

Piotr Mucha
dr hab., prof. UG

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Wita Stwosza 63, Gdańsk 80- 308

tel. 0585235432, e-mail: piotr.mucha@ug.edu.pl

Gdańsk, 24.11.2021 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Pawła Mariusza Głodowicza zatytułowanej „Wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych”

Odkrycia dokonane w ciągu ostatniego półwiecza systematycznie pogłębiały, a czasami wręcz drastycznie zmieniały naszą wiedzę na temat procesów biochemicznych będących fundamentami funkcjonowania organizmów żywych. Jednym z kamieni milowych tego okresu było odkrycie katalitycznych właściwości RNA (rybozymów) przez S. Altmana i T. Czecha na początku lat 80-tych XX w. Ich odkrycie w wielu aspektach zmieniło naszą wiedzę na temat roli RNA w funkcjonowaniu komórki i wytyczyło nowe ścieżki badań związanych z szeroko rozumianą regulacją ekspresji genów. Badania zależności struktura-aktywność rybozymów pozwoliły na ich wykorzystanie jako efektywnego narzędzia biologii molekularnej umożliwiające precyzyjne manipulowanie cząsteczkami kwasów nukleinowych i ingerencję w zawartą w nich informację genetyczną. Potencjalnie otwiera to możliwość zastosowania rybozymów jako narzędzi terapeutycznych umożliwiających przywrócenie homeostazy w sytuacjach, w których obecnie stosowane leki nie spełniają pokładanych w nich nadziei. Jednak zetknięcie się tej idei z „rzeczywistością komórkową” okazało się brutalne. Wewnętrzne środowisko komórki okazało się znacznie bardziej złożone i nieprzewidywalne niż sądziliśmy, a zastosowanie rybozymów jako narzędzi kontrolujących ekspresję znacznie bardziej problematyczne, niż nam się wydawało. Mitochondria, ze względu na swoją funkcję są jedną z kluczowych organelli komórkowych. Dysponując własnym materiałem genetycznym (mtDNA) są semiautonomiczną strukturą, której zaburzona aktywność prowadzi do wielu chorób (zespoły: KSS, MERRF, MELAS czy NARP). Obecnie są one nieuleczalne, a stosowana terapia jest wyłącznie objawowa. Zastosowanie strategii rybozymowej jest jednym z pomysłów i kierunków poszukiwania efektywnych metod kontrolowania aktywności mtDNA. W ten nurt badawczy wpisuje się tematyka dysertacji mgr inż. Pawła Mariusza Głodowicza.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Mariusza Głodowicza zatytułowana „Wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych” powstała w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, kierowanym przez

prof. ICHB PAN dr hab. Katarzynę Rolle, która pełniła również funkcję promotora tejże pracy, a promotorem pomocniczym była dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska. Rozprawa zawiera wyniki badań mgr inż. Pawła Mariusza Głodowicza nad projektowaniem i zastosowaniem katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) oraz w wybranych ludzkich liniach komórkowych. Doktorant zaprojektował i otrzymał konstrukty zawierające sekwencje aktywne (pasażerska i odcinająca) w postaci rybozymów (HH i HDV) oraz sekwencję umożliwiającą transport z cytoplazmy do mitochondriów (TLS). W jednym wypadku konstrukt zawierał antysensowną sekwencję pasażerską. Aktywność konstruktów została przetestowana wobec wybranych genów mtDNA *A. thaliana* oraz ludzkich w wybranych liniach komórkowych. Eksperymenty zawarte w rozprawie mają charakter badań podstawowych, jednakże potencjalnie mogą przyczynić się do powstania nowej generacji narzędzi terapeutycznych w postaci katalitycznych RNA zdolnych do kontroli ekspresji genów mitochondrialnych. Z tego punktu widzenia wybór tematu pracy doktorskiej uważam za niezwykle trafny i dobrze umotywowany merytorycznie. Opisany w rozprawie warsztat eksperymentalny świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktoranta szerokiej gamy technik biologii molekularnej i biotechnologii, poczynając na umiejętności konstrukcji i syntezy łańcuchów RNA o zaprojektowanych właściwościach, a kończąc na technikach pracy z materiałem roślinnym oraz pracy z liniami komórkowymi.

Formalna ocena rozprawy. Rozprawa doktorska liczy 195 stron. Praca zawiera 7 rozdziałów w układzie dość typowym dla prac eksperymentalnych, wśród których znajdują się: opracowanie literaturowe (51 str.), cel pracy (1 str.), wyniki badań własnych (56 str.), dyskusja (19 str.), podsumowanie (2 str.), materiały i metody (17 str.) oraz obszerna bibliografia (422 pozycji). Praca zawiera liczne ilustracje (b. dobrej jakości), które bardzo ułatwiają śledzenie procesu tworzenia np. poszczególnych konstruktów RNA użytych w badaniach.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy na wstępie chciałbym zaznaczyć, że zawiera ona niezwykle obszerny zestaw i analizę danych eksperymentalnych. Pokazuje to duże zaangażowanie Doktoranta i ogrom czasu i pracy jaką musiał wykonać na realizację jej celów. Część wyników zawartych w rozprawie (jak zaznacza Doktorant w jej treści) została już opublikowana (Sultan D., *et al.* (2016). The Reverse Transcriptase/RNA Maturase Protein MatR Is Required for the Splicing of Various Group II Introns in Brassicaceae Mitochondria. *Plant Cell*, 28: 2805-2829) (IF 11.3/2021). W pracy tej zawarte są m.in. wyniki zastosowania konstruktów rybozymowych w modelu roślinnym. Ułatwiło to nieco recenzentowi pracę, gdyż metodologia eksperymentów, a także wynikające z nich wnioski, przeszły już sito recenzji tego czasopisma. Doktorant jest współautorem tego artykułu. Głównym celem jaki Doktorant postanowił zrealizować w ramach swojej dysertacji było opracowanie i wykorzystanie strategii importu cząsteczek regulatorowych (rybozymy,

a także sekwencja antysensowna) do mitochondriów oraz regulacja ekspresji wybranych genów mitochondrialnych w modelu roślinnym (*A. thaliana*) oraz w wybranych ludzkich liniach komórkowych. Cel ten Doktorant zrealizował wykorzystując wcześniej opracowane systemy transkrypcyjne, które umożliwiły mu syntezę zaprojektowanych przez siebie konstruktów. Zostały one zaprojektowane w taki sposób, aby po autowycięciu rybozemu HDV powstająca na 3'-końcu struktury TLS sekwencja CCA poprzez jej aminoacylowanie umożliwiała transport takiego konstruktów do mitochondrium. Doktorant pokazał, że strategia ta sprawdziła się zarówno w modelu roślinnym, jak i docelowym modelu ludzkich linii komórkowych. Opracowana procedura pozwala na charakterystykę genów mitochondrialnych oraz ich produktów transkrypcji i translacji, zarówno w wariancie gdy ich funkcja jest już znana, jak również dla celów o nieznanym celu. W modelu roślinnym Doktorant wykorzystywał konstrukty/transkrypty, które w jednym wariancie zawierały rybozym jako sekwencję pasażerską, a w drugim sekwencję antysensowną. Czy Doktorant zechciałby porównać zalety i wady oraz efektywność obu tych podejść w trakcie publicznej obrony? Czy wspomniane w Opracowaniu literaturowym zawartym we wstępnej części dysertacji, modyfikowanie AS-ON w sekwencji pasażerskiej byłoby możliwe w technologii eksperymentu przeprowadzonego przez Doktoranta? W całej dysertacji Doktorant stosuje zwrot „roślina *Arabidopsis* (lub *A. thaliana*)”. Ponieważ w badaniach wykorzystujących materiał roślinny jest to jedna z roślin modelowych i ma swoją polską nazwę, to może warto byłoby się chociaż raz nią posłużyć?

Za najciekawsze osiągnięcie Doktoranta przedstawione w dysertacji uważam zaprojektowanie i pokazanie efektywności systemu umożliwiającego transport konstruktów rybozymowych do ludzkich mitochondriów. Jak pokazał Doktorant na wybranych celach-genach mitochondrialnych (*mt-atp6*), zaprojektowany system oparty na rybozymowej sekwencji pasażerskiej, struktury transportującej TLS (pochodzące z wirusa mozaiki tytoniu-TMV oraz wirusa mozaiki stokłosa-BMV) oraz rybozemu samowycinającego HDV, okazał się skuteczny w regulacji ekspresji mitochondrialnej informacji genetycznej. Wspomniane wirusy są RNA-wirusami, czemu więc porównywano ich sekwencje TLS z odpowiednimi tRNA na poziomie DNA, a nie RNA (rys34, str. 96)? Na podkreślenie zasługuje fakt, że konstrukcja i aplikacja kilkuplazmidowego systemu niezbędnego do transfekcji i aktywacji konstruktów umożliwiającego transport rybozemu do mitochondriów w ludzkich liniach komórkowych była nieporównanie bardziej złożona w zestawieniu z modelem roślinnym. W przeprowadzonych eksperymentach Doktorant pokazał, że zaproponowana przez niego technologia umożliwia transfekcję komórek ludzkich, transkrypcję zaprojektowanego konstruktów oraz jego efektywny transport do mitochondriów. Co ważne, pokazano również, że technologia ta nie narusza integralności (potencjału) błony mitochondrialnej i funkcjonalności mitochondriów, czyli jest stosunkowo bezpieczna dla komórki. Doktorant pokazał również na poziomie transkryptu mitochondrialnego genu *mt-at6* oraz jego

białkowego produktu, że rybozym będący częścią zaprojektowanego konstruktu przejściowo obniża poziom jego transkrypcji i translacji w ludzkich liniach komórkowych. Pokazuje to, że Doktorantowi udało się zmodyfikować i przetransponować roślinny konstrukt rybozymowy na taki, który jest funkcjonalny w ludzkim modelu komórkowym. Czy doktorant sprawdzał jak długo utrzymuje się konstrukt rybozymowy w wektorze plazmidowym po wprowadzeniu do ludzkiej komórki? Do tej części badań mam pytanie do Doktoranta związane z zastosowaniem promotora antybiotyko (tetracyklino)-zależnego do indukcji ekspresji zaprojektowanego konstrukt. Narzędzie to jest bardzo wygodne do selektywnej ekspresji konkretnego genu, a wyniki Doktoranta pokazują, że stosowane stężenia antybiotyku nie wpływają znacząco na żywotność komórek. Czy Doktorant dostrzega ograniczenia takiego rozwiązania, w wypadku ewentualnego stosowania zaproponowanego systemu w układzie *in vivo*? Jak Doktorant widziałby potencjalne farmakologiczne zastosowanie zastosowanej przez siebie technologii na tle innych znanych procedur manipulowania genomem mitochondrialnym?

Podsumowując tą część rozprawy stwierdzam, że stanowi ona wynik dużej pracy włożonej przez Doktoranta, potrafiącego wykorzystywać własną wiedzę i szeroki wachlarz narzędzi biologii molekularnej do rozwiązywania postawionych przed nim problemów. Przedstawione wyniki wnoszą niewątpliwie wiele elementów nowości naukowej dotyczących projektowania struktur rybozymowych w celu regulacji ekspresji mtDNA. Niezwykle wartościowe są zwłaszcza te uzyskane w modelu wykorzystującym ludzkie linie komórkowe.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam również kilka uwag krytycznych, które nasunęły mi się po lekturze dysertacji. Uchybień formalnych jest niewiele. Dysertacja mgr inż. Pawła Głodowicza napisana jest „poprawnym językiem”, ze zrozumieniem opisywanych problemów oraz starannością edytorską. Aczkolwiek widać pewien pośpiech na ostatnim etapie jej powstawania, co znajduje odzwierciedlenie w nieskorygowanych błędach językowych (np. protistów (nie protestów, str. 4), aminoacylacji (nie aminacylacji, str 46), czy inne np. str. 146 l.6). W pracy znalazłem też pewną liczbę niepoprawnych/żargonowych określeń, jak np. obniżenie genu matR (str. 81) czy obniżenie docelowych genów (str. 132), najwyższe obniżenie (str. 79-80), amidy kwasu fosforowego to fosfoamidy (nie „fosfor amidy”), a wiązanie to wiązanie fosfoamidowe (str.66-57). W kilku miejscach pracy pojawia się określenie...końca 3'-CCA (np. str. 46). Moim zdaniem wzbudza ono zamieszanie, bo nie wiadomo czy autor miał na myśli 3'-koniec konstrukt zakończony sekwencją CCA, czy też niestandardowy zapis sekwencji 3'-CCA-5'. Oczywiście z kontekstu można się zorientować, że chodzi o pierwszy wariant. W opisie kilku wykresów i tabel (np. str. 118/120) opisano stężenia antybiotyku jako [μg]. To jest jednostka masy, nie

stężenia. Przy podawaniu długości fali emisji fluorescencji standardowo podaje się też długość fali absorpcji/wzbudzenia (rys 44-45). Natomiast na wyróżnienie zasługuje szata edytorska wsparta rysunkami i fotografiami o bardzo dobrej jakości. Jest to niezwykle pomocne narzędzie w śledzeniu toku myślenia Doktoranta w trakcie projektowania narzędzi i wykonywaniu zaplanowanych eksperymentów. Powyższe drobne uwagi wynikają jedynie z konieczności wnikliwej analizy rozprawy doktorskiej i w żadnym stopniu nie umniejszają efektów naukowych osiągniętych przez Kandydata.

Reasumując, mgr inż. Pawła Głodowicz postawił przed sobą ambitne cele badawcze i je zrealizował. Wykazał się przy tym dużą wiedzą związaną z konstrukcją systemów wykorzystujących kwasy nukleinowe, a także znajomością wielu technik biologii molekularnej czy biotechnologii, które umożliwiły mu realizację tych celów. Z dysertacji przebija też duża umiejętność Doktoranta projektowania aktywnych/regulatorowych struktur RNA. Są to z całą pewnością cechy dojrzałego samodzielnego badacza. Baza Pubmed pokazuje, że na dzień powstania niniejszej recenzji mgr inż. Pawła Głodowicz jest współautorem 5 artykułów naukowych w czasopismach (dobrych) z tzw. listy filadelfijskiej. Z pełnym, przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy nowości naukowej, spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej IChB PAN o dopuszczenie mgr inż. Pawła Głodowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Piotr Mucha