



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej



Łódź, 26 grudnia 2024

Dr hab. inż. Grażyna Leszczyńska, prof. Uczelni

Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny

90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116

Tel. +48 313150

grazyna.leszczyńska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyna Grab pt. „Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów degradacji kapu”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Grab została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Kowalskiej na Uniwersytecie Warszawskim. Zrealizowany projekt doktorski stanowi ściśle zintegrowany cykl badań poświęcony analizie metabolizmu mRNA związanego z hydrolizą kapu – konserwatywnego w komórkach organizmów eukariotycznych elementu struktury, którego wpływ na stabilność mRNA oraz procesy komórkowe, w tym proces translacji, mają znaczenie pierwszorzędne. W kategoriach ogólnych Doktorantka poszukiwała narzędzi biochemicznych które umożliwiłyby ocenę przebiegu procesów degradacji kapu przez enzymy dekapujące, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Proces dekapingu i następczej degradacji mRNA jest naturalnym mechanizmem jaki funkcjonuje w komórce w celu usunięcia uszkodzonych cząsteczek mRNA, zaś zaburzenia tego procesu zostały bezpośrednio powiązane z występowaniem licznych chorób człowieka. Ponadto zagadnienia trwałości i stabilności mRNA są kluczowe w projektowaniu leków opartych o strukturę mRNA które od czasów pandemii w 2020 roku stanowią intensywnie eksplorowany obszar badawczy. Stąd, nie mam żadnych wątpliwości, że podjęta w doktoracie tematyka doskonale wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź, budynek A27

tel. +48 42 631-31-40, w3i32@adm.p.lodz.pl

Adres do korespondencji:

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź



Praca doktorska mgr Grab została przygotowana w formie tradycyjnej. Liczący blisko 200 stron dokument stanowi dość obszerne dzieło co jest wynikiem szerokiego zakresu prac badawczych jakie Doktorantka zrealizowała w ramach projektu doktorskiego. Na zasadniczą część dysertacji składają się: *Streszczenie; Przegląd literaturowy; Badania własne, Podsumowanie; Procedury eksperymentalna oraz Bibliografia* licząca blisko 300 odnośników. Wymienione części pracy doktorskiej uzupełnia wykaz skrótów, informacja o źródłach finansowania badań, całkowitym dorobku naukowym Doktorantki oraz materiały uzupełniające. Praca jest napisana językiem fachowym; ilość błędów literowych jest niewielka; oprawa graficzna pracy jest na bardzo wysokim poziomie, zwłaszcza rysunki poglądowe, które zachowują właściwe proporcje ogólności do szczegółowości co sprzyja zachowaniu czytelności przekazu.

Główną podstawę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Grab stanowi artykułów opublikowany w bieżącym roku w *Nucleic Acid Research*, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem. W dorobku naukowym Doktorantki znajduje się jeszcze 5 publikacji. Wszystkie zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a ich różnorodność tematyczna pozwala sądzić, że Doktorantka posiada wszechstronną wiedzę oraz umiejętności z zakresu chemii organicznej, biochemii, biologii chemicznej i chemii medycznej.

Pani Grab jest również współautorką patentu zgłoszonego i przyznanego w trybie PTC. Na uwagę zasługuje aktywność konferencyjna kandydatki, która obejmuje bardzo prestiżowe konferencje międzynarodowe takie jak Gordon Conference czy IRT. Wartość naukowa oraz forma prezentacji zostały zauważone przez organizatorów tych konferencji i nagrodzone.

Przechodząc do recenzji samej pracy doktorskiej, w pierwszej kolejności skoncentruję się na rozdziale *Przegląd literaturowy*. Stanowi od kompendium wiedzy niezbędnej do zrozumienia i oceny badań które Doktorantka wykonała. Powiedziałabym nawet, że rozdział ten ma duży walor dydaktyczny, głównie dzięki temu, że autorka umiejętnie przechodzi od ogółu do szczegółu, kreśląc nawet rys historyczny niektórych kluczowych wydarzeń/osiągnięć. Zawartość tej części rozprawy uwzględnia krótką charakterystykę wszystkich rodzajów kodujących i niekodujących RNA w komórce, ze szczególnym podkreśleniem tych elementów transgenomu które natura wyposażyla w strukturę kapu; charakterystykę ścieżek komórkowej degradacji uszkodzonych mRNA oraz enzymów biorących w niej udział; strategię chemiczne i enzymatyczne syntezy oligonukleotydów ze szczególnym uwzględnieniem metod wprowadzania kapu na 5'-koniec (m)RNA;

2

rodzaje i charakterystykę sond molekularnych. Ta część pracy została opatrzona blisko 270 odnośnikami co świadczy o wielkim nakładzie pracy jaki Doktorantka poczyniła aby wykazać się rzetelnością w opisanych treściach. *W tym miejscu Recenzentowi nasuwa się pytanie: Wobec istnienia dwóch ścieżek degradacji wadliwych mRNA: od 3' do 5' oraz w kierunku odwrotnym, czy któraś z dróg jest bardziej preferowana w komórce? Proszę o wymienienie typu uszkodzeń mRNA które determinują kierunek degradacji i czy zawsze kierunek degradacji w komórce jest warunkowany konkretnym uszkodzeniem mRNA? Czy modyfikowane nukleozydy znajdujące się w rejonach niekodujących i kodującym mRNA są w jakikolwiek sposób związane z procesem dekapingu i degradacji wadliwych mRNA?*

Część *Badania własne* Doktorantka rozpoczyna od skondensowanego przedstawienia *Planu badań*, które ilustruje doskonałym rysunkiem poglądowym.

Pierwsza część badawcza Kandydatki była poświęcona opracowaniu testu fluorescencyjnego (HT-FLINT) do wysokoprzepustowej analizy aktywności i specyficzności substratowej siedmiu endogennych enzymów dekapujących pochodzących z różnych organizmów. Analizę oparto na aptamerowej sekwencji nukleotydowej Broccoli wzbogaconej o fragment ponad 30 nukleotydów, który oddziela kap od aptameru Broccoli. Doktorantka przeprowadziła syntezę trzech trinukleotydowych analogów kapu (kap-0, kap-1, TMG kap) oraz NAD kap, FAD kap i UDP-glukoza kap stosując chemiczną syntezę dinukleotydów które po aktywacji sprzęgnięto z difosforanami guanozyny bądź monofosforanami ryboflawiny i glukozy. Jedynie do wprowadzenia nukleozydu nikotynamidowego zastosowano rozwiązanie odwrotne, co pozwoliło podwyższyć wydajność sprzęgania o około 40%. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzona przez Doktorantkę wieloetapowa synteza soli trietyloamoniowej difosforanu 2,2,7-trimetyloguanozyny jak również olbrzymi wysiłek jaki włożyła w oczyszczanie tri- i di-nukleotydowych analogów kapu aby sprawdziły się w roli inicjatorów w reakcji transkrypcji in vitro (IVT). Syntezy 70-nukleotydowych sond zostały wykonane na matrycy DNA kodującej fluorogeniczną, aptamerową sekwencję Brocci w obecności polimerazy RNA T7. Po enzymatycznym usunięciu matrycy DNA, RNA wyizolowano metodą ekstrakcji i oczyszczono za pomocą RP HPLC. Jakość transkryptu zweryfikowano za pomocą elektroforezy żelowej PAGE z powinowactwem do kwasu 3-akryloamidofenyloboronowego (APB) aptamerowych RNA. *I tu chciałabym prosić o komentarz dotyczący obecności kilku prążków (w liczbie od 4 do 2) na torach 1, 2, 4, oraz zaspokojenie mojej ciekawości jakie zmiany wprowadzono w procedurze wykorzystującej APB, że wróciła do praktyki po ponad 40-latach od jej odkrycia?*

3

Otrzymane sondy aptamerowe zostały wykorzystane do ustalenia specyficzności substratowej siedmiu enzymów dekapujących, w zaprojektowanym teście Flint. Do kwantyfikacji hydrolizy kapu zastosowano fluorogeniczny ligand DFHBI-1T, który pozwala na pomiar emisji fluorescencji w sytuacji gdy kapowane RNA nie jest substratem dla enzymu dekapującego. W przeciwnym razie, dekaping i następcza degradacja egzonukleolityczna aptameru przez enzym Xrn1 nie daje odczytu fluorescencji. Po optymalizacji, test Flint został poddany ocenie przydatności w wysokoprzepustowych testach przesiewowych z użyciem sondy kap 0-aptamerowej. Przydatność testu do oceny inhibicji dekapingu została pozytywnie zweryfikowana dla białka dekapującego VACV D9 wirusa krowianki oraz hDcp2/Dcp1.

Opracowaną procedurę profilowania substratowego enzymów dekapujących z powodzeniem wykorzystano do oceny degradacji kapu w warunkach przypominających układ biologiczny, mianowicie w lizatach komórkowych HEK293F. Kandydatka wyraziła opinię o zasadności prowadzonych badań w kontekście możliwości przewidywania ścieżek rozpadu egzogenne dostarczanych mRNA. *Biorąc pod uwagę profil działalności naukowej grupy badawczej Doktorantki, czy opracowany przez Kandydatkę test Flint miał okazję być testowany w badaniu metabolizmu kap-modyfikowanych RNA o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym?*

Po ustaleniu zakresu aktywności enzymów dekapujących, kolejnym zadaniem badawczym jaki postawiła sobie Doktorantka było opracowanie dwuznakowanych sond fluorescencyjnych ukierunkowanych na pojedynczy cel molekularny które umożliwiłyby selektywne monitorowanie aktywności enzymów dekapujących w czasie, w układach biologicznych. Wyselekcjonowane do tego celu znaczniki zostały dobrane tak aby tworzyły parę fluorofor-wygaszacz bądź donor-akceptor. Sondy o składzie znacznik 1-linker-kap-RNA₃₅-linker-znacznik 2, zostały otrzymane na dwa sposoby, różniące się metodą wprowadzania znacznika na koniec 5': kotranskrypcyjnie, wykorzystując znakowany analog kapu jako starter dla transkrypcji *in vitro*, a w sytuacji, braku rozpoznania wyznakowanego kap-trinukleotydu przez polimerazę T7 RNA lub wrażliwości enzymu na warunki reakcji transkrypcji zastosowano posttranskrypcyjne znakowanie RNA. W pierwszym przypadku przeprowadzono syntezę trinukleotydu z linkerem aminoalkilowym połączonym wiązaniem karbaminianowym z 2' lub 3'-grupą hydroksylową m1G; terminalna grupa aminowa linkera w kolejnej reakcji została sprzęgnięta z barwnikiem Cy3, sCy5, FAM, BHQ-2 i BHQ-3. Do wyznakowania NAD-kapu wykorzystano reakcję *click* pomiędzy N₃-sfunkcjonalizowanym barwnikiem i kapem z grupą alkinylową. Tak przygotowane analogi kapu zostały wykorzystane w syntezie znakowanego kap-RNA, przy tym oceniono, że zastosowanie dłuższych 6-węglowych

4

linkerów aminoalkilowych obniża wydajność reakcji IVT. W metodzie posttranskrypcyjnej zastosowano reakcję *click* pomiędzy kap-RNA₃₅ sfunkcjonalizowanym linkerem azydkowym a znacznikiem w postaci barwnika sCy5 i sCy3 połączonego z DBCO. Stosując metodę posttranskrypcyjnego znakowania RNA wprowadzono barwniki z serii BHQ (wyposażone w DBCO), jednocześnie z barwnikiem JF646 na 3'-końcu sondy przy zastosowaniu dwóch reakcji PORA oraz *click*. W przypadku pozostałych 5'-znakowanych konstruktów kap-RNA₃₅, znakowanie końca 3' zostało przeprowadzone na drodze enzymatycznej ligacji przez ligazę T4 RNA 1. Dwuznakowane sondy fluorescencyjne oczyszczono metodą RP HPLC a czystość potwierdzono za pomocą elektroforezy żelowej z markerem wielkości. *W tym miejscu pozwolę sobie na komentarz dotyczący analizy poprawności struktury oligonukleotydów RNA, albowiem nie zauważyłam aby Doktorantka stosowała techniki spektrometrii mas do analizy dłuższych oligomerów.*

Otrzymane sondy zostały scharakteryzowane po kątem właściwości emisyjnych, fotostabilności, stabilności chemicznej w różnych pH, buforach czy temperaturze. Zoptymalizowane warunki zastosowano w analizie enzymatycznego dekapingu RNA gdzie kluczowa była protekcja próbek przed światłem, zwinięcie sondy RNA w poprawną strukturę, rozcieńczenie próbki buforem z jonami Mg²⁺ po dodaniu enzymu dekapującego i końcowo pomiar zmian fluorescencji na spektrofлуorymetrze. Stosując tę strategię, przeprowadzono monitorowanie aktywności dekapującej enzymów Dcp2 oraz mDXO z wykorzystaniem kilku sond, z których 4 okazały się szczególnie obiecujące (A3 i A4, zawierające kap-0 oraz barwniki cyjaninowe akceptowane przez Dcp2 oraz F1 i F2 zawierające dinukleotyd ppApG, ze znacznikami FAM/sCy5, akceptowane przez mDXO). Sonda A4 została z powodzeniem zastosowana do bioobrazowania procesu hydrolizy kapu w układzie biologicznym, co zrealizowano poprzez bezpośrednią mikroiniekcję sondy do komórek HeLa i rejestrowaniu zmian efektywności FRET w czasie, za pomocą mikroskopii konfokalnej.

W końcowym rozdziale *Część eksperymentalna* Doktorantka opisała protokoły syntezy modyfikowanych nukleotydów, dinukleotydów w fazie stałej, aptamerowych i podwójnie znakowanych sond molekularnych oraz stosowanych do ich wytworzenia reakcji enzymatycznych. Ponadto Doktorantka dostarczyła informacji praktycznych dotyczących warunków pomiarowych i testu Flint. *Tu w opisie postsyntetycznej deprotekcji dinukleotydów za pomocą AMA można stwierdzić rozbieżność warunków reakcyjnych w stosunku do tych opisanych w Badaniach własnych.*

Zanim przejdę do wniosków końcowych pragnę podkreślić dwie mocne strony Doktorantki. Krytyczne podejście do wyników swoich badań oraz postawionych przez siebie tez co świadczy o dojrzałości naukowej Kandydatki oraz szeroki wachlarz umiejętności praktycznych jakie posiada, obejmujący syntezę organiczną, analizę spektroskopową, chromatografię, biochemię i biofizykę.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje nowatorskie rozwiązanie postawionego przed Doktorantką problemu badawczego, czym wnosi istotny wkład w rozwój dziedziny. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych przez Doktorantkę prac badawczych, aktualność podejmowanej problematyki badawczej oraz użyteczność opracowanych metod w badaniu metabolizmu mRNA jak i projektowaniu leków opartych o jego strukturę. Tym samym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i wnoszę o dopuszczenie mgr Katarzyny Grab do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Q. Lenczyńska

