

Warszawa, 4.12.2024

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

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Grab pod tytułem „**Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów degradacji kapu**” wykonana została w Instytucie Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod promotorską opieką dr hab. Joanny Kowalskiej. Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dotyczą syntezy i charakterystyki sond fluorescencyjnych opartych na strukturze RNA, wykorzystujących zjawisko rezonansowego przeniesienia energii do monitorowania enzymatycznej degradacji kapu 5' mRNA. Ze względu na szybki rozwój strategii terapeutycznych bazujących na regulacji RNA, metody pozwalające na monitorowanie funkcji enzymów degradujących 5' RNA kap, ich specyficzności, dynamiki działania oraz lokalizacji komórkowej, stały się pilnym wyzwaniem współczesnej biologii i medycyny precyzyjnej.

Celem recenzowanej rozprawy było opracowanie metody umożliwiającej charakterystykę preferencji substratowych enzymów biorących udział w degradacji kapu, identyfikację ich inhibitorów, a w rezultacie lepsze zrozumienie procesów regulacji RNA. Doktorantka zaprojektowała i stworzyła metodę o wysokiej przepustowości, opartą na fluorogenicznych sondach aptamerowych RNA, zawierających osiem różnych analogów kapu na końcu 5' RNA. Potwierdziła skuteczność opracowanej przez siebie metody w badaniu specyficzności substratowej wybranych hydrolaz. Ponadto wykazała skuteczność stworzonego podejścia eksperymentalnego w ocenie inhibitorów wirusowych enzymów degradujących kap oraz przeprowadziła badania kinetyki tego procesu.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i liczy 197 stron. Układ pracy jest standardowy dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym. Wyniki stanowiące część rozprawy zostały opublikowane w formie artykułu naukowego pt. „Aptamer-based assay for high-throughput substrate profiling of RNA decapping anzymes” w bardzo dobrym, tematycznym, recenzowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym tj. Nucleic Acid Research, z wiodącym autorstwem pani mgr Katarzyny Grab. Praca została doskonale napisana, bardzo ładnym językiem.

Cel pracy jest jasno sformułowany. Rozdział *Wstęp* liczy 52 strony, zestawia wszystkie ważne wiadomości potrzebne do zrozumienia rozprawy i doskonale wprowadza w jej tematykę. Przedstawia budowę i podział kwasów rybonukleinowych, przegląd wybranych enzymów degradujących kap oraz podejścia eksperymentalne syntezy oligonukleotydów. Uważam, że ta część niniejszej rozprawy doktorskiej powinna stanowić obowiązkową lekturę dla osób zaczynających badania naukowe nad mechanizmami regulacji RNA.

Najważniejszym elementem rozprawy jest rozdział *Badania własne*. Wyniki uzyskane przez doktorantkę są bardzo dobrze udokumentowane i w zdecydowanej większości nie budzą żadnych zastrzeżeń ze strony recenzenta. Moje wątpliwości pojawiają się jedynie w odniesieniu do analizy ostatniego podrozdziału (9.3) oraz Ryciny 70, przedstawiającej wyniki własne doktorantki. Czy dobrze rozumiem, że w badaniach obrazowania fluorescencyjnego degradacji kapu w komórkach HeLa analizowano efekt działania endogennych enzymów odpowiedzialnych za degradację kapu? Chciałbym się dowiedzieć, w jaki sposób Doktorantka zadbała o specyficzność obserwowanych zmian w sygnale fluorescencji lub – jeśli nie zostało to uwzględnione – jak należałoby tę specyficzność zagwarantować. Czy obserwowany efekt może być wynikiem nie tylko enzymatycznej hydrolizy kapu, lecz także rezultatem innych procesów, takich jak aktywacja proteaz, stres oksydacyjny, nieenzymatyczna degradacja RNA, fototoksyczność lub innych mechanizmów będących konsekwencją złego stanu fizjologicznego komórek? Dodatkowo chciałbym zapytać, skąd wynika różny czas rejestracji obrazów fluorescencyjnych $t = 90$ min a $t = 75$ min dla poszczególnych komórek pokazanych na panelach ryciny 70. Czy był on podyktowany przeżywalnością komórek do czasu $t = 75$ min od podania sondy? Chciałem również zwrócić uwagę na jakość przedstawionej ilustracji. Rycina 70 jest bardzo niskiej rozdzielczości, a użyte pseudokolorowe mapy nie pozwalają na dokładną ocenę efektywności rezonansowego przeniesienia energii. Na rycinie 70 brakuje skali, która umożliwiłaby jednoznaczne określenie, czy obserwowane obiekty rzeczywiście mają rozmiary zbliżone do komórek HeLa. W mojej ocenie przeprowadzenie barwienia organelli komórkowych lub zastosowanie dodatkowych markerów fluorescencyjnych znakujących białka charakterystyczne dla komórek HeLa pomogłoby ocenić stan fizjologiczny badanych komórek.

Czy Doktorantka rozważała zastosowanie skalibrowanej metody np. pomiaru czasów życia fluorescencji zamiast zmian w intensywności fluorescencji do oceny efektywności FRET lub przeprowadzenie ilościowej analizy uzyskanych wyników? Wprowadzenie takich rozwiązań mogłoby zwiększyć wiarygodność oraz klarowność prezentowanych na rycinie 70 danych.

Rozprawę doktorską kończy zwięzłe i bardzo dobre podsumowanie uzyskanych wyników. Uwagę zwraca także obszerny, przejrzysty i niezwykle ważny rozdział *Procedury eksperymentalne*. Rozdział ten bez wątpienia ułatwi przeprowadzanie podobnych eksperymentów kolejnym badaczom.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Grab oceniam bardzo wysoko. Praca została doskonale napisana, a przedstawione w niej wyniki pozwoliły na zaprojektowanie i stworzenie przez doktorantkę sond molekularnych do monitorowania aktywności enzymów degradujących kap. Jest to ważne narzędzie, które poszerza naszą wiedzę na temat mechanizmów regulacji RNA i, co równie istotne, otwiera nowe kierunki badań. Przedstawione wyżej drobne uwagi wynikają wyłącznie z ciekawości i nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Grab. Ze względu na ważność tematyki i wysoki poziom merytoryczny pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, oraz wymagań stawianych pracom doktorskim w Uchwale nr 157 Senatu Uniwersytetu Warszawskiego z dnia 29 czerwca 2022 r. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Grab do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Włodarczyk

