



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

8 lutego 2023, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Aleksandry Jarmołowicz**

**z tytułu „Small molecules interacting with Influenza virus RNA and SARS-CoV-2 RNA as potential inhibitors of replication”**

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Jarmołowicz została wykonana pod opieką Pani prof. dr hab. Elżbiety Kierzek w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Temat rozprawy doktorskiej, która została przygotowana w języku angielskim, jest związany z głównym nurtem badań pracowni Pani promotor, jakim jest poznanie struktury genomowych RNA wirusów oraz zaprojektowanie cząsteczek, które poprzez oddziaływanie z wirusowym RNA mogą zahamować cykl replikacyjny wirusa. W swojej pracy Doktorantka zastosowała wysokoprzepustową analizę wiązania niskocząsteczkowych ligandów do motywów struktury RNA wirusa grypy typu A oraz koronawirusa SARS-CoV2, symulacje dokowania ligandów do tych motywów RNA, oraz analizę inhibicji replikacji wirusa grypy typu A w liniach komórkowych, po to aby wskazać cząsteczki mogące wiązać RNA wirusa i hamować jego namnażanie.

We wstępie literaturowym Doktorantka przedstawiła najważniejsze cechy budowy genomowych RNA wirusa grypy typu A oraz koronawirusa SARS-CoV2, a także omówiła ich cykle replikacyjne. Omówiła także wyniki dotychczasowych badań dotyczących poszukiwania cząsteczek hamujących namnażanie tych wirusów poprzez wiązanie się z ich RNA. Największą część omówionych badań stanowią wyniki dotyczące cząsteczek wiążących się z wirusowym RNA na zasadzie komplementarności, podzielone przez Doktorantkę na antysensowe oligonukleotydy, siRNA oraz PNA, w tym wyniki uzyskane przez macierzysty zespół Doktorantki. Ponadto Doktorantka omówiła wyniki badań dotyczących poszukiwania małowielkościowych ligandów wiążących się z RNA, które mogłyby hamować namnażanie tych wirusów. Wprowadzenie literaturowe dobrze uzasadnia podjęcie badań przedstawionych w niniejszej rozprawie oraz nakreśla



kontekst aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie. Brakowało mi jednak lepszego wyjaśnienia wniosków uzyskanych z dotychczas przeprowadzonych badań. Na przykład czy skuteczność badanych inhibitorów zależała od wybranego motywu strukturalnego, albo od rodzaju cząsteczki (ASO, PNA, drobnocząsteczkowy ligand), której właściwości inhibicyjne testowano? Czym był podyktowany wybór jako cel inhibicji w dotychczasowych badaniach określonych motywów strukturalnych, np. M121 lub s2m? Większość omówienia dotyczy oligomerów wiążących się do RNA na zasadzie komplementarności, a mniejsza część drobnocząsteczkowych ligandów, które są głównym tematem pracy. Jednym z biologicznych przykładów wiązania się drobnocząsteczkowych ligandów do RNA o określonej strukturze przestrzennej są cząsteczki wiążące się do rybobprzełączników. Czy na przykładzie znanych struktur rybobprzełączników w kompleksie z ligandem można określić ogólne wymagania jakie musiałby spełniać drobnocząsteczkowy ligand wiążący się specyficznie do RNA, oraz jakie cechy musiałby mieć motyw strukturalny RNA będący jego receptorem? Oczywiście znane są także struktury innych drobnocząsteczkowych ligandów wiążących RNA, np. antybiotyków związanych z rRNA. Wydaje mi się, że krótka dyskusja tego tematu mogłaby być przydatna dla wyjaśnienia czytelnikowi w jaki sposób drobnocząsteczkowe ligandy mogą być specyficznie wiązane przez cząsteczki RNA.

W pierwszej części pracy Doktorantka zastosowała wysokoprzepustową analizę wiązania ligandów z dwóch bibliotek do krótkich cząsteczek RNA (o długości do ok. 40 nt) odpowiadających motywom strukturalnym pochodzącym z RNA wirusa grypy typu A oraz z wirusa SARS-CoV2. Doktorantka wyjaśniła ich właściwości oraz funkcje biologiczne, które uzasadniły ich wybór do badań. Większość z tych motywów to spinki z zaburzeniami regularnej struktury, takimi jak wybrzuszenia lub pętle wewnętrzne. Do niektórych motywów dodano po dwie pary G-C lub C-G dla ich ustabilizowania, jednak lokalizacja tych mutacji (zapewne na końcach cząsteczki) nie jest zaznaczona na rysunkach. Wiązanie badano metodą opartą o obserwację zmian fluorescencji w miarę wypierania przez badany ligand fluorescencyjnej cząsteczki wskaźnikowej związanej z RNA. Zabrakło mi wyjaśnienia dlaczego do badań wybrano biblioteki Lopac i Enamine. Jakie właściwości tych bibliotek zdecydowały o ich wyborze? W swoich badaniach Doktorantka najpierw wykonała wstępną analizę wiązania wszystkich cząsteczek, a następnie te, które wykazywały największą zmianę fluorescencji wybrała do dokładnej analizy polegającej na pomiarze kompetycji z fluorescencyjnym wskaźnikiem w serii stężeń badanego inhibitora dla określenia wartości IC50. Z opisu w dziale „High



throughput screening” domyślałam się, że wstępna analiza (w tekście wyników określona jako „primary screening”) była wykonana w jednym stężeniu liganda. Czy rzeczywiście było to stężenie ostateczne 10 mM, jak podano na stronie 128? Poprosiłbym także o wyjaśnienie jaki zakres wartości IC50 można zmierzyć przy pomocy tej metody, w warunkach wybranych przez Doktorantkę, i czy można oszacować zakres wartości IC50 dla tych cząsteczek, dla których te wartości nie zostały podane w tabelach (np. jako „wyższe niż”)? Czy Doktorantka w trakcie obrony mogłaby przedyskutować jakie jej zdaniem właściwości ligandów decydowały o silnym wiązaniu do badanych cząsteczek RNA? Na przykład M6545 ma wartość IC50 ok. 1  $\mu$ M dla wszystkich czterech badanych RNA, a SML2238 ok. 50  $\mu$ M dla jednej z czterech cząsteczek.

Badania przy pomocy symulacji komputerowej struktur oraz dokowania ligandów do uzyskanych struktur przestrzennych pozwoliły Doktorantce na wizualizację tego w jaki sposób hipotetycznie badane ligandy mogłyby wiązać się z analizowanymi cząsteczkami RNA. Czy w czasie obrony Doktorantka mogłaby zaproponować eksperymenty, które mogłyby sprawdzić, czy rzeczywiste wiązanie ligandów w tych cząsteczkach jest podobne do przewidywanego? Czy mutacje przewidywanych miejsc kontaktów pomiędzy ligandem a RNA mogłyby posłużyć do takiej analizy?

Cząsteczki wyselekcjonowanych ligandów zostały przez Doktorantkę także zbadane z punktu widzenia ich zdolności do hamowania cyklu replikacyjnego wirusa grypy typu A. Poprosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie, czy istnieje korelacja pomiędzy wartością IC50 w wiązaniu RNA a skutecznością badanych ligandów jako inhibitorów cyklu replikacyjnego? W trakcie obrony poprosiłbym Doktorantkę także o zaproponowanie przy pomocy jakich eksperymentów mogłaby sprawdzić, czy hamowanie namnażania wirusa przez badane ligandy wynika z ich wiązania się do badanych elementów RNA?

Praca doktorska zawiera połączony rozdział Wyniki i Dyskusja. Jednak jest to rozdział opisujący prawie wyłącznie wyniki. Niewielka część dyskusji znajduje się np. na stronie 92 w odniesieniu do porównania dokowania cząsteczki referencyjnej do motywu RNA w badaniach Doktorantki i w literaturze. Doktorantka wnioskuje, że wiązanie było podobne w obu eksperymentach, jednak zabrakło rysunku nakładającego obie struktury tak aby można było ocenić to podobieństwo. Uwzględnienie odrębnego działu dyskusji omawiającego znaczenie wyników pracy na tle literatury ułatwiłoby interpretację



wyników i przez to wzmocniłoby pracę. Częściowo rolę dyskusji spełnia dział Podsumowanie.

Doktorantka jest współautorką dwóch publikacji przeglądowych. W publikacji w czasopiśmie *Pathogens* jest drugą współautorką, a w publikacji w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* jest trzecią współautorką. Pierwsza z prac przeglądowych dotyczy organizacji i struktury genomowego RNA wirusa grypy typu A, a druga z nich motywów struktury RNA wirusa grypy typu A oraz wirusa SARS-CoV-2, w kontekście inhibicji cyklu replikacyjnego wirusów. Współautorstwo prac przeglądowych świadczy o dobrej znajomości tej tematyki badań przez Doktorantkę.

Podsumowując, badania wykonane w ramach pracy doktorskiej poskutkowały uzyskaniem wartościowych wyników pozwalających na wskazanie drobnocząsteczkowych ligandów wiążących określone struktury RNA. Takie ligandy mogłyby być użytecznym narzędziem do badania funkcji biologicznej wybranych struktur RNA, a także posłużyć do zaprojektowania skutecznych inhibitorów cyklu życiowego wirusów. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała zarówno metody eksperymentalne jak i komputerowe, co świadczy o zdobyciu przez nią dużego doświadczenia eksperymentalnego w zakresie metodyki stosowanej do analizy wiązania drobnocząsteczkowych ligandów przez biopolimery.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.). w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr. Aleksandry Jarmołowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

  
Mikołaj Olejniczak