INSTYTUT Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

BiolMed

93-232 Łódź ul. Lodowa 106	tel.: 042 2723633 fax.: 042 2723630	NIP: 982-03-52-085 REGON: 100492431	Zaopatrzenie tel.: 042 2723600

Łódź, 9 lutego 2023 r.

dr hab. Agnieszka B. Olejniczak, prof. IBM PAN
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź,
tel. 42-272-36-37
e-mail: aolejniczak@cbm.pan.pl

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Aleksandry Jarmołowicz

pt. "*Small molecules interacting with Influenza virus RNA and SARS-CoV-2 RNA as potential inhibitors of replication*"

Choroby zakaźne wywołane przez patogeny mikrobiologiczne (bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty) powodują miliony zgonów rocznie na całym świecie i stanowią poważne wyzwanie dla globalnego zdrowia ludzkiego. Walka z chorobami wirusowymi wymaga rozwiązania wciąż nierozwiązanych problemów, takich jak (i) ograniczony arsenał leków przeciwwirusowych o często wąskiej aktywności, (ii) przeszkody związane z dostarczaniem leków in vivo (toksyczność, rozpuszczalność, skuteczność, bezpieczeństwo) lub (iii) wysoki wskaźnik mutacji, prowadzący do oporności na leki i w konsekwencji do niepowodzenia terapeutycznego. Dlatego też poszukiwanie nowych leków przeciwwirusowych zdolnych do skutecznego zwalczania infekcji przy minimalnym lub bez wpływu na gospodarza jest ważnym i pilnym globalnym zadaniem.

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy badań związanych z potencjalną identyfikacją, wśród znanych struktur, niskocząsteczkowych związków chemicznych o aktywności przeciwwirusowej nacelowanych na RNA wirusa, z wykorzystaniem wysokowydajnej analizy przesiewowej oraz dokowania molekularnego.

Praca doktorska mgr Aleksandry Jarmołowicz została wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, pod kierunkiem Prof. Elżbiety Kierzek - promotora tej pracy, w ramach projektu POWR.03.02.00-00-I011/16 realizowanym przez Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech".

93-232 Łódź ul. Lodowa 106	tel.: 042 2723633 fax.: 042 2723630	NIP: 982-03-52-085 REGON: 100492431	Zaopatrzenie tel.: 042 2723600

W Zespole Genomiki Strukturalnej RNA kierowanym przez Panią Prof. Elżbietę Kierzek prowadzone są badania, związane m.in. z genomiką strukturalną RNA wirusa grypy, wpływem struktury RNA na namnażanie wirusa grypy, syntezą oraz poszukiwaniem niskocząsteczkowych ligandów nakierowanych na inhibicję replikacji wirusa.

Praca składa się z następujących części: 1) *Cel pracy* (2 strony), 2) *Streszczenie*, w języku polskim i angielskim (5 stron), 3) *Wstęp literaturowy* (22 strony), 4) *Wyniki i dyskusja* (74 strony), 5) *Podsumowanie* (9 stron), 6) *Materiały i metody* (14 stron), 7) *Spis rysunków i tabel*, 8) *Bibliografia* zawierająca 134 pozycje z lat 1974-2022 (większość stanowią prace opublikowane po 2010 roku). W pracy nie zamieszczono objaśnień skrótów. Praca została napisana w języku angielskim na 139. stronach i zawiera 45 rysunków oraz 20 tabel.

Przegląd literaturowy omawia budowę wirusa grypy typu A (IAV), Drugiego koronawirusa ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2) oraz ich mechanizm replikacji. Przedstawione zostały również strategie hamowania namnażania obu wirusów oparte na antysensowych oligonukleotydach, siRNA, kwasach peptydonukleinowych (PNA) oraz związkach chemicznych o niskiej masie cząsteczkowej (w zakresie 0,1-1 kDa). Ta cześć pracy została przygotowana zwięźle i merytorycznie. Tekst wsparty jest 6 rysunkami, głównie związanymi ze strukturami niskocząsteczkowymi, które w dotychczasowych badaniach, w tym wysokoprzepustowego skriningu, wykazały aktywność wobec wirusów będących przedmiotem tej rozprawy. Szkoda, że Doktorantka nie omówiła struktury chemicznej najaktywniejszych związków niskocząsteczkowych, chociażby do jakiej grupy związków należą. To byłoby ciekawe z punktu widzenia wyników otrzymanych w ramach realizacji swojej pracy - identyfikacji struktur o potencjale przeciwwirusowym. Dlatego też *zachęcam Doktorantkę aby w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej, podczas prezentacji wyników pracy, posługiwała się nie tylko symbolami związków (czasami trudnymi do zapamiętania), ale nawiązywała również do ich struktury*.

Wyniki badania przesiewowego o wysokiej przepustowości (High Throughput Screening, HTS), symulacji dynamiki molekularnej (Molecular Dynamic Simulation, MDS), dokowania molekularnego (Molecular Docking, MD), w odniesieniu do RNA obu badanych wirusów, jak i testu biologicznego

93-232 Łódź ul. Lodowa 106	tel.: 042 2723633 fax.: 042 2723630	NIP: 982-03-52-085 REGON: 100492431	Zaopatrzenie tel.: 042 2723600

sprawdzającego właściwości inhibitorowe wobec wirusa grypy A A/California/04/2009 (H1N1) Doktorantka opisała w rozdziale *Wyniki i dyskusja*, podzielonym na 5 podrozdziałów. Opisane wyniki dotyczą m.in. wyboru do badań motywów strukturalnych RNA dla każdego z badanych wirusów, w tym opis opracowania testu wysokoprzepustowego i selekcję związków niskocząsteczkowych z biblioteki Lopac i Enamine. Przeprowadzone badania doprowadziły do wyodrębnienia z biblioteki Lopac 13. związków, a z biblioteki Enamine 21 cząsteczek, oddziałujących z określonymi sekwencjami RNA badanych wirusów, z wyznaczeniem wartości IC50 dla tych związków. Należy dodać, że badania wysokoprzepustowe zostały przeprowadzone we współpracy z Laboratorium Badań Molekularnych oraz Wysokoprzepustowe Laboratorium Skriningowe IChB PAN w Poznaniu. Do tej części wyników mam pytania:

- *Według jakiego mechanizmu barwnik TO-PRO-1 oddziałuje z RNA*?
- *Czy rzeczywiście stężenie molowe związku referencyjnego w stosunku do wszystkich wytypowanych sekwencji RNA było 1000 nM?*
- *Do badań przesiewowych wytypowano następujące sekwencje RNA: dla IAV - M1V (odniesienia), M4; dla SARS-CoV-2 - U1, N1, H-M1, H-M2, H-N1, 3U, U2, ale realnie wykorzystano, w przypadku biblioteki Lopac, dwie sekwencja dla wirusa IAV oraz dwie sekwencje dla wirusa SARS-CoV-2; w przypadku biblioteki Enamine wykorzystano wytypowane wcześniej sekwencje (Tabela 5) bez sekwencji M4? Jaka jest tego przyczyna?*

W następnym etapie badań wykonane zostały symulacje dynamiki molekularnej motywów RNA, celem określenia ich dynamiki wewnętrznej na poziomie atomowym (we współpracy z Prof. Joanną Trylską, Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski). Symulacje te umożliwiły wybranie struktur trzeciorzędowych badanych motywów RNA i wykorzystanie ich do dokowania molekularnego z wcześniej wyselekcjonowanymi związkami niskocząsteczkowymi. Doktorantka napisała, że symulacje dynamiki molekularnej zostały wykonane dla vRNA wirusa CARS-CoV-2. *Czy motyw M4 wirusa IAV został poddany symulacji dynamiki molekularnej gdyż nie jest to opisane w rozprawie, ale jak napisała Doktorantka „w następnym planowanym kroku symulacja dynamiki molekularnej oraz klasterowanie będzie wykonane dla motywu M4”?*
Przeprowadzone dokowania molekularne dla wytypowanych związków oraz motywów RNA z biblioteki Lopac oraz Enamine (wykorzystano związki selektywnie oddziałujące z danym motywem oraz

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630
NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431
Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

posiadające niską wartość IC50) potwierdziły trafność wyników skriningu wysokoprzepustowego. *Czy przy okazji omawiania wyników, podczas publicznej obrony, mogłabym prosić Doktorantkę o wskazanie w strukturze związku D3768 grup biorących udział w tworzeniu wiązania wodorowego w eksperymencie dokowania z motywem M1V?*

Właściwości inhibitorowe wyselekcjonowanych, z obu bibliotek, związków zostały sprawdzone wobec wirusa grypy A A/California/04/2009 (H1N1), ze względu na dostępność odpowiedniego do badania zaplecza laboratoryjnego. Na podstawie tego doświadczenie zidentyfikowano najbardziej interesujące związki: SML1545, B6311, M4008, SML2238 (z biblioteki Lopac), Z154467994, Z134817028, Z15664726 (z biblioteki Enamine). *W związku z otrzymanymi wynikami czy można spekulować o preferencjach strukturalnych związków o potencjalnej aktywności wobec wirusa IAV*?

Część pracy - *Materiały i metody* zawiera opis przeprowadzonych syntez oligonukleotydów, testów biologicznych, analiz dynamiki molekularnej i dokowania oraz skriningu wysokoprzepustowego. Jest ona zredagowana prawidłowo. Poprawność przeprowadzonych analiz nie budzi zastrzeżeń. Większość doświadczeń jest zapisana dokładnie i zawiera wszystkie szczegóły niezbędne do ich odtworzenia. Świadczy to o dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktorantki. Wkradły się jednak drobne nieścisłości – np. podrozdział 6.2.17 – *domyślam się, że końcowe stężenie związku do badań wysokoprzepustowych było 10 μM a nie jak podano 10 mM*? Brak jest informacji o metodzie wyliczenie wartości IC_{50}. Informacja ta jest potrzebna czytelnikowi do zrozumienie i interpretacji „krzywych IC_{50}" (np. Rysunek 13). Nie doszukałam się informacji związanych z analizą statystyczną.

W *Bibliografii* Doktorantka przyjęła zasadę opisywania tekstu źródłowego podając inicjały imienia/imion i nazwisko współautorów, tytułu artykułu, nazwę czasopisma, volumin, zeszyt, strony czasopisma, rok wydania oraz numer doi. Publikacje są numerowane, a w tekście cytowane poprzez podanie przypisanego numeru. Cytowane czasopisma zostały podane w skrócie za wyjątkiem kilku pozycji, które Doktorantka pominęła i podała pełną nazwą czasopism np. odnośniki 6 i 7. Uzupełnieniem rozprawy jest spis wszystkich rysunków i tabel zamieszczonych w pracy.

Recenzowana rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem. Korekta edytorska jest staranna. Zamieszczone rysunki są przejrzyste i czytelne aczkolwiek struktury związków niskocząsteczkowych mogłyby być bardziej dopracowane. Nie wiem czy dobrym pomysłem jest

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630
NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431
Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

nazwanie rysunków zawierających krzywe zależności %inhibicji od stężenie (IC50) tabelami np. Tabela 8. Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej samej rozprawy doktorskiej.

Ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Jarmołowicz zat. *Small molecules interacting with Influenza virus RNA and SARS-CoV-2 RNA as potential inhibitors of replication* jest pracą multidyscyplinarną i łączy metody obliczeniowe oraz eksperymentalne celem identyfikacji niskocząsteczkowego związku chemicznego o aktywności przeciwwirusowej, wśród związków o znanej aktywności biologicznej. Takie podejście zdecydowanie przyspiesza oraz zmniejsza koszty poszukiwania potencjalnego leku. Oryginalnym podejściem jest wykorzystanie RNA wirusa jako tarczy terapeutycznej. Biorąc pod uwagę powyższe, praca ta prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego inspirującego i zachęcającego do kolejnych badań naukowych prowadzących do identyfikacji substancji o aktywności przeciwwirusowej. Rozważając wartość poznawczą jestem przekonana o jego wysokim potencjale publikacyjnym. Doktorantka wykazała się znajomością omawianych zagadnień oraz umiejętnością prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie. Swobodnie porusza się w obszarze badań obliczeniowych i laboratoryjnych. Reasumując, Doktorantka wykazała się wiedzą w uprawianej dziedzinie, umiejętnością prowadzenia badań naukowych oraz oryginalnością rozwiązanego problemu naukowego.

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 128/2022/Internet z dnia 24 października 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Aleksandry Jarmołowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Signature Not Verified
Dokument podpisany przez
Agnieszka Olejniczak
Data: 2023.02.09 15:53:01 CET