



Wrocław, 18.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Rafała Mańki pod tytułem "Badanie oddziaływania aptamerów RNA z błonami pęcherzyków lipidowych" zrealizowanej w Instytucie Biologii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem Promotora prof. dr. hab. Tadeusza Janasa

W ostatnich latach jesteśmy świadkami znacznego przyrostu liczby doniesień naukowych na temat roli egzosomów w modulacji i regulacji wielu funkcji biologicznych. Te małe pęcherzyki (o średnicy poniżej 200 nm) wydzielane są przez różnorodne komórki wielu organizmów, w tym organizmu ludzkiego, oraz pośredniczą w lokalnej i ogólnoustrojowej komunikacji międzykomórkowej na zasadzie transportu lipidów, białek lub kwasów nukleinowych (DNA i RNA) do komórek docelowych kształtując w ten sposób ich status fizjologiczny. W tym kontekście jedną z najistotniejszych zagadek, których rozwikłanie jest niezbędne do pełnego poznania mechanizmów przekazywania sygnału za pomocą egzosomów jest sposób selektywnego inkorporowania cząsteczek do wnętrza lub w obręb błon tworzących te pęcherzyki. Coraz więcej doniesień naukowych sugeruje, że błony te mają za zadanie nie tylko ochronę zawartości egzosomów przed czynnikami znajdującymi się w przestrzeni międzykomórkowej, ale stanowią także platformę pozwalającą na selektywną rekrutację cząsteczek poprzez specyficzne oddziaływania intermolekularne. Co więcej, coraz częściej podkreśla się kluczową rolę lipidów w tym procesie. Niemniej, molekularne mechanizmy w dużej mierze pozostają niezidentyfikowane, a prezentowane modele są tyleż błyskotliwe co w dużej mierze spekulatywne. By zmienić taki stan rzeczy konieczne jest zastosowanie podejścia eksperymentalnego opartego o modelowe systemy błonowe pozwalającego na badania specyficzności oddziaływań makromolekuł o zdefiniowanych parametrach strukturalnych i funkcjonalnych z lipidami błonowymi w ściśle kontrolowanych warunkach, co jest niezbędne do zbudowania mechanistycznego obrazu obserwowanych zjawisk.

Przedstawiona do recenzji dysertacja naukowa wychodzi naprzeciw tym potrzebom. Jej Autor postanowił w sposób systematyczny i ilościowy określić znaczenie motywów sekwencyjnych i strukturalnych aptamerów RNA w odniesieniu do ich oddziaływań z pęcherzykami o różnym składzie lipidowym. Takie podejście bardzo dobrze wpisuje się w



wyraźnie zarysowany w literaturze naukowej trend polegający na próbach identyfikacji cech niezbędnych do efektywnego pakowania cząsteczek do pęcherzyków egzosomalnych oraz zrozumienia roli lipidów w tym procesie. Niesie ono ze sobą obietnicę uzyskania wyników o bardzo dużej wartości poznawczej, ale także o dużym potencjale aplikacyjnym m.in. ze względu na coraz szerzej rozpowszechnione idee traktowania maszynerii biogenezy egzosomów jako potencjalnego celu terapeutycznego oraz wykorzystania egzosomów jako nośników substancji biologicznie aktywnych. W tym kontekście Doktorant bardzo trafnie sformułował założenia i cele pracy dotyczące poznania mechanizmu oddziaływania RNA z błoną pęcherzyków lipidowych jako kluczowego procesu w ładowaniu RNA do egzosomów. Najważniejszym była próba określenia znaczenia czynników regulujących te oddziaływania, takich jak skład błony lipidowej (w szczególności obecność tzw. domen tratwowych), motywy sekwencyjne RNA oraz elementy struktury drugorzędowej RNA. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem zarówno syntetycznych jak i izolowanych z materiału biologicznego pęcherzyków lipidowych w powiązaniu ze skrupulatnie zaprojektowanymi i wyselekcjonowanymi cząsteczkami RNA wykorzystując właściwie dobraną metodologię pomiaru parametrów oddziaływań opartą o transfer energii rezonansu Förstera (FRET). To pozwoliło uzyskać interesujące i wartościowe wyniki, które znacząco przyczyniają się do uzyskania pełnego obrazu wspomnianych oddziaływań na poziomie molekularnym.

Doktorant przedstawił swoje dokonania w postaci rozprawy doktorskiej o klasycznym układzie. Należy jednak wspomnieć, że znaczna część przedstawionej w niej wyników została już opublikowana na łamach międzynarodowego czasopisma naukowego o wysokim współczynniku oddziaływania (Mańka, R.; Janas, P.; Sapoń, K.; Janas, T.; Janas, T. Role of RNA Motifs in RNA Interaction with Membrane Lipid Rafts: Implications for Therapeutic Applications of Exosomal RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9416. <https://doi.org/10.3390/ijms22179416>). Dorobek publikacyjny Doktoranta obejmuje także współautorstwo artykułu przeglądowego traktującego o roli tratw lipidowych w formowaniu pęcherzyków, który ukazał się w cieszącym się uznaniem czasopiśmie *Journal of Cell Science*. Pomimo krótkiego czasu od ukazania się tych prac zostały one już zauważone w środowisku naukowym, na co wskazuje sumaryczna ilość cytowań wynosząca 9 (wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji).

Meritum zaprezentowano w języku polskim w postaci pięciu głównych rozdziałów, a całość obejmuje niemal 200 stron. Rozprawa opatrzona jest także streszczeniem w języku



polskim i angielskim, wykazem skrótów, spisem rysunków i tabel, załącznikami prezentującymi sekwencje i warianty fałdowania cząsteczek RNA jak również bibliografią obejmującą w sumie 112 pozycji. Generalnie, całość jest ułożona w logiczny sposób, a jedyną drobną niekonsekwencją jest wydzielenie podrozdziału 4.4 – w przekonaniu recenzenta powinien on być scalony z rozdziałem 4.3, gdyż ten ostatni już w obecnej postaci zawiera dane dot. tzw. „liposomów tratwowych”.

Pierwszą z głównych części dysertacji stanowi „wstęp literaturowy” stanowiące przykład zwięźle napisanego podsumowania zdeponowanej dotychczas wiedzy potrzebnej do zrozumienia całości pracy i umiejscowienia prezentowanych wyników w odpowiednim kontekście. Właściwym posunięciem było rozdzielenie tego fragmentu na cztery rozdziały, w których kolejno przedstawione są zagadnienia dotyczące błon i tratw lipidowych, egzosomów, RNA oraz spektroskopii fluorescencyjnej. Generalnie, wstęp jest napisany w sposób interesujący i rzeczowy, a wrażenie takie potęgowane jest odpowiednim doбором rycin. Niemniej, zaskakuje nieco fakt, iż ta część jest momentami zaprezentowana w bardzo oszczędnej formie. Z perspektywy zagadnień eksplorowanych w dalszych częściach pracy brakuje szerszej perspektywy przy omawianiu liposomów jako systemów modelowych z ich zaletami i wadami (r. 1.1.3) czy też wykorzystaniu egzosomów w terapii opartej o miRNA/siRNA (r. 1.2.5). Rozdział 1.4 także mógłby być wzbogacony o bardziej dogłębne omówienie potencjału technik opartych o FRET w badaniach oddziaływania cząsteczek RNA z błonami lipidowymi. Od strony edycyjnej część ta, podobnie jak i cała praca, przygotowana jest bardzo starannie, jednak Autor nie ustrzegł się przed popełnieniem kilku drobnych, aczkolwiek istotnych błędów i nieścisłości. Przykładami tego są m.in. błędne zdefiniowanie rdzenia glicerolowego na rysunku 1, niezbyt trafne określenie ceramidu jako części hydrofobowej sfingolipidu (s. 12), zbyt precyzyjne określenie procentu powierzchni błony zajmowanej przez tratwy lipidowe bez podania kontekstu oryginalnych badań (s. 13), zbyt jednoznaczne pozycjonowanie wiązań wodorowych na rysunku 3 (por. Fantini & Barrantes 2013, DOI: 10.3389/fphys.2013.00031) czy też niezbyt trafne twierdzenie na temat występowania w przyrodzie dwuniciowego RNA na s. 24 (por. Sadeq i wsp. 2021 DOI: 10.3390/ncrna7010015).

Następna część dotyczy już badań przeprowadzonych przez Doktoranta, a otwiera ją omówienie założeń i celów pracy. Bardzo dobrym posunięciem jest zebranie głównych hipotez w postaci zwięzłej listy i precyzyjne zdefiniowanie zadań badawczych, których



realizacja ma w założeniu pozwolić na weryfikację tych hipotez. Kolejnych niemal czterdzieści stron zawiera opis użytych w ramach realizacji badań materiałów i metod. Ten fragment przygotowany jest w sposób przejrzysty i logiczny, przy czym uwagę zwraca dbałość o zachowanie szczegółowości koniecznej do zagwarantowania pełnej odtwarzalności opisywanych eksperymentów. Kilka kwestii wymaga jednak dodatkowych wyjaśnień. Czy roztwory wyszczególnione na s. 30-31 rzeczywiście były przechowywane w temp. $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$? Struktura łańcuchów acylowych sfingomieliny (CH) izolowanej z mózgu świni jest inna niż zadeklarowana w tabeli 7 (por. dane producenta/dostawcy). Tabela 8 jest w dużym stopniu niekompletna – być może to problem wynikły na etapie edycji? Czy wartości w kolumnie „czystość RNA” tabelach 13 i 14 nie są w kilku przypadkach zbyt odległe od optymalnych wartości opisywanych w literaturze? Dlaczego wyrażenie reprezentujące maksymalną zmianę fluorescencji w równaniu (6) (s. 61) odbiega od tego co stosuje się w literaturze (także w publikacji Doktoranta, notabene, parametr ten mógłby być nieco precyzyjniej zdefiniowany)?

Centralnym punktem rozprawy doktorskiej jest obszerna część obejmująca opis uzyskanych wyników. W pierwszej kolejności Autor koncentruje się na szczegółowej charakterystyce *in silico* uprzednio wyselekcjonowanych aptamerów RNA pod kątem występowania odpowiednich motywów sekwencyjnych i strukturalnych. Dalsze działania obejmują już badania oddziaływań aptamerów RNA z liposomami zbudowanymi z fosfatydylocholiny (DOPC) lub mieszaniny DOPC:SM:cholesterol (w stosunku molowym 6:3:1). Biorąc pod uwagę dane literaturowe (np. Veatch & Keller 2003 DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74726-2) rodzi się przy tej okazji pytanie czy dwuwarstwa lipidowa o takim jak ostatni z wymienionych składzie będzie zgodnie z założeniami eksperymentów wykazywała separację faz. Zwieńczeniem tej części badań jest zastąpienie sztucznych pęcherzyków lipidowych egzosomami izolowanymi z surowicy cielej. W rezultacie Doktorant otrzymał obfity zestaw wartości stałych wiązania (K_D) dla większości badanych konfiguracji pęcherzyk lipidowy-RNA, przy czym niektóre z nich mają odzwierciedlenie tylko w jednej serii pomiarowej. Zaskakujące, że przy bezpośrednim porównaniu danych zamieszczonych w dysertacji z zestawem wyników opublikowanych przez Doktoranta można napotkać rozbieżności w przypadku niektórych aptamerów (np. przebieg krzywych odwrotności zmian fluorescencji i wartości K_D dla kilku aptamerów, w tym aptameru 24, względem błon tratwowych), co wymaga dodatkowego komentarza. Dysponując tymi danymi w kontekście informacji o motywach sekwencyjnych i



strukturalnych aptamerów RNA Doktorant włączył do swoich badań odpowiednio zaprojektowane przez siebie mutanty cząsteczek RNA.

Wygenerowany zestaw danych miał przede wszystkim posłużyć do zweryfikowania hipotezy badawczej zakładającej, że oddziaływanie aptamerów RNA z błonami lipidowymi jest regulowane przez specyficzne sekwencje nukleotydowe lub obecność motywów struktury drugorzędowej. W rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Doktorant opisuje swoje próby wyekstrahowania potencjalnych korelacji i tym samym wyjaśnienia zmienności powinowactwa aptamerów RNA do błon w zależności od obecności w pierwszych z wymienionych motywów sekwencyjnych i strukturalnych. Niestety, brak jednoznacznych wskazań w tej materii rzutuje na nie do końca jednoznaczny charakter wniosków wysuwanych w ostatnim rozdziale dysertacji. Druga ze sformułowanych w dysertacji hipotez dotyczyła preferencyjnego oddziaływania RNA z tratwami lipidowymi. W tej materii uzyskane przez Doktoranta wyniki w dużym stopniu zachowują zgodność z dotychczas opublikowanymi danymi wskazującymi na korelację pomiędzy uporządkowaniem błony i jej powinowactwem do cząsteczek RNA. Do wyciągnięcia bardziej jednoznacznych wniosków konieczne byłoby uwzględnienie w badaniach szerszego spektrum molekuł RNA i pęcherzyków lipidowych o zróżnicowanym składzie oraz zastosowanie alternatywnej metodologii badania oddziaływań intermolekularnych (jak na przykład interferometria biowarstwowa lub mikrotermoforeza), co jednak z pewnością wykracza poza ramy pojedynczego projektu doktorskiego.

Podsumowując, konstrukcja logiczna części opisującej wyniki oraz dyskusję jest spójna i pozwala na bardzo dobrą ocenę wagi poczynionych obserwacji, co w dużym stopniu jest też zasługą na ogół prawidłowo przygotowanych ilustracji i tabel. Części te utwierdzają także w przekonaniu, że dokonania Doktoranta mają znaczący wpływ na rozwój reprezentowanej dziedziny naukowej i mogą być dobrym wyznacznikiem kierunku przyszłych badań. Niemniej, pojawia się kilka opisanych poniżej kwestii, które wymagałyby bardziej dogłębnej dyskusji i dodatkowych wyjaśnień.

1. W pracy brakuje głębszej dyskusji na temat wpływu jonów dwuwartościowych na oddziaływanie RNA-błona. W wykorzystywanym przez Doktoranta układzie eksperymentalnym stężenie jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} jest zdecydowanie wyższe (szczególnie pierwszych z wymienionych) niż to, czego można się spodziewać w cytoplazmie komórki, czyli maksymalnie kilkaset μM Ca^{2+} , chociaż chwilowo mogą mieć miejsce większe lokalne skoki stężenia tego jonu (por. Parekh 2008, DOI: 10.1113/jphysiol.2008.153460). Kationy



dwuwartościow mają zdolność oddziaływania z grupami fosforanowymi tzw. lipidów zwitterjonowych (takich jak PC i SM) powodując reorientację ich grup hydrofilowych, nadając im pozornie dodatni ładunek wypadkowy i zwiększając tym samym siłę oddziaływania z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi. Co więcej, efekt ten przybiera na sile w przypadku błon o większym stopniu uporządkowania (por. Czogalla i wsp. 2013 DOI: 10.1039/c2fd20109g). Wpływ jonów należałoby także uwzględnić przy porównywaniu danych wygenerowanych w różnych warunkach eksperymentalnych przez inne grupy badawcze.

2. Zastosowane w prezentowanych badaniach sondy fluorescencyjne do znakowania RNA należą do grupy interkalatorów. Czy specyfika ich wiązania do cząsteczek docelowych nie ma wpływu na późniejsze oddziaływania wyznakowanego RNA z błonami?

3. Czy wykorzystywane w eksperymentach liposomy i egzosomy były charakteryzowane pod względem wielkości/średnicy cząsteczek? Różnice w wielkości pomiędzy poszczególnymi populacjami pęcherzyków liposomowych mogą się przekładać na różnice w krzywiznie błony, co może mieć znaczenie w procesie wiązania RNA. Kwestia jest szczególnie ważna, jeśli ostatnie etapy przygotowywania pęcherzyków lipidowych obejmują zamrażanie.

4. Czy zasadnym byłoby rozszerzenie opisanych w pracy badań o pęcherzyki lipidowe o składzie bardziej zbliżonym do cytoplazmatycznego listka MVB, zgodnie z tym co przedstawiono na rysunku 8?

5. Na rysunku 8 uwzględniono „fragment tRNA z modyfikacją hydrofobową” – czy tego typu cząsteczki nie mogłyby spełniać roli uniwersalnego systemu dokującego dla innych RNA w procesie formowania ILV?

W ujęciu formalnym praca wywiera bardzo dobre wrażenie zarówno pod względem stylu wypowiedzi, poprawności gramatycznej i merytorycznej jak i edycji tekstu, ilustracji oraz tabel. Ostatnie z wymienionych elementów pracy zasługują na szczególne słowa uznania ze względu na właściwe uporządkowanie dużych ilości danych przy zachowaniu precyzji przekazu. Tego harmonijnego obrazu nie zakłóca znacząco kilka wspomnianych już wcześniej niefortunnych sformułowań i nieścisłości. Błędy typograficzne i edytorskie są stosunkowo nieliczne, dlatego nie ma potrzeby by je szczegółowo opisywać w recenzji. Tym samym pragnę podkreślić, że drobne niedociągnięcia nie mają większego wpływu na pozytywną recepcję pracy, która z pewnością stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe.

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Rafała Mańki spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r., poz. 1669 z późn. zm.). Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz poświadcza nabycie przez Doktoranta ogólnej wiedzy teoretycznej w reprezentowanej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę moją jednoznacznie pozytywną ocenę wnoszę o dopuszczenie mgr. Rafała Mańki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Aleksander Czogalla, prof. UWr

Kierownik Zakładu Cytobiochemii,

Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski,

ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, Polska

tel. +48 71 375 63 56, e-mail: aleksander.czogalla@uwr.edu.pl

