

Warszawa, 17 sierpnia 2023 r.

dr hab. Remigiusz Worch
Pracownia Biofizyki Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Olgi Perzanowskiej pt. „Synteza i biofizyczna charakterystyka modyfikowanych fragmentów ogona poli(A) jako narzędzi do manipulowania metabolizmem mRNA”

Technologie wykorzystujące zastosowanie syntetycznych cząsteczek informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA) są rozwijane od ok. 30 lat i stają się coraz lepszym i skuteczniejszym narzędziem w walce z chorobami nowotworowymi czy wirusowymi. Niedawna pandemia SARS-CoV-2 była świetnym przykładem zastosowania technologii mRNA wykorzystanej jako szczepionki przeciwwirusowej. Mimo ogromnego postępu w rozwoju tej technologii, istnieje wiele otwartych problemów związanych ze stabilnością, odpornością na degradację oraz potencjałem translacyjnym cząsteczek mRNA. Przedstawiona praca doktorska Pani mgr Olgi Perzanowskiej wpisuje się w nurt badań, których celem jest zbadanie własności fragmentów cząsteczek mRNA pod kątem możliwości manipulowania wybranymi aspektami metabolizmu komórek, do których mRNA może być wprowadzone. W pracy zajęto się fragmentem ogona poli(A), co jest o tyle istotne, że degradacja mRNA, decydująca o czasie półtrwania tego rodzaju molekuł, a tym samym determinująca ilość białek kodowanych przez mRNA, rozpoczyna się właśnie od usunięcia (tzw. deadenylacji) końca 3'. Tematyka badawcza podejmowana w doktoracie mgr Olgi Perzanowskiej wpisuje się, moim zdaniem, w nie tylko niezwykle interesującą aktywność naukową, ale również bardzo istotną z medycznego punktu widzenia oraz w aspekcie oczekiwań społecznych.

Przedmiotowa praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Jemielitego z Laboratorium Chemii Biologicznej Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej z Zakładu Biofizyki Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Praca ta świetnie oddaje interdyscyplinarny charakter pracy zespołu, kierowanego przez wspomnianych opiekunów pracy, gdzie wychodząc od syntetycznej chemii organicznej nukleotydów, mamy również miejsce na badania z użyciem technik biologii i biofizyki molekularnej. Podstawę rozprawy stanowią wyniki prac badawczych opublikowanej w pierwszo-autorskiej pracy Doktorantki (*Chem. Eur. J.* 2022) oraz jednej, jak dowiadujemy się ze str. 12 rozprawy, także

pierwszo-autorskiej pracy będącej w przygotowaniu. Wart podkreślenia jest fakt, że Doktorantka doskonaliła swój warsztat naukowy w trakcie realizacji innych zadań badawczych, czego efektem jest, także pierwszo-autorska (!) praca w piśmie *Scientific Reports* z 2021 r. oraz współautorstwo pracy w *Nature Chemistry* (wg informacji z doktoratu, zaakceptowanej do druku). Dodając do tego wystąpienia ustne na konferencjach oraz współautorstwa doniesień konferencyjnych (łącznie 10 pozycji) uważam dorobek naukowy Doktorantki za ponad przeciętny i godny podziwu.

Przedstawiona praca doktorska jest obszerna (192 str.), napisana jest po polsku w klasycznym układzie prac naukowych, który pokrótce tutaj omówię. Pracę otwiera spis treści, który Autorka podzieliła na dość szczegółowo wydzielone punkty. Uznaję to jako atut ułatwiający lekturę pracy (szczególnie zważywszy na możliwość przechodzenia do poszczególnych części tekstu w dostarczonym pliku pdf). Po zamieszczeniu wykazu skrótów, informacji o dorobku naukowym oraz streszczeniu, Czytelnik przechodzi przez główne części pracy, nazwane przez Doktorantkę jako : I) cel, II) część literaturową, III) badania własne, które zamknięte są zwięzłym podsumowaniem (część IV). Całość kończy część eksperymentalna (część V) oraz obszerny (409 pozycji) spis literaturowy (część VI). Omawiając układ pracy, chciałbym docenić fakt, że Doktorantka wyraźnie oddzieliła część „badania własne”, podkreślając gdzie ma miejsce jej wkład własnej pracy. Jednocześnie, równie wyraźnie, zaznaczyła, które z uzyskanych wyników są autorstwa dr. Mirosława Śmiateńskiego (dotyczyły głównie badań z użyciem lizatu z retikulocytów króliczych). Równie wyraźną informację znajdziemy odnośnie autorstwa grafik, ponieważ Doktorantka zaznacza w części „Cel pracy” (str. 17) własne autorstwo, o ile nie zaznaczono inaczej (w przypadku kiedy posila się gotową grafiką z innego, cytowanego artykułu). Tu warto zaznaczyć, że szata graficzna ułatwia lekturę rozprawy - Autorka przygotowała aż 95 rysunków (nie licząc nienumerowanych wzorów strukturalnych w części eksperymentalnej). W dużej mierze zawarte są tam informacje dotyczące profili chromatograficznych oraz widm spektrometrii mas, ale nie dziwi to biorąc pod uwagę, że w projekcie doktorskim wykonano blisko 30 syntez chemicznych oligonukleotydowych analogów końca poli(A). Wśród przygotowanych elementów graficznych ciekawym pomysłem jest przygotowanie infografiki stanowiącej podsumowanie planu badań (s. 92). Jedynym mankamentem, jaki zauważyłem oceniając układ pracy, jest brak podsumowania uzyskanych wyników w sposób bardziej szczegółowy w streszczeniu (a jest o czym pisać). Część informacji powiela się w częściach: cel pracy, streszczenie oraz plan badań, niejako przygotowując Czytelnika do „dania głównego”, niemniej jednak, streszczenie powinno odzwierciedlać całkowity charakter pracy i po jego lekturze Czytelnik powinien mieć pełniejszy obraz badań, który uwzględnia zarówno uzyskane wyniki, jak i wnioski z niego płynące.

Oceniając zawartość merytoryczną pracy, nie sposób jest nie docenić mnogości uzyskanych wyników. Zsyntetyzowane zostały łącznie 29 analogi poli(A). Doktorantka rozpoczęła projekt przygotowaniem dodakamerowego oligonukleotydu z alkilową modyfikacją umożliwiającą kowalencyjną modyfikację znacznikami fluorescencyjnymi (metoda tzw. „klikania”, ang. *click-chemistry*). Do przeprowadzenia późniejszej



serii badań wybrano fluorofor, który dołączony kowalencyjnie do oligonukleotydu, był najbardziej odpowiedni w badaniach termoforetycznych (5'-FAM-A₁₂). Następnie przeprowadzono badania oddziaływań analogów poli(A) z N-końcową częścią białka PABP (*poly(A) Binding Protein*) z otrzymanym barwionym analogiem, jak również w sposób kompetycyjny. Odporność analogów poli(A) na specyficzną degradację została zbadana z zastosowaniem enzymu - deadenylazy CNOT7. Badania te zostały rozszerzone o inhibicję translacji w lizatach retikulocytów króliczych. W drugiej części projektu Doktorantka wykonała syntezy wybranych, chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów w celu późniejszego sprzęgania ich metodą ligacji z innymi oligonukleotydami oraz mRNA. Następnie przeprowadzono badania ekspresji modyfikowanego mRNA w trzech liniach komórkowych.

Odnosnie wyników, uważam za cenne szczegółowe przebadanie oddziaływań szeregu analogów poli(A) w kontekście oddziaływania z białkiem PABP w sposób ilościowy. Wybrane analogi pozwoliły na ocenę zarówno sposobu modyfikacji (takich jak np.: 2'-O-metylacja, wprowadzenie wiązania tiofosfoestrowego, 2'-fluoroadenozyny, N6-metyloadenozyny czy guaniny), jak i miejsca występowania modyfikacji. Pozwoliło to na obserwację faktu, iż modyfikacje w środkowej części łańcucha prowadzą do spadku powinowactwa (w różnym stopniu, w zależności od rodzaju modyfikacji). Wprowadzenie modyfikacji na końcach oligonukleotydów skutkowało miejscami wzrostem powinowactwa, jak również poprawą odporności na degradację enzymatyczną, zarówno samych oligonukleotydów, jak i ich koniugatów z mRNA. Pozwoliło to na przyjęcie strategii przygotowania mRNA w badaniach na liniach komórkowych jako produktów ligacji jego 3' końca oraz wybranych 5'-monofosforanów dinukleotydów. Wyłoniono w ten sposób dwa szczególnie interesujące związki, oba posiadające metylowaną rybozę w pozycji 2' oraz jeden z nich dodatkową będący izomerem wiązania tiofosfodiesterowego (w pracy oznaczone odpowiednio jako pAp_sA_m D1 oraz pApA_m), które wprowadzone jako 3'-końcowe modyfikacje mRNA dawały zadawalającą ekspresję konstruktów w wybranych trzech liniach komórkowych oraz zwiększoną odporność na degradację enzymatyczną. Biorąc pod uwagę, zaobserwowaną także w pracy, różnicę ekspresji konstruktów w liniach komórkowych (być może wynikającą ze specyfiki tkankowej komórek), w mojej opinii, są to wyniki o dużym potencjale aplikacyjnym w dynamicznie rozwijającej się dzisiaj wakcynologii opartej o techniki mRNA.

Jako mankamenty przedstawionej pracy widziałbym następujące punkty:

1. Pewną trudnością w lekturze rozprawy jest stosowanie miejscami podwójnej notacji analogów poli(A). O ile Rys. 53 na str. 96 zawiera pomocny schemat blokowy, z kolorowymi kodami odpowiadającymi rodzajowi modyfikacji, tak niejasnym dla Czytelnika może być dlaczego niektóre z nich wyglądają tak samo (np. Ap_s1 i Ap_s2) oraz jak mają się numery analogów do miejsca modyfikacji (w obu wspomnianych związkach dotyczą pozycji 10). Dopiero z dalszej, wnikliwej lektury, Czytelnik może zrozumieć, że chodzi o dwa izomery powstające przy modyfikacji tiofosfoestrowej. Ta dwoistość powtarza się w kilku miejscach pracy. Np. Rys. 54 na str. 97 zawiera informację dla analogu

oznaczonego $A_{10}A_mA$, natomiast z informacji w podpisie dowiemy się, że to związek tożsamy z A_m1 ze schematu na Rys. 53. Nie wiem czy dla zwiększenia czytelności nie byłoby lepszym pomysłem stosowanie jednego, spójnego typu oznaczenia, które zawiera więcej informacji o analogu.

2. Brakuje mi równań użytych do dopasowania w eksperymentach termoforetycznych (Rys. 30, str. 105) wraz z użytymi parametrami: K_d , F_{B^*} , F_{AB^*} w stosowanym modelu wiązania 1:1 oraz parametrów użytych do dopasowania w modelu 1:2 na panelu C wspomnianego rysunku (brak parametrów i ich wartości) dla eksperymentu z 5'-BDP-FL- A_{12} (A_0 -4), który wyraźnie różni się od pozostałych.
3. Brakuje mi także dokładniejszego wyjaśnienia sposobu przejścia z pozornej wartości stałej dysocjacji (K_{Dapp}) na wartość dokładną (K_D). Uważam, że zdanie ze str. 107: „Wykorzystując opisaną w literaturze metodę dopasowania globalnego (396) (...)” jest zbyt ogólnikowe, tym bardziej, że różnica między wartościami K_{Dapp} a K_D jest blisko czterdziestokrotna dla związku A_{12} . Cytowany artykuł (396): Schuermann *et al. Anal. Biochem.* **496**, 79–93 (2016) dotyczy w głównej mierze określenia limitacji stosowania techniki termoforezy mikroskalowej ze względu na kinetykę wiązania dla symulowanych danych. Zawiera on również informacje dotyczące dopasowań stosowanych w tej technice, być może stosowanych również w komercyjnym oprogramowaniu stosowanym przez Autorkę (Palmist). Poprosiłbym o komentarz dotyczący stałych pozornych oraz dokładnych oraz przeliczania jednych na drugie.
4. Na Rys. 67 (str. 112) przedstawiającym pozorne stałe oddziaływań czytamy w opisie, że „wyniki przedstawiono w kolejności od najwyższej do najniższej wartości”, podczas gdy słupek dla Ap_{S8} jest wyższy od obu sąsiadujących z nim związków. Dlaczego?
5. Uwaga o charakterze marginalnym. W pracy zdarzają się nieliczne żargonowe sformułowania typu detektor „czerwony” lub „niebieski”. Tu lepiej byłoby podać zakres długości fal rejestrowanego światła. W mojej opinii również niezbyt fortunnym jest używanie wyrazu „sonda” w odniesieniu do całego oligonukleotydu, który jest wyznakowany związkiem fluorescencyjnym (np. na str. 106 „sonda 5'-FAM- A_{12} ”). O „sondzie” zwykło mówić się w kontekście badania jakiejś cechy środowiska, np. fluorescencyjna sonda pH lub stężenia jonów wapnia. Tu użyty wyraz „sonda” to *de facto* „znacznik”. Tego problemu można uniknąć używając po prostu wprowadzonych skrótów związków fluorescencyjnych (czyli np. samo 5'-FAM- A_{12} bez, nieco mylnego, słowa „sonda”).

Żadne z powyższych uwag, nie pomniejszają, bardzo wysokiej – w mojej opinii – oceny pracy doktorskiej pani mgr Olgi Perzanowskiej.

Wyrażając konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Olga Perzanowska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach zaprojektowanych w oparciu o ambitne wyzwania poznawcze oraz przeprowadzonych precyzyjnie zadań badawczych. Badania te wymagały umiejętności współpracy w zespole złożonym z reprezentantów wielu dyscyplin oraz wiedzy i umiejętności praktycznych w zakresie



syntezy oligonukleotydów, niektórych technik biologii molekularnej, użycia termoforezy mikroskalowej oraz analizy uzyskanych danych. Moim zdaniem, mimo wspomnianych wyżej uwag krytycznych, przedstawiona przez mgr Olgę Perzanowską rozprawa doktorska zawiera rozwiązania bardzo aktualnych i ważnych społecznie problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr Olgi Perzanowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. **Wielość uzyskanych wyników naukowych oraz, przede wszystkim ich ranga poznawcza, skłania mnie również do wnioskowania o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.**

Remigiusz Worch

