentu dyfrakcyjnego jest trudne. Struktury krystaliczne rybozymów i podjednostek rybosomalnych dostarczyły kluczowych informacji na temat zasad fałdowania RNA, takich jak upakowania helis w zwarte struktury, które tworzą centra katalityczne i miejsca wiązania. Jednakże, w rybosomie struktury te są stabilizowane przez oddziaływania z białkiem i wzajemną stabilizacją elementów drugo i trzeciorzędowych. Badania krystalograficzne mniejszych biologicznie cząsteczek RNA są bardzo ważne, gdyż mogą wyjaśnić powiązanie ich struktur z pełnioną funkcją.

Cząsteczki RNA wykazują duże zróżnicowanie funkcjonalne w układach biologicznych, od aktywności katalitycznej po regulację ekspresji genów, która w decydującym stopniu zależy od ich zdolności do tworzenia określonych struktur trójwymiarowych. Ta strukturalna różnorodność umożliwia RNA udział w złożonych procesach rozpoznawania molekularnego i pełnienie różnorodnych funkcji komórkowych. Informacyjne mRNA pełnią funkcję niezbędnych nośników informacji genetycznej, przenosząc kod DNA do rybosomów, gdzie ulega on translacji na białka za pomocą transferowych tRNA. Ponadto małe RNA, takie jak małe jądrowe snRNA, mikroRNA i małe interferujące siRNA, są kluczowymi regulatorami ekspresji genów, wpływając na splicing, degradację lub represję translacyjną określonych mRNA. Oprócz głównej roli RNA jako nośnika informacji, inne klasy RNA dodatkowo zwiększają katalityczną wielozadaniowość tych cząsteczek. Warto tutaj wymienić przełączniki rybosomalne w bakteryjnych kationach sensownych i rybozymy, pośredniczące w reakcjach cięcia.

Następnie doktorantka pisze czym spowodowane są trudności w krystalizacji RNA, wskazując na główną przyczynę niepowodzeń: elastyczność konformacyjną, nieprawidłowe fałdowanie i zdolność do przyjmowania przez cząsteczki RNA wielu typów struktur. RNA prezentuje w dużej mierze jednolity, ujemnie naładowany szkielet fosforanowy, który utrudnia tworzenie stabilnych oddziaływań międzycząsteczkowych, a co za tym idzie tworzenie uporządkowanej sieci krystalicznej. Cząsteczki RNA są często wydłużone i luźno upakowane,

otoczone dużą ilością cząsteczek wody i kationów metali równoważących ładunek reszt fosforanowych, a ich stosunkowo słabe oddziaływania trzeciorzędowe dodatkowo zwiększają ich elastyczność i ruch między domenami. W konsekwencji trudno je wykrystalizować, a powstałe kryształy często słabo rozpraszają promienie Roentgena.

W kolejnym paragrafie pani Mateja-Pluta opisuje znane do tej pory podejścia do uzyskania stabilizacji RNA, zarówno w celu krystalizacji, jak i otrzymania cząsteczek terapeutycznych. W literaturze opisane są modyfikacje szkieletu cukrów i zasad nukleinowych, które są obecnie rutynowo stosowane w celu zwiększenia odporności na degradację nukleazową i poprawę stabilności termicznej RNA. Te modyfikacje często zwiększają powinowactwo hybrydyzacji i ogólną wytrzymałość molekularną. Mogą one również wprowadzać lokalne zaburzenia strukturalne, które komplikują analizy strukturalne o wysokiej rozdzielczości. Kompromis między stabilnością biochemiczną, a ryzykiem wystąpienia artefaktów strukturalnych musi być uwzględniony przy projektowaniu cząsteczek RNA do badań krystalograficznych i funkcjonalnych.

Doktorantka omówiła również mechanizm działania łączników nienukleozydowych w stabilizacji RNA, takich jak: liniowe nienukleozydowe (oparte zarówno na łańcuchu węglowym jak i polietylenowym), aromatyczne nienukleozydowe, stilbenowe fenantrenowe i pirenowe. W stabilizacji struktur RNA indukowanej ligandem wykorzystywany jest również dimer karbaminianu naftyrydyny (NCD), który Doktorantka także zastosowała w swojej pracy.

W rozdziale „Materials and methods” Doktorantka przedstawia wielowątkowy charakter badań, ukazując ogrom pracy laboratoryjnej, czym udowadnia swoje kompetencje na różnych polach biochemii RNA. Według mnie z Rozdziału „Materiały i metody” opisy syntez powinny znaleźć się w rozdziale „Results” lub można było wydzielić rozdział „Część eksperymentalna”, począwszy od rozdziału 5.2.3., jak ma to miejsce w doktoratach z chemii organicznej.

Na stronie 37 podane są wzory strukturalne 3A, 3B ... S18, ale brak jest podpisu rysunku. Część tych wzorów znajdujemy ponownie na stronie 60 na Rys. 12.

Syntezy aromatycznych łączników, oczyszczanie i potwierdzenie ich budowy za pomocą NMR i MS oraz analiza ich wpływu na strukturę i aktywność RNA są opisane poprawnie. Podobnie, badania strukturalne obejmujące tworzenie stabilnych struktur RNA, w tym struktur spinkowych, ich krystalizacja, pomiar dyfrakcyjny otrzymanych kryształów i rozwiązywanie problemu fazowego są również merytorycznie poprawnie zredagowane.

Wadą opisów syntez jest brak równań przeprowadzonych reakcji (str. 39-48). Dalej w pracy znajdujemy Schemat 1 na stronie 61, przedstawiający uogólniony schemat syntezy, ale numeracja związków jest odmienna niż ta w opisie syntez. Nazwy i Schemat 1 pomagają trochę w prześledzeniu ścieżki prowadzonych syntez, ale schemat ten powinien być umieszczony przed opisem syntez, gdyż ułatwiłoby to ich analizę. Również znalezienie wzorów grup bifunkcyjnych DMT i CEP nie było łatwe i wymagało powrotu do Rys. 2 gdzie są podane ich

wzory i nazwy, ale zabrakło bezpośredniego odniesienia do tych skrótów lub przejścia do Rys. 12, gdzie są umieszczone wraz ze wzorami syntezowanych łączników.

Chciałabym, aby Doktorantka wyjaśniła jak realizowana jest kontrola reaktywności obu grup bifunkcyjnych DMT i CEP w trakcie tworzenia koniugatów z RNA?

Synteza i oczyszczanie oligonukleotydów oraz większość procedur analitycznych z tym związanych są odmienne od stosowanych w biochemii białek i stanowią ciekawą naukową porcję wiedzy dla krystalografa białek. Opisane procedury obejmują: pomiar topnienia UV, dichroizm kołowy, oczyszczanie RNA na żelu poliakrylamidowym, elucję RNA, wytrącanie kwasów nukleinowych oraz ich odsalanie, transkrypcja *in vitro*, defosforylacja, fosforylacja końca 5' RNA i znakowanie RNA na końcu 5' radioaktywnym izotopem ^{32}P , cyrkulacja pętli RNA, tworzenie hydrolizatu formamidu czy cięcie RNA przez rybonukleazę Dicer.

W pierwszej części rozdziału „Results” Doktorantka opisuje projektowanie i syntezę szeregu nienukleozydowych aromatycznych linkerów, które kowalencyjnie łączą końce 5' i 3' struktury spinki do włosów RNA. Linkery zaprojektowano na bazie pochodnych piromelitowych i naftalenowych. Inspirację zaczerpnięto z linkerów pochodzących z fenantrenu i fenantroliny. Łączniki te mają ciekawe właściwości strukturalne i są w pełni kompatybilne ze standardowymi protokołami syntezy RNA w fazie stałej, ale ich synteza jest trudna i kosztowna. Ugrupowania piromelitowe i naftalenowe stanowią nowe stabilizatory RNA i zostały wybrane z uwagi na niską cenę odczynników chemicznych i wysoką wydajność syntezy linkerów, a ich synteza stała się podstawą zgłoszenia patentowego, którego Doktorantka jest współautorem.

Tworzenie zlinkowanych oligonukleotydów nie przebiegało według założonego schematu. Kontrola masy za pomocą MS konsekwentnie wskazywała, że większość zlinkowanych oligonukleotydów klasy I miała połowę oczekiwanej długości, co wskazywało na rozszczepienie łańcucha RNA na drodze hydrolizy wewnątrzcząsteczkowej w pobliżu łącznika ze względu na przestrzenną bliskość grupy 2'-OH i wiązania kowalencyjnego między łącznikiem aromatycznym a sąsiednim nukleotydem. Jedynym wyjątkiem był oligomer zawierający łącznik 3d, który zachował pełną oczekiwaną długość. Jednak, skrócone oligonukleotydy zachowały cenne cechy funkcjonalne, takie jak łączniki aromatyczne, które zachowują się jak czapeczki nienukleotydowe, przyczyniając się do strukturalnej stabilizacji cząsteczki, która została wykazana za pomocą denaturacji termicznej monitorowanej za pomocą spektroskopii UV obu klas zlinkowanych oligomerów. Analizy te pozwoliły na ocenę wpływu piromelitowych i naftalenowych bloków budulcowych na stabilność strukturalną RNA. Parametry termodynamiczne otrzymanych konstruktów RNA, takie jak: entalpia (ΔH), entropia (ΔS) i energia swobodna, zostały wyliczone na podstawie ich profili topnienia.

Doktorantka zaprojektowała i zsyntetyzowała pięć zestawów oligonukleotydów w celach krystalizacyjnych. Każdy konstrukt został zaprojektowany tak, aby utworzyć stabilny region dwuniciowy z aromatycznym łącznikiem, zastępującym naturalną pętlę spinki do włosów.

Sekwencje składały się głównie z par zasad G-C i C-G, aby zwiększyć stabilność duplexu i promować tworzenie kryształów poprzez zmniejszenie elastyczności strukturalnej. Wszystkie konstrukty zawierały wyłącznie rybonukleotydy, z wyjątkiem dwóch, w których dwa nukleotydy w aromatycznym regionie łącznika zostały zastąpione deoksyrybonukleotydami, aby poprawić wbudowanie łącznika i ogólną stabilność RNA. Zaprojektowane konstrukty zostały następnie poddane krystalizacji z użyciem komercyjnych zestawów krystalizacyjnych. Spośród wielu testowanych tylko jedna sekwencja, 5'-CUGCUGCUG-3a-CUGCUGCUG-3', wytworzyła kryształy o jakości dyfrakcyjnej. Pomimo wysokiej rozdzielczości zebranego zbioru danych, około 1.5 Å, proces udokładniania nie przyniósł zadowalających statystyk $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$. Wysokie wskaźniki rozbieżności udokładnionej struktury, 0.24/0.36, są prawdopodobnie konsekwencją częściowego nieuporządkowania konformacyjnego fragmentu struktury, która odzwierciedla się w wydłużeniu pewnej grupy refleksów na obrazie dyfrakcyjnym. Chociaż statystyki udokładniania były słabe to końcowy model struktury i mapy gęstości elektronowej ujawniły dobrze zdefiniowany i ciągły obszar helisy odpowiadający uporządkowanej części duplexu RNA, który jest dobrze widoczny w kanonicznej konformacji formy A.

Kolejną formą RNA poddaną krystalizacji był konstrukt typu spinki do włosów, w którym końce 5' i 3' trzonu były połączone łącznikiem, a pętla apikalna była rekonstruowana poprzez ligację. Strategia taka była opublikowana wcześniej przez promotorkę pracy i miała na celu zapobieganie rozwijaniu się RNA lub tworzeniu się semikomplementarnych duplexów przy wysokich stężeniach RNA i odczynników strącających wymaganych do krystalizacji. W tym podejściu zachowana jest natywna konformacja pętli, a jednocześnie zapewniona jest dodatkowa stabilizacja kowalencyjna i cyrkularyzacja. Do reakcji cyrkularyzacji użyto ligazy T4 RNA, która wymaga, aby cząsteczka RNA zawierała grupę 5'-monofosforanową i 3'-hydroksylową. Do zaprojektowania konstruktów wykorzystano biologicznie istotne struktury spinki do włosów RNA: pętlę sarcyny/rycyny (SRL), które są jedną z najdłuższych zachowanych sekwencji w 23S rRNA. Struktura ta jest kluczową dla aktywności rybosomu, ponieważ jest ona celem cytotoksyn - α -sarcyny i rycyny, które blokują translację.

Spośród wszystkich testowanych konstruktów, udaną cyrkularyzację udało się przeprowadzić tylko dla jednej sekwencji RNA (sekwencja T35 – R06), zawierającej łącznik aromatyczny 3d oraz dla konstruktów kontrolnych (T37) z elastycznym 18 członowym łącznikiem polietylenowym o komercyjnej nazwie Spacer-18. Cyrkularne oligomery RNA zbadano za pomocą spektrometrii masowej MALDI TOF w celu potwierdzenia ich integralności i oczekiwanej masy cząsteczkowej.

Kryształy cyrkularnego kompleksu T35 nie rozpraszały promieni Roentgena, ale uzyskany konstrukt posłużył do fizykochemicznej walidacji struktury za pomocą pomiaru temperatury topnienia w ultrafiolecie i eksperymentu CD. Natomiast, udało się Doktorantce przeprowadzić pełną analizę strukturalną dla zaprojektowanego konstruktów RNA o strukturze spinki do włosów opartego na motywie pętli sarcyna-rycyna z sekwencją 5'-

AGGACCGGAGCG–S18–UGCUCUAGUACGAG-3' T42, w której łącznik Spacer-18 został umieszczony u podstawy trzonu. Dla tego konstruktu przeprowadzono cyrkularyzację za pomocą ligazy T4 RNA i uzyskano dobrej jakości kryształy stosując roztwór krystalizacyjny z komercyjnego zestawu Natrix 2 Reagent, warunki 27. Eksperyment dyfrakcyjny przeprowadzono na linii synchrotronowej wyposażonej w detektor Dectris PILATUS 6M-F.

W opisie eksperymentu dyfrakcyjnego jest kilka nieścisłości i pomyłek edytorskich: brakuje nazwy synchrotronu i linii pomiarowej, długość fali jest 100 razy za duża (Rozdział 6.3.4.2.), standardowo stosujemy zapis grupy przestrzennej C2 a nie C121.

W Podstawieniu cząsteczkowym wykorzystano jako model natywną strukturę pętli sarcyny/rycyny (PDB ID: 1Q9A). Obie struktury zostały określone do atomowej rozdzielczości z bardzo zbliżonymi parametrami udokładniania i są do siebie podobne (RMSD = 0.8 Å) co świadczy, że łącznik nie wpływa istotnie na zmianę struktury. Udokładniony model posiada charakterystyczną architekturę spinki do włosów, typową dla pętli sarcyna-rycyna. Cząsteczka składa się z dobrze zdefiniowanego trzonu o strukturze podwójnej helisy, składającego się z pięciu kanonicznych par zasad Watsona-Cricka i trzech niekanonicznych par (A•G, A•C i U•C), które powodują niewielką lokalną asymetrię, zachowując jednocześnie globalną topologię formy A. Apikalna pętla spinki do włosów składa się z konserwatywnej czteronukleotydowej sekwencji GAGA, motywu znanego ze swojej stabilności strukturalnej w cząsteczkach RNA. Trzon zawiera charakterystyczną parę 9U–18A, zaangażowaną w wiązania wodorowe typu Hoogsteena, dodatkowo stabilizowaną przez interakcje z sąsiednią guanozyną 8G. Cecha ta jest obserwowana również w natywnej strukturze SRL, co wskazuje na konserwację tego motywu strukturalnego.

W celu oceny, czy wprowadzone modyfikacje wpłynęły na funkcję biologiczną, przeprowadzono testy cięcia ludzką rybonukleazą Dicer *in vitro*, wykorzystując odpowiednie konstrukty pre-miR-21. Celem tych eksperymentów było określenie, czy obecność łączników nienukleozydowych lub dodatkowych motywów zakłóca zdolność enzymu do rozpoznawania i hydrolizy struktury spinki do dojrzałych produktów miRNA. Zaprojektowano i zsyntetyzowano cztery warianty będące analogami pre-miR-21 o strukturze spinki do włosów z różnymi modyfikacjami. Wyniki testu cięcia przez Dicer wykazały, że pomimo wprowadzonych modyfikacji, takich jak cyrkularyzacja z łącznikiem Spacer-18, cyrkularyzacja zawierająca miejsce wiązania białka U1A oraz pętla UGGAA pełniąca funkcję motywu wiążącego ligand, wszystkie zmodyfikowane konstrukty pre-miR-21 zachowały swoją aktywność biologiczną.

Pierwsza publikacja włączona do doktoratu opublikowana w *Applied Sciences* 2022 „Przegląd metod syntezy RNA na dużą skalę” opisuje metodologię chemicznej syntezy konstruktów RNA przeznaczonych do analizy krystalograficznej. Przedstawione strategie są istotne dla podejść syntetycznych zastosowanych w niniejszej rozprawie, szczególnie w kontekście włączania kowalencyjnie wiązanych łączników nienukleozydowych oraz

przygotowywania konstruktów RNA o wystarczającej ilości i czystości niezbędnych do krystalizacji.

Zastosowanie dimeru karbaminianu naftyrydyny (NCD) do poprawy jakości kryształów zostało opisane w pracy opublikowanej w *Nucleic Acids Research* w 2025, której Doktorantka jest pierwszym autorem. NCD to mała cząsteczka, która rozpoznaje RNA zawierające powtórzenia UGGAA, związane z ataksją rdzeniowo-mózdkową. Praca opisuje strukturę RNA bez ligandu i dwie struktury kompleksów RNA–NCD. NCD oddziałuje z RNA inaczej niż we wcześniej opisanej strukturze określonej techniką NMR, tworząc pseudokanoniczne pary zasad z resztami guanozyny zlokalizowanymi na tej samej nici RNA. Ponadto, w jednym z kompleksów ligand znajduje się pomiędzy cząsteczkami RNA powiązanymi symetrią, wykazując cechy kleju molekularnego w tworzeniu sieci krystalicznej. Porównanie modeli RNA–NCD i RNA bez ligandu pozwala na identyfikację zmian strukturalnych w RNA po związaniu ligandu i zmianie konformacji z formy A do formy zbliżonej do Z-RNA. Obserwacje te poszerzają naszą wiedzę na temat oddziaływań między RNA a małymi związkami - interkalatorami. Szczególnie analiza *Supplementary materials* dołączonego do publikacji stanowi interesujący materiał dla krystalografa. Z niego dowiadujemy się, że zastosowanie ligandu poprawiło rozdzielczość struktury, ale jednocześnie spowodowało zmianę konformacji RNA. W materiałach tych zawarta jest też szczegółowa analiza konformacji RNA w formie bez ligandu i w kompleksach z NCD.

W podsumowaniu stwierdzam, że pani mgr Martyna Mateja-Pluta przedstawiła rozprawę doktorską posiadającą walory poznawcze, wykazała wiedzę w zakresie otrzymywania i analizowania preparatów RNA, badań biochemicznych i syntetycznych oraz procedur krystalograficznych. Wykazała się umiejętnością analizy wyników eksperymentalnych i wyciągania z nich wniosków. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią nowość naukową. Doktorantka dysponuje różnorodnym warsztatem eksperymentalnym i właściwie dobierała metody do rozwiązywania postawionych problemów badawczych. Praca zawiera blisko 250 odnośników literaturowych, co świadczy o wnikliwym śledzeniu literatury w całym okresie wykonywania badań.

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.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie pani Martyny Matei-Pluty do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

