



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, 01.10.2023 r.

prof. dr hab. Maria Bryszewska
Kierownik Katedry Biofizyki Ogólnej

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Rafała Mańki

„Badanie oddziaływania aptamerów RNA z błonami pęcherzyków lipidowych”

Promotor pracy: Prof. dr hab. Tadeusz Janas (Uniwersytet Opolski)

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Rafał Mańka podjął badania oddziaływań aptamerów RNA i mutantów tych aptamerów z błonami syntetycznych modelowych pęcherzyków lipidowych (liposomów) o budowie tratwowej i nietratwowej oraz z błoną izolowanych z surowicy bydłowej egzosomów. Poznanie tych oddziaływań jest niezmiernie ważne, ponieważ egzosomy, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, pełnią w organizmie nie tylko rolę polegającą na usuwaniu na zewnątrz niefunkcjonalnych składników komórkowych lecz mogą transportować różne cząsteczki takie jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy wymieniając je między komórkami w procesie sygnalizacji międzykomórkowej. Ze względu na swoją budowę, mają zdolność przenikania przez bariery tkankowe, w tym barierę krew-mózg, wskazuje się więc na ich potencjał jako czynników terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych.

Aptamery RNA, małe jednoniciowe oligonukleotydy, pozyskiwane są w procesie selekcji *in vitro* losowych sekwencji RNA, prowadzącym do uzyskania sekwencji o wysokim powinowactwie do cząsteczki docelowej (celu molekularnego) i mogą być wykorzystywane zarówno w celach terapeutycznych jak i diagnostycznych.

Badania miały dać odpowiedź na pytanie, jakie czynniki są głównie odpowiedzialne za powinowactwo aptamerów RNA do błon pęcherzyków modelowych i egzosomalnych. Szczególną uwagę poświęcił Doktorant zbadaniu roli struktury/fazy błony (występowanie tratw błonowych, stopień uporządkowania lipidów) w tych oddziaływaniach, a ze strony RNA czy motywy strukturalne i sekwencyjne, długość łańcucha RNA, jego skład nukleotydowy, entalpia swobodna fałdowania łańcucha mają znaczenie dla intensywności tych oddziaływań.

Pierwszym zrealizowanym zadaniem badawczym była identyfikacja motywów strukturalnych i sekwencyjnych (egzosomowych, tratwowych, 5-nukleotydowych) w analizowanej bazie sekwencji RNA i ich lokalizacja w strukturze 2-rzędowej cząsteczki. Po zrealizowaniu tego zadania Doktorant przeszedł do badania oddziaływań błona-aptamer RNA metodą fluorescencyjną z wykorzystaniem rezonansowego przeniesienia energii Förstera (FRET), która pozwoliła na wyznaczenie stałych dysocjacji K_D (powinowactwa) dla prawie wszystkich badanych układów. Badania wykazały, że obecność tratw lipidowych w błonie pęcherzyków sprzyja asocjacji RNA do tych błon i wniosek ten jest poparty zarówno wynikami badań oddziaływań RNA z syntetycznymi liposomami jak i z błonami egzosomów. Natomiast zależność stałych dysocjacji od pozostałych badanych czynników, takich jak motywy sekwencyjne czy strukturalne aptamerów RNA nie była już tak oczywista i nie pozwoliła na sformułowanie kategoriycznych wniosków. W podsumowaniu uzyskanych wyników, Doktorant zdając sobie sprawę ze złożoności badanych procesów pisze: „*W przyszłości warto by znaleźć bardziej złożony model, który lepiej mógłby wyjaśnić zależności pomiędzy tymi elementami i stopień w jakim wpływają na powinowactwo RNA-błona*”.

Nie jest rolą recenzenta szczegółowe omawianie uzyskanych przez Doktoranta wyników, lecz ich ocena. W mojej opinii uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią bardzo cenne uzupełnienie i rozwinięcie istniejących badań interakcji RNA z błonami. Budzą zaufanie, bo zostały uzyskane we współpracy z naukowcami zajmującymi się tą tematyką, pod okiem Promotora o dużym dorobku naukowym w tej dziedzinie.

Nie jest dla mnie zrozumiałe, dlaczego Doktorant w wykazie literatury zamieszczonym w rozprawie nie cytuje swojej pracy: *R. Mańka, P. Janas, K. Sapoń, T. Janas, T. Janas „Role of RNA motifs in RNA interaction with membrane lipid rafts: Implications for therapeutic applications of exosomal RNAs”, Int. J. Mol. Sci. 22(17), 9416, 2021*, chociaż badania opisane w tym artykule były niewątpliwie kontynuowane w pracy doktorskiej. Bardzo proszę o wyjaśnienie.

Praca doktorska ma w zasadzie układ klasyczny. Składa się z dwóch fundamentalnych części: *Części teoretycznej*, zawierającej opis struktury i funkcji błon komórkowych, roli tratw lipidowych, egzosomów i ich roli w organizmie, podrozdziału dotyczącego RNA, motywów egzosomowych i tratwowych w RNA i aptamerów RNA oraz części zatytułowanej *Badania własne*, na którą składają się podrozdziały: Założenia i cele pracy, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia oraz Spisy rysunków i tabel. Dodatkowo Doktorant załączył listę wszystkich oryginalnych sekwencji RNA i tabelę wariantów fałdowania badanych RNA (załączniki 1 i 2). Cały tekst pracy (bez załączników) liczy 174 strony i dostarcza szczegółowych informacji na wymienione wyżej tematy. W opinii recenzenta, w celu ułatwienia przyswojenia tej wiedzy przez czytelnika i w celu „odchudzenia” pracy, można było zrezygnować z tak detalicznego przedstawiania np. kart charakterystyk aptamerów RNA dla wszystkich badanych związków (19 stron), podawania zmian wszystkich widm fluorescencji podczas gaszenia fluorescencji aptamerów liposomami (Tabela 23) i równoległe zmiany emisji fluorescencji i odwrotności tych zmian (Tabela 24). Może wystarczyłoby przytoczyć tylko przykłady, a pozostałe wyniki skomentować? Pod względem graficznym praca jest opracowana bardzo dobrze, czego niestety nie można powiedzieć o tekście. Praktycznie na każdej stronie można znaleźć jakąś literówkę, złą odmianę, niepotrzebne słowo lub brak słowa w zdaniu. Za dużo tego jest, żeby wszystko wypunktować. Podam tylko jeden przykład ze str. 43 – „... został przeanalizowany **pod kontem** obecności....”. Chyba jednak kątem...

„Dyskusja” liczy 12 stron tekstu. W dyskusji Doktorant porównuje uzyskane przez siebie wyniki z niezbyt licznymi doniesieniami innych autorów, krytycznie je oceniając i formułując perspektywy dalszych badań. Rozprawa pokazuje rozległą wiedzę Doktoranta w dziedzinie nauk przyrodniczych, a w szczególności w obszarze biochemii i biofizyki kwasów nukleinowych i ich oddziaływań z błonami biologicznymi. Poprzez przebadanie szerokiego spektrum aptamerów RNA i wnikliwą analizę interakcji z błonami modelowymi i biologicznymi

(egzosomy) praca doktorska znacząco poszerza naszą wiedzę w tej dziedzinie, co może mieć znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne.

Podsumowując uważam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom naukowym na stopień naukowy doktora zwracam się więc do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego z prośbą o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr. Rafała Mańki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
KATEDRY BIOFIZYKI OGÓLNEJ UŁ
M. Bryszewska
prof. zw. dr hab. Maria Bryszewska