



Wrocław, 23 grudnia 2024

Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Marcin Drąg
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Grab

z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

**pt. „Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności
enzymów degradacji kapu”**

Badania nad optymalizacją strukturalną i funkcjonalną cząsteczek RNA w aspekcie poszukiwania nowych terapii czy narzędzi diagnostycznych przeżywa w ostatnich latach prawdziwy rozkwit, czego dowodem są choćby szczepionki na COVID-19 oparte o mRNA, czy liczne kolejne cząsteczki w zaawansowanych badaniach klinicznych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Katarzyny Grab doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, w szczególności w aspekcie badań nad poszukiwaniem uniwersalnych narzędzi umożliwiających dalszą optymalizację cząsteczek czy poszukiwanie struktur wiodących. Praca została wykonana pod opieką dr hab. Joanny Kowalskiej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, której grupa badawcza specjalizuje się w tego typu badaniach i jest jednym ze światowych liderów.

Głównym celem pracy magister Katarzyny Grab było zaprojektowanie i stworzenie nowych cząsteczek do monitorowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację kapu. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie coraz liczniejszych doniesień literaturowych o kluczowej, acz dalej nie do końca zrozumiałej i wyjaśnionej roli szeregu białek zaangażowanych w kontrolę jakości RNA uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

W aspekcie dorobku naukowego, Doktorantka jest współautorem sześciu publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W jednej pracy mgr Katarzyna Grab jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania,

Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 (71) 320 4526
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

zwłaszcza iż jest to praca wskazana jako jedyna wchodząca w skład rozprawy doktorskiej i opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym (*Nucleic Acid Research*). Co więcej, Doktorantka jest także współautorem zgłoszenia patentowego, a wyniki swoich badań prezentowała na licznych konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Powyższy dorobek naukowy oceniam bardzo wysoko.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Grab została ma klasyczny układ i liczy 197 stron. Wstęp do pracy poprzedza wykaz skrótów, a także abstrakt. Wstęp teoretyczny do pracy jest bardzo obszernym materiałem, w którym mgr Katarzyna Grab skupiła się w pierwszej części na opisie całego systemu biocząsteczek RNA, z ich dokładną charakterystyką, funkcją oraz potencjałem medycznym. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje degradację kapu oraz rolę wybranych enzymów w tym procesie, a następnie strategię syntezy oligonukleotydów oraz znaczenie oraz rolę sond molekularnych. Wstęp teoretyczny jest napisany na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, ilustrowany bardzo czytelnymi rycinami, a zacytowana literatura pochodzi w większości z oryginalnych prac, co świadczy o doskonałym rozeznaniu mgr Katarzyny Grab w literaturze tematu. Liczba cytowanych prac w całej dysertacji jest imponująca i wynosi 294 pozycje. Uważam, iż jest to doskonały materiał do napisania pracy przeglądowej w tym temacie. Co więcej, wstęp teoretyczny doskonale wyjaśnia genezę postawienia hipotezy badawczej przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej oraz określenia celów badawczych wymaganych do jej udowodnienia. Same cele pracy zostały jasno rozpisane i sprecyzowane w kolejnym rozdziale pracy, a także ilustrowane bardzo czytelną grafiką.

W kolejnym rozdziale (Badania własne) przedstawionej do oceny rozprawy, Doktorantka w szczegółowy sposób opisuje warsztat badawczy wykorzystany do udowodnienia hipotezy badawczej. Zaplanowane eksperymenty stanowią logiczną całość, zostały zaplanowane i opisane na wysokim poziomie merytorycznym oraz z dużą szczegółowością, co pozwala na ich powtórzenie przez niezależnych eksperymentatorów. Zamieszczone wykresy, tabele i ryciny są również przygotowane doskonale pod względem edytorskim oraz merytorycznym. Co więcej, należy podkreślić, iż dobór metod badawczych wskazuje, iż przedstawiona do oceny praca ma charakter wybitnie interdyscyplinarny i łączy ze sobą aspekty chemii, biochemii, fizyki oraz biologii molekularnej. Doktorantka wskazuje także precyzyjnie, które elementy pracy były wykonane we współpracy z innymi badaczami.

Moje pytanie dotyczy wyników opisanych w rozdziale 7.6 „Badania kinetyki dekapingu”. Badania kinetyczne, zwłaszcza porównawcze pomiędzy enzymami wymagają szczegółowej wiedzy na temat ilości aktywnego enzymu w badanej próbce. Czy i w jaki sposób Doktorantka miareczkowała badane enzymy i jaka była ich rzeczywista aktywność? Moje kolejne pytanie dotyczy następnego rozdziału 7.7. „Badanie procesu dekapingu w

ekstraktach komórkowych”. W fragmencie „Test przeprowadzono zgodnie z procedurą stosowaną podczas profilowania substratowego enzymów dekapujących. Niski poziom intensywności fluorescencji, uzyskany dla sond inkubowanych jedynie z lizatem komórkowym, wskazuje na obecność w próbce enzymów zdolnych zarówno do dekapingu badanego RNA, jak i jego procesywnej degradacji (Rysunek 50A, B). Poniższy eksperyment nie pozwala niestety wskazać konkretnego mechanizmu degradacji sondy (może to być zarówno degradacja prowadzona przez endo- jak i egzonukleazy).” Czy Doktorantka próbowała zanalizować jakie enzymy kontrolują ten proces w określonych liniach komórkowych? Czy była przeprowadzona analiza literatury w aspekcie dostępnych badań proteomicznych tych właśnie komórek pod względem obecności oraz potencjalnej aktywności enzymatycznej? Co więcej, czy nie byłoby możliwe przeprowadzenie analizy MALDI TOF w kierunku identyfikacji enzymów zdolnych zarówno do dekapingu badanego RNA, jak i jego procesywnej degradacji? Proszę tutaj o szerszą dyskusję.

W rozdziale Podsumowanie mgr Katarzyna Grab w dojrzały sposób i na wysokim poziomie merytorycznym podsumowuje wszystkie wyniki swoich badań, ich wartość w aspekcie już dostępnej wcześniej wiedzy w tym zakresie, a także wskazuje na dalsze możliwe kierunki badawcze. Z pewnością można uznać, iż główne tezy hipotezy badawczej zostały zbadane i udowodnione, a wiele otrzymanych wyników ma charakter odkrycia naukowego. Uważam, iż wyniki pracy mają wysoce oryginalny, a co szczególnie ważne, także wysoce nowatorski charakter i z pewnością stanowią doskonałą bazę dla przyszłych badań.

Podsumowując część merytoryczną przedstawionej do oceny dysertacji, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Katarzyny Grab uważam:

1. Opracowanie testu intensywności fluorescencji (FLINT) opartego na strukturach aptamerowych, który umożliwia wysokoprzepustową ocenę specyficzności substratowej enzymów hydrolizujących kap.
2. Wykazanie, iż sondy zawierające sekwencję aptameru Broccoli mogą być wykorzystane do stworzenia testu FLINT, który umożliwia szybką i efektywną ocenę zdolności enzymów dekapujących do rozpoznawania i degradacji transkryptów zawierających kanoniczne i niekanoniczne analogi struktury kapu.
3. Wykazanie, iż sondy Broccoli mogą być wykorzystane do ewaluacji i charakterystyki właściwości kinetycznych inhibitorów enzymów dekapujących.

4. Wykazanie, iż test FLINT spełnia wszystkie kryteria wysokoprzepustowych badań przesiewowych (HTS), co umożliwiło precyzyjne profilowanie i bezpośrednie porównanie preferencji substratowych białek zaangażowanych w proces degradacji RNA.
5. Opracowanie, synteza i selekcja sond działających w oparciu o rezonansowy transfer energii Förstera oraz mechanizm wygaszania fluorescencji, których struktura gwarantuje selektywność wobec poszczególnych enzymów dekapujących.

Podsumowując wartość merytoryczną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Grab, można zdecydowanie stwierdzić, iż otrzymane wyniki mają znamiona odkrycia naukowego, a przedstawiony w pracy materiał badawczy ma nowatorski charakter.

Ostatni, chyba najbardziej obszerny rozdział przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej to „Procedury eksperymentalne”, w którym Doktorantka bardzo dokładnie opisuje wszystkie detale syntetyczne i analityczne prowadzonych eksperymentów. Jeszcze raz należy podkreślić ich bardzo wysoki poziom oraz szczegółowość pozwalającą na powtórzenie przez niezależnego eksperymentatora.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Katarzyny Grab została przygotowana bardzo starannie i bez zarzutów. Zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Katarzyny Grab z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pt. „Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów degradacji kapu” ma oryginalny oraz wysoce nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób udowodniła postawioną hipotezę badawczą i zrealizowała zaplanowane cele badawcze. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Grab do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, podkreślając bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, doskonały dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg

