

RECENZJA

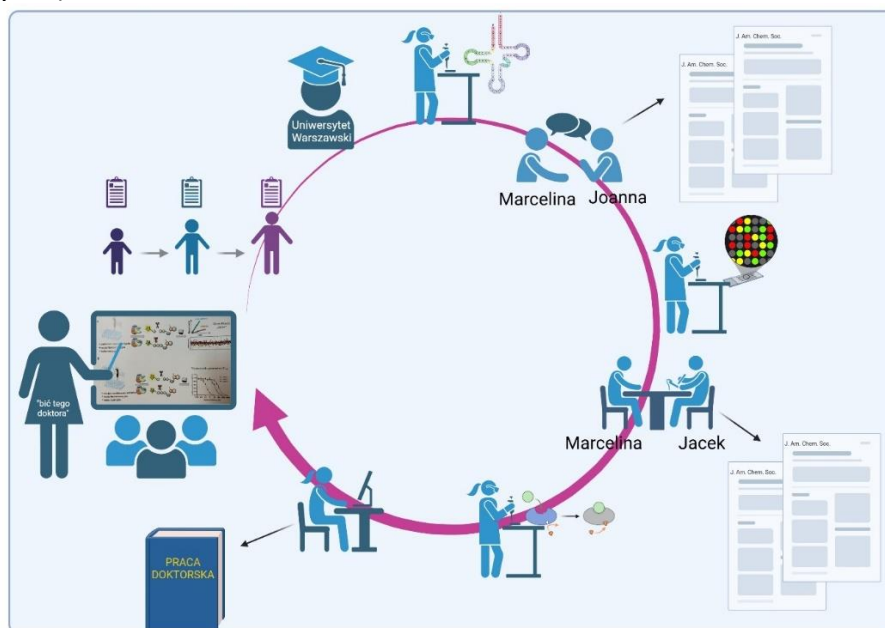
rozprawy doktorskiej mgr Marceliny Bednarczyk

pt. „Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację struktury końca 5' mRNA” wykonanej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Jemielitego oraz dr. hab. Joanny Kowalskiej

Rola RNA w zastosowaniach terapeutycznych zyskała znaczną uwagę w ostatnich latach, szczególnie z nadejściem nowatorskich terapii opartych na RNA, które wykorzystują unikalne właściwości cząsteczek RNA. Kwas RNA odgrywa kluczową rolę w różnych procesach biologicznych, w tym w ekspresji genów, regulacji i syntezie białek. Potencjał terapeutyczny RNA jest szczególnie widoczny w rozwoju technologii interferencji RNA (RNAi), szczepionek mRNA oraz oligonukleotydów antysensownych, które stały się obiecującymi strategiami leczenia różnych chorób, w tym infekcji wirusowych, zaburzeń genetycznych i nowotworów. Jednym z kluczowych aspektów biologii RNA, który ma implikacje dla zastosowań terapeutycznych, jest struktura i stabilność cząsteczek RNA. Struktura czapeczki 5' mRNA jest niezbędna dla jego stabilności, translacji i ogólnej funkcjonalności. Ta struktura czapeczki chroni mRNA przed degradacją przez egzonukleazy i jest niezbędna do rekrutacji rybosomów podczas translacji. Jednak niektóre wirusy wyewoluowały mechanizmy, aby wykorzystać komórkową maszynę gospodarza, w tym enzymy, które degradują 5' czapeczkę mRNA, niwecząc w ten sposób antywirusową obronę gospodarza i promując replikację wirusa. Inhibitory tych enzymów (degradujących czapeczkę 5') stanowią potencjalną strategię terapeutyczną, szczególnie w kontekście nowych infekcji wirusowych. Celowanie w te wirusowe enzymy za pomocą specyficznych inhibitorów może stanowić nowe podejście do rozwoju terapii antywirusowych. W ta niezwykle ciekawą tematykę badawczą wpisuje się praca doktorska Pani mgr Marceliny Bednarczyk, którą wykonała pod opieką wybitnych specjalistów tj. prof. Jacka Jemielitego oraz dr. hab. Joanny Kowalskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 145 stron. Struktura pracy jest klasyczna, charakterystyczna dla rozpraw naukowych z dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych. Składa się z głównych rozdziałów: Wprowadzenie, Przegląd literaturowy, Badania własne, Cel badań, Podsumowanie, Część eksperymentalna, oraz Bibliografia. Praca zawiera 174 odnośniki literaturowe, z czego większość pochodzi z ostatnich pięciu lat, co potwierdza aktualność przeprowadzonych badań. Rozprawa została napisana w języku polskim w sposób poprawny i zrozumiały, a jej przygotowanie edytorskie jest na najwyższym poziomie. Zauważyłam jedynie

drobne niedociągnięcia, głównie dotyczące niejednorodnych wcięć akapitów. Pojedyncze błędy odnoszą się głównie do żargonowych określeń. Należy podkreślić wyjątkową staranność edycyjną pracy doktorskiej, co sprawiło, że czytałam ją z przyjemnością. Jakość papieru wykorzystanego do wydrukowania pracy również zasługuje na uznanie, ponieważ rysunki i schematy są bardzo wyraźne. W pracy zamieszczono 59 rysunków, które doskonale obrazują zasady działania testowanych związków czy metod (np. FLINT) oraz obrazują uzyskane wyniki badań. Na samym początku rozprawy znajduje się abstrakt graficzny przedstawiający schematyczny plan realizacji pracy doktorskiej Kandydatki. Tech schemat bardzo mi się spodobał gdyż po jego krótkiej analizie wiedziałam czego będzie dotyczyła praca doktorska i w zasadzie mogłabym jej dalej nie czytać (ale oczywiście przeczytałam). To właśnie pokazało mi, że w dobie przeładowania informacyjnego, gdzie czas na przetwarzanie treści jest ograniczony, wizualizacja staje się kluczowym narzędziem w przekazywaniu skomplikowanych idei. Nawet w dziedzinie nauki, gdzie tekst wydaje się dominować, to właśnie przemyślana wizualizacja może okazać się najskuteczniejszym sposobem na przyciągnięcie i zaangażowanie odbiorcy. Przyznaję, że rysunki w recenzowanej pracy stanowiły doskonały przykład na to, jak efektywnie wykorzystać moc wizualnego przekazu w nauce. Przemyślenia te skłoniły mnie do przygotowania rysunku który, mam nadzieję, mówi więcej niż tysiąc słów i potwierdza siłę obrazu (Rys. 1).



Rys. 1. Cykl życia naukowego Marceliny Bednarczyk – od szkoły podstawowej i średniej przez studia na Uniwersytecie Warszawskim, oraz pracę w laboratorium. Schemat pokazuje współtworzenie publikacji pod opieką Joanny i Jacka, oraz pisanie pracy doktorskiej oraz prezentację wyników badań podczas publicznej obrony.

Podziękowania napisane przez panią Marcelinę Bednarczyk na początku pracy pokazują wdzięczność i uznanie dla osób, które przyczyniły się do jej sukcesu. Autorka podkreśliła kluczową rolę promotorów jako mentorów oraz wkład współpracowników w tworzenie pracy doktorskiej. To wyraźnie pokazuje, jak istotna jest wartość pracy zespołowej w badaniach naukowych.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Przegląd literaturowy” Doktorantka przedstawiła kluczowe zagadnienia związane z kwasami nukleinowymi, koncentrując się na ich rodzajach, budowie i funkcjach. Szczególną uwagę poświęciła oddziaływaniom między zasadami kwasów nukleinowych, które stanowią podstawę ich biologicznej aktywności. Następnie omówiła mRNA jako informacyjny kwas rybonukleinowy, szczegółowo analizując jego budowę oraz funkcje. Doktorantka podkreśliła znaczenie struktury końca 5' mRNA (kapu), opisując zarówno proces jego biosyntezy, jak i funkcje biologiczne, które są kluczowe dla stabilności mRNA i efektywności translacji. Istotną częścią tej części pracy jest szczegółowy opis mechanizmów degradacji mRNA. Doktorantka przedstawiła zarówno enzymy eukariotyczne, jak i wirusowe uczestniczące w degradacji końca 5' mRNA, a także omówiła ścieżki kontroli jakości RNA, które eliminują błędnie zszyntetyzowane lub uszkodzone cząsteczki. W dalszej części pracy mgr Bednarczyk zaprezentowała terapeutyczne zastosowania mRNA, wskazując na jego potencjał w szczepionkach, terapii genetycznej oraz innych nowatorskich rozwiązaniach medycznych. Ten rozdział przeczytałam z największym zainteresowaniem. Na zakończenie Kandydatka szczegółowo opisała również badanie oddziaływań w układach biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań białko-ligand. Przedstawiła sposoby opisywania tych oddziaływań oraz metody ich badania, co ma istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów działania białek oraz projektowania nowych związków bioaktywnych. Cały rozdział świadczy o doskonałej znajomości przez Doktorantkę „świata RNA”, przez co dostarcza odpowiedniego zaplecza teoretycznego dla badań zaprezentowanych w dalszych częściach pracy doktorskiej. Opis jest napisany przystępnie, dzięki czemu czyta się go z lekkością. Ogólnie, muszę przyznać, że Doktorantka ma łatwość pisania, co sprawia, że cała praca jest bardzo przyjemna w odbiorze i czyta się ją z dużą swobodą.

Ogólnym celem pracy doktorskiej mgr Marceliny Bednarczyk było **opracowanie nowej metody monitorowania aktywności enzymów D9 i DCP2, związanych z degradacją końca 5' mRNA do identyfikacji nowych, selektywnych inhibitorów tego procesu**. Cele szczegółowe obejmowały: 1. Opracowanie metody FLINT do badania aktywności enzymów degradujących. 2. Optymalizację warunków i walidację metody. 3. Przystosowanie metody do formatu wysokoprzepustowego (HTS). 4. Ewaluację inhibitorów poprzez wyznaczenie IC_{50} . 5. Potwierdzenie wyników inną metodą na krótkim RNA. Wyznaczone cele pracy w mojej opinii były bardzo ambitne i wymagały od Doktorantki żmudnych procesów optymalizacyjnych o czym szczegółowo opisała w swojej pracy.

Rozdział „Badania własne” w rozprawie doktorskiej mgr Marceliny Bednarczyk jest najważniejszym i największym objętościowo elementem pracy, w którym Doktorantka szczegółowo przedstawiła wyniki uzyskane dla dwóch białek będących dla niej celem molekularnym tj. dla wirusowego enzymu D9 oraz dla ludzkiego białka dekapującego PNRC2-DCP1/DCP2 (w uproszczonym modelu DCP2).

Pierwsza część rozdziału „Badania własne” jest podzielona na kilka podrozdziałów i poświęcona jest badaniom nad wirusowym enzymem dekapującym D9 oraz opracowaniem metody wysokoprzepustowej (FLINT) do badania jego inhibitorów. Doktorantka na początku skupiła się na

zastosowaniu sond fluorescencyjnych do monitorowania aktywności enzymu. W badaniach zastosowała różne kombinacje linkera i fluorofora, co pozwoliło na uzyskanie sondy o wysokim powinowactwie do enzymu D9. Wyniki pokazały, że sonda z pirenem jako znacznikiem fluorescencyjnym miała największą zdolność do generowania sygnału po hydrolizie, co potwierdza efektywne oddziaływanie między zasadą azotową a fluoroforem. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów, które miały na celu określenie wpływu różnych czynników na aktywność enzymu. W szczególności badała wpływ pH i stężenia kofaktorów, a także temperatury oraz stężenia substratu, co pozwoliło na wybranie optymalnych warunków zapewniających stabilność i powtarzalność wyników. W dalszej części pracy Doktorantka wyznaczyła parametry kinetyczne wg modelu Michaelisa-Menten, co umożliwiło lepsze zrozumienie mechanizmu działania enzymu D9 oraz określenie jego efektywności w kontekście różnych stężeń substratu. Następnie Doktorantka przeprowadziła proces walidacji, który obejmował nie tylko obliczenie parametru Z' , ale także analizę powtarzalności wyników oraz ich dokładności, co jest kluczowe dla metod HTS. Wysoka wartość Z' potwierdziła skuteczność metody w identyfikacji inhibitorów białka D9. Badania inhibitorowe dostarczyły cennych informacji na temat preferencji strukturalnych enzymu D9 względem inhibitorów. Analiza procesu hydrolizy pozwoliła na zidentyfikowanie związków, które skutecznie hamują aktywność enzymu, co było istotne dla dalszych badań nad inhibitorami. Są to związki zawierające w swojej strukturze 7-metyloguahozę oraz minimum trzy grupy fosforanowe w mostku. Doktorantka wykonując wysokoprzepustowe badania przesiewowe podkreśliła, że badania te umożliwiły szybkie przetestowanie dużej liczby związków, co jest kluczowe w procesie odkrywania nowych leków. Udało jej się zidentyfikować trzy najlepsze związki. Zostały one poddane dalszej analizie w celu określenia ich wartości IC_{50} , co jest niezbędne do oceny ich potencjału jako inhibitorów. Na zakończenie rozdziału Doktorantka zweryfikowała wcześniej uzyskane wyniki przy użyciu niezależnej metody badawczej i potwierdziła skuteczność zidentyfikowanych inhibitorów metodą FLINT, a także ich selektywność względem enzymu D9, co jest istotne dla dalszych badań nad ich zastosowaniem w terapii. Praca mgr Marceliny Bednarczyk w pełni zasługuje na uznanie za wniesienie istotnego wkładu w badania nad enzymem D9 i jego inhibitorami. Po lekturze tej części pracy nasunęły mi się następujące pytania:

1. Jakie były główne ograniczenia w zastosowaniu znanych wysokoprzepustowych metod badania enzymu D9 i które skłoniły Doktorantkę do opracowania nowej metody?
2. Jakie konkretne zastosowania praktyczne mogą mieć zidentyfikowane inhibitory enzymu D9 w kontekście terapii wirusowych? Czy podległy one procesowi ochrony własności intelektualnej?
3. W jaki sposób wyniki badań nad inhibitorami wpływają na przyszłe kierunki badań nad enzymem D9?

Druga część rozdziału „Badania własne” również zawiera kilka podrozdziałów i dotyczy badań nad kompleksem dekapującym PNRC2-DCP1/DCP2, ze szczególnym uwzględnieniem inhibitorów enzymu DCP2. W pracy Doktorantka przedstawiła wyniki badań, które obejmowały optymalizację

sond fluorescencyjnych. W badaniach FLINT wybrała sondę fluorescencyjną, m7GTP-Py, która wykazała największy wzrost intensywności fluorescencji podczas hydrolizy przez DCP2, co uczyniło ją odpowiednią do dalszych badań inhibitorowych. Następnie Doktorantka opisała optymalne warunki reakcji które zwiększają efektywność hydrolizy sondy fluorescencyjnej, w tym rezygnowała z dodatków, które negatywnie wpływały na sygnał fluorescencji. W kolejnym etapie wyznaczyła parametry kinetyczne reakcji hydrolizy, takich jak stała Michaelisa-Mentena oraz szybkość maksymalna, co potwierdziło skuteczność wybranych warunków eksperymentalnych. Następnie Kandydatka zwalidowała metodę i potwierdziła, że zoptymalizowana metoda FLINT ma wysoką powtarzalność, z wartością parametru Z' równą 0,75, co czyni ją odpowiednią do badań przesiewowych. W kolejnym etapie Doktorantka zastosowała wysokoprzepustowe badania przesiewowe komercyjnej biblioteki LPAC w której znalazła nowe inhibitory DCP2, w tym suraminy jako najsilniejszego inhibitora, z wartością IC_{50} wynoszącą 0,014 μM . Na zakończenie uzyskane wyniki zweryfikowała niezależną metodą którą potwierdziła właściwości inhibitorowe wybranych związków w niezależnych badaniach, co wzmacnia jedynie wiarygodność wyników uzyskanych metodą FLINT. Po przeczytaniu tej części pracy nasunęły mi się następujące pytania:

1. Czy badania nad inhibitorami będą prowadzone w warunkach *in vivo*? Jakie są implikacje dla przyszłych badań?
2. W jaki sposób wyniki badań mogą wpłynąć na rozwój nowych terapii celowanych w choroby związane z dysfunkcją mRNA?
3. Jakie dodatkowe badania są planowane w celu dalszej weryfikacji skuteczności zidentyfikowanych inhibitorów?
4. Jakie są potencjalne zastosowania kliniczne zidentyfikowanych inhibitorów DCP2?
5. Czy badania nad inhibitorami DCP2 mogą mieć wpływ na rozwój terapii przeciwnowotworowych?
6. Czy istnieje ryzyko niespecyficznego działania inhibitorów DCP2?

W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej, zatytułowany „Podsumowanie” zawiera krótkie zestawienie uzyskanych wyników pracy doktorskiej. W tym rozdziale Doktorantka opisała wszystkie największe wyzwania, z jakimi zmierzyła się podczas realizacji pracy doktorskiej, w tym z procesami optymalizacyjnymi. Można przypuszczać, że optymalizacja procedur, choć brzmi elegancko, w rzeczywistości oznaczała najprawdopodobniej długotrwałe, żmudne eksperymenty, które mogą zniechęcić młodego naukowca do dalszej pracy badawczej. Tym bardziej należy docenić wytrwałość i konsekwencję Doktorantki, a także wsparcie i zaangażowanie jej promotorów. W ostatnim rozdziale pracy doktorskiej, zatytułowanym „Część eksperymentalna”, Doktorantka opisała stosowane przez siebie metody, protokoły i stosowane odczynniki i roztwory. Każda z tych technik i metod została prawidłowo opisana pod względem jej zastosowania i sposobu przeprowadzania eksperymentu.

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że pani mgr Marcelina Bednarczyk, swoje badania realizowała w ramach prestiżowego grantu TEAM, finansowanego przez FNP w którym pełniła rolę

wykonawcy projektu. Dorobek publikacyjny doktorantki obejmuje aż osiem!!! artykułów naukowych, w tym w renomowanych czasopismach takich jak *ACS Chemical Biology* (IF 4,63), *Nucleic Acids Research* (IF 16,6), *Journal of the American Chemical Society* (IF 15,0), *Journal of Organic Chemistry* (4,198), *RSC Advances* (IF 3,9), *Analytical Chemistry* (IF 8,0), czy *Pharmaceutics* (IF 4,9). Doktorantka brała również czynny udział w licznych konferencjach naukowych, prezentując wyniki swoich badań zarówno w formie referatów ustnych, jak i plakatów. Łącznie przedstawiła swoje wyniki na 13 konferencjach międzynarodowych i krajowych, w tym na prestiżowych wydarzeniach takich jak EBSA. Ten imponujący dorobek naukowy świadczy o wybitnych osiągnięciach Doktorantki, zarówno w zakresie prowadzenia badań, jak i ich upowszechniania, co czyni ją, w mojej opinii wyróżniającą się młodą badaczką.

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej mgr Marceliny Bednarczyk jest niezwykle aktualna i istotna w obliczu zagrażającego ludzkości problemu chorób wirusowych, co stanowi jedno z największych przyszłych wyzwań medycyny. Część doświadczalna pracy została starannie zaplanowana, a wyniki zostały już opublikowane w czasopiśmie *ACS Chem. Biol.* (IF 4,63). Doktorantka zaprezentowała solidny, innowacyjny i wartościowy materiał badawczy, który ma potencjalnie szerokie zastosowanie w przyszłych badaniach nad nowymi terapiami przeciwwirusowymi. Warto zaznaczyć, że Doktorantka posiada doskonały warsztat badawczy i świetnie posługuje się technikami z zakresu biofizyki, biologii molekularnej i enzymologii.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Marceliny Bednarczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.

Ponadto, mając na uwadze znaczący wkład pracy Doktorantki w rozwój wiedzy na temat nowoczesnych terapii przeciwwirusowych opartych na RNA, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy. Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marceliny Bednarczyk uzasadniam opracowaniem przez nią i walidacją wysokoprzepustowej metody FLINT do badań potencjalnych inhibitorów białek dekapujących 5' koniec mRNA. Metoda ta, wraz z jej zastosowaniem w kontekście narastających obaw przed pojawieniem się nowych chorób pochodzenia wirusowego, wnosi istotny wkład w jedno z przyszłych wyzwań współczesnej medycyny.

