

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację struktury końca 5' mRNA” mgr. Marceliny Bednarczyk, przygotowanej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Recenzję rozprawy doktorskiej zrobiłem z prawdziwą przyjemnością. Autorka stworzyła ciekawy układ biochemiczny, który pozwala Jej wyznaczyć stałe równowagi wiązania małych cząsteczek (inhibitorów) do enzymów biorących udział w degradacji mRNA. Pierwszym i najważniejszym krokiem w procesie tworzenia tego układu było znalezienie sondy fluorescencyjnej, która świeci wtedy i tylko wtedy, gdy enzym jest aktywny. Wraz z blokowaniem enzymu przez inhibitor fluorescencja w układzie spada. Znając stężenie inhibitora przy którym fluorescencja układu dąży do zera, można wyznaczyć stałą równowagi tworzenia kompleksu enzym-inhibitor i określić ilościowo, które inhibitory najsilniej blokują enzym. Sonda składa się z dwóch części: jedna jest fluorescencyjna i chemicznie związana z drugą, która wygasza tę fluorescencję. Układ takich sond oświetlony laserem o długości fali pochłanianej przez związek fluorescencyjny nie świeci. Gdy dodamy badane enzymy to w wyniku reakcji hydrolizy część fluorescencyjna jest odcinana od części wygaszającej i zaczyna świecić. Analizując natężenie fluorescencji w funkcji czasu Autorka wyznaczyła kinetykę tej reakcji dopasowując do danych eksperymentalnych powszechnie używane równanie Michaelisa-Menten. Autorka musiała stworzyć wiele takich sond, aby wybrać najlepszą do badania inhibicji enzymów hydrolizujących zakończenie mRNA. Zauważyła przy tym, że nawet dodatek niewielkich ilości BSA/surfaktantu niezbędnego do odizolowania ścianek endopory od roztworu ma wpływ na tę reakcję. Stworzenie sondy do ilościowych badań dwóch enzymów D9 i DCP2 uważam, za najważniejsze osiągnięcie Autorki. Wymyślona i zsyntezowana sonda to związek chemiczny oparty na strukturze trifosforanu 7-metyloguanozyny wyznakowanego pirenem. Przy okazji Autorka odkryła, że badane enzymy, których substratem jest duża

cząsteczka mRNA składająca się z setek nukleotydów wykonują reakcje hydrolizy nawet na pojedynczym nukleotydzie znajdującym się w sondzie. Mając takie narzędzie Autorka mogła przeanalizować tysiące związków chemicznych i spośród nich wybrać kilka najmocniejszych inhibitorów wirusowego enzymu D9 oraz ludzkiego enzymu DCP2.

Rozprawa doktorska liczy 145 stron i jest podzielona na trzy części: obszerny (68 stron), jasno napisany wstęp dotyczący kwasów nukleinowych, opis własnych badań (66 stron) oraz obszerną bibliografię (174 pozycje). Badania własne dotyczyły trzech głównych zagadnień: konstrukcji sondy, wyznaczenia najlepszych inhibitorów enzymu D9 oraz enzymu DCP2. Wszystkie opisane badania zakończyły się sukcesem. Wśród krótkich łańcuchów nukleotydów z biblioteki związków chemicznych w grupie profesora Jemielitego i profesor Joanny Kowalskiej największe powinowactwo do enzymu D9 miała 7-metyloguanozyna, zmodyfikowany przez metylację nukleozyd purynowy z kilkoma grupami fosforanowymi. Dla tego związku wartość wskaźnika $IC_{50}=0.077\ \mu M$. Dwu i trójnukleotydy miały ten wskaźnik co najmniej kilkadziesiąt razy wyższy. Następnie Autorka zbadała 1280 związków biologicznie czynnych z biblioteki komercyjnej LOPAC. Związkiem najlepiej wiążącym się z enzymem D9 był Seliciclib (pochodna adeniny) $IC_{50}=0.57\ \mu M$. Badania końcowe dotyczyły testów inhibitorów w obecności mRNA. Enzym D9 był inkubowany z inhibitorem, a następnie do tej mieszaniny dodawano mRNA. Postęp reakcji hydrolizy był analizowany na elektroforezie żelowej. Inhibitory wirusowego enzymu D9 były bardzo specyficzne, gdyż praktycznie w ogóle nie łączyły się z enzymem ludzkim DCP2 czy też z enzymem wirusa krowianki D10. Autorka zamieściła w pracy strukturę enzymu D9 w kompleksie z jednym z inhibitorów uzyskaną w ramach współpracy z grupą profesora Johna Grossa. W bibliotece LOPAC najlepszym inhibitorem enzymu ludzkiego DCP2 jest suramina ($IC_{50}=0.014\ \mu M$), organiczny związek chemiczny znany z hamowania działania wielu enzymów. Badania własne kończą się w części

eksperymentalnej omówieniem stosowanych metod chemicznych i fizycznych do badania reakcji biochemicznych. Część eksperymentalna zawiera szczegółowe protokoły przygotowywania próbek, stężeń, prędkości wirowania próbek etc. Umieszczenie szczegółów przygotowywania próbek i metod pomiarowych na końcu rozprawy doktorskiej podniosło przejrzystość przekazu informacji dotyczących głównych wyników badań.

Mgr. Marcelina Bednarczyk jest współautorką ośmiu publikacji w bardzo dobrych czasopismach takich jak ACS Chemical Biology, Nucleic Acid Research czy Journal of the American Chemical Society. W jednej z nich pt. „Fluorescence-Based Activity Screening Assay Reveals Small Molecule Inhibitors of Vaccinia Virus mRNA Decapping Enzyme” z ACS Chemical Biology mgr. Marcelina Bednarczyk jest pierwszą Autorką. Praca ta z 2022 roku zawiera wyniki Jej badań przedstawione w rozprawie doktorskiej. Publikacje mgr. Marceliny Bednarczyk były w latach 2022-2024 cytowane 40 razy, w tym Jej pierwszo-autorska publikacja dostała 3 cytowania (według Google Scholar).

Praca jest dobrze napisana. Znalazłem nieliczne drobne błędy. Na stronie 59 licznik należy w równaniu zamienić z mianownikiem, żeby to równanie było poprawne. Równania matematyczne w pracy powinny być numerowane. W podpisie po rysunkiem 21 słowo „sarna” zupełnie nie kojarzy się z self-amplifying RNA. Powinno być saRNA.

Podsumowując: **rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim**. Stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Marceliny Bednarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Praca doktorska mgr. Marceliny Bednarczyk ma znaczący wkład w rozwój metodologii badania enzymów zaangażowanych w degradację mRNA, zwłaszcza w kontekście terapii przeciwwirusowych oraz modulacji procesów komórkowych związanych z mRNA.

Metody opracowane przez Autorkę mogą być z powodzeniem stosowane do poszukiwania nowych inhibitorów enzymów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Prof. dr hab. Robert Hołyst,

rhozyst@ichf.edu.pl

Kierownik Zakładu Fizykochemii Miękkiej Materii,

<https://softmatter.ichf.edu.pl/>,

Instytut Chemii Fizycznej PAN, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa