



Warszawa, 12.01.2026

dr hab. Elżbieta Nowak
Międzynarodowy Instytut Biologii
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
e-mail: enowak@iimcb.gov.pl
tel.: (48) 22 5970721

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech zatytułowanej
„Transferowy RNA jako substrat deaminazy APOBEC3A”.**

Praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech została wykonana pod opieką prof. Pauliny Jackowiak oraz dr Lucyny Budźko w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Badania opisane przez Doktorantkę dotyczyły potwierdzenia hipotezy zakładającej, że aktywność deaminazy APOBEC3A, odpowiedzialnej w warunkach fizjologicznych za edycję sekwencji ssDNA odnosi się również do cząsteczek tRNA. Podstawą do sformułowania tej hipotezy były niedawne doniesienia o aktywności białka APOBEC3A względem cytydyn występujących w mRNA zlokalizowanych w obrębie struktur typu „spinka do włosów”, a także fakt, że enzymy te pochodzą ewolucyjnie od deaminaz adenozytyny tRNA. Potwierdzenie założeń zaproponowanych przez Doktorantkę umożliwiłoby szersze spojrzenie na zakres działania deaminaz, a także ukierunkowałaby przyszłe badania dotyczące regulacji aktywności enzymów z tej klasy pod kątem wpływu na rozwój zjawisk patologicznych w komórkach ludzkich, m.in. prowadzących do niestabilności genomu i występowania procesów onkogennych.

Praca do recenzji została dostarczona w klasycznej formie książki oraz w postaci pliku pdf. Rozprawa mgr Hoffa-Sobiech ma kompozycję typową dla rozpraw doktorskich i składa się z rozdziałów obejmujących: wprowadzenie do tematyki badań, zdefiniowanie celu badawczego, stanowiącego podstawę przygotowania niniejszej rozprawy doktorskiej, opis metod i materiałów wykorzystanych do przeprowadzenia doświadczeń, uzyskane wyniki, odnoszącą się do nich dyskusję oraz spis literatury. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, a także ogólne wnioski płynące z uzyskanych wyników.

We wstępie Autorka zapoznaje czytelnika z białkami z rodziny AID/APOBEC, omawiając ich ewolucję, funkcje oraz znaczenie biologiczne. Następnie Doktorantka koncentruje się na przedstawieniu dostępnych informacji dotyczących specyficzności substratowej, roli w nowotworzeniu czy też właściwościach przeciwwirusowych białka APOBEC3A, które stanowi przedmiot niniejszej pracy badawczej. Przedstawione dane pozwalają zrozumieć znaczenie i zasadność podjętej tematyki badawczej, co prowadzi do sformułowania celu pracy, którym jest zbadanie aktywności enzymu APOBEC3A wobec tRNA. Ta część pracy została napisana w sposób jasny, spójny i logiczny.

Rozdział „Materiały i Metody” został przygotowany w sposób szczegółowy, co w dużej mierze umożliwia odtworzenie opisanych prac doświadczalnych. Autorka zawarła precyzyjne informacje dotyczące użytych odczynników, szczepów bakteryjnych oraz oligonukleotydów. Zastosowane metody badawcze zostały przedstawione poprawnie i w sposób uporządkowany, jednak w kilku miejscach pojawiają się wątpliwości wymagające doprecyzowania. Uwagi dotyczące tych kwestii zostaną przedstawione w dalszej części niniejszej recenzji.

Wyniki zaprezentowane przez Doktorantkę można podzielić na dwie części. Pierwsza koncentrowała się na uzyskaniu aktywnego białka APOBEC3A, będącego narzędziem badawczym w kolejnych eksperymentach oraz jego nieaktywnego mutantu, pełniącego funkcję kontrolną. Oba warianty białka APOBEC3A uzyskano w fuzji z S-transferazą glutationową (GST), która podczas jednego z etapów oczyszczania była usuwana. Czy istnieje powód, dla którego nie usunięto znacznika heksahistydynowego?

Druga zasadnicza część pracy poświęcona była badaniu aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec różnych substratów: ssDNA, RNA z niemodyfikowaną i modyfikowaną cytydyną. Wykonane i opisane przez Doktorantkę doświadczenia doprowadziły do potwierdzenia hipotezy, że deaminaza APOBEC3A wykazuje aktywność względem reszt cytydynowych w tRNA i stanowi również pierwsze doniesienie o aktywności badanego enzymu względem 5-metylocytydyny w obrębie RNA. Dodatkowo zidentyfikowano edycję cytydyny w puli fragmentów tRNA pochodzących od pacjentów z nowotworami co istotnie wzbogaca przedstawiony materiał badawczy. Choć nie zaobserwowano korelacji ekspresji genu *APOBEC3A* z poziomem edycji tRNA analizowanych cząsteczek, zagadnienie to wydaje się bardzo interesujące i z pewnością zasługuje na pogłębione badania w przyszłości. Ponadto, analiza profilu deaminacji będącego efektem działania APOBEC3A wskazała preferencje dotyczące położenia modyfikowanych rybonukleotydów w obrębie sekwencji tRNA,

otwierając w ten sposób temat badania czynników decydujących o wydajności procesu edycji przez APOBEC3A zależnej od pozycji reszty w obrębie sekwencji i struktury tRNA. Na potencjalny rozwój tego typu badań wpłynie na pewno zoptymalizowana przez Doktorantkę metoda wydajnego uzyskiwania rekombinowanego białka APOBEC3A oraz jego nieaktywnej formy, tj. wariantu E72A w prokariotycznym systemie ekspresji.

Czytając pracę nasunęło mi się kilka uwag i pytań, na które proszę o odpowiedź podczas obrony:

1. Autorka na stronie 77 opisuje położenie reszty cytydynowej (Oligo_dC) oraz na stronie 78 reszty urydynowej (Oligo_dU) jako pozycję 40, podczas gdy zgodnie z sekwencją nukleotydową zamieszczoną w Tabeli 7 jest to pozycja 41. Podobna niezgodność występuje w przypadku 5mdC oraz 5hmdC.
2. Doktorantka opisała trudności w przygotowaniu plazmidu APOBEC3A (WT) w wektorze ekspresyjnym pGEX4T1. Czy rozważano zastosowanie ukierunkowanej mutagenazy na plazmidzie pGEX4T1_E72A_3A w celu odtworzenia sekwencji nukleotydowej kodującej białko typu dzikiego (WT)?
3. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób podczas sączenia molekularnego z użyciem kolumny Superdex 75 zostały rozdzielone białka GST-tag oraz APOBEC3A, skoro – jak sama Autorka wskazuje – mają one bardzo zbliżone masy cząsteczkowe. W obecnym opisie brak jest informacji, które tłumaczyłyby skuteczność rozdziału w takich warunkach.
4. Rysunek 30. Str. 101 opis pod ryciną wskazuje, że zawartość m5rC/hm5rC została wyrażona jako procentowy udział danego nukleozydu w puli wszystkich nukleozydów w próbie, odniesiony do kontroli bez białka. Pomimo tego opisu, wartości przekraczające 100% pozostają biologicznie nieintuicyjne i mogą być mylące dla czytelnika. Wskazane byłoby jednoznaczne doprecyzowanie w legendzie ryciny, że wartości powyżej 100% wynikają z normalizacji oraz zmienności pomiarowej, a nie z rzeczywistego wzrostu poziomu modyfikacji.
5. W pracy przedstawiono wyniki modelowania oddziaływań białka APOBEC3A z wybranymi izodekoderami tRNA, w których zachodziła bardzo wydajna edycja cytydyny. Stwierdzenie Autorki na stronie 93, iż „W żadnym z modeli nie zaobserwowano konfliktów sterycznych między białkiem a tRNA, co potwierdziło możliwość edycji wszystkich trzech pozycji antykodonu”, należy uznać za niefortunne. Wynika to z faktu, że edycja cytydyny w tych pozycjach została wcześniej potwierdzona

eksperymentalnie, zatem brak konfliktów sterycznych w modelach nie wnosi nowej informacji. Zasadne byłoby natomiast rozszerzenie analizy o modelowanie innych pozycji w tRNA, które ulegają edycji cytydyny z niską wydajnością lub nie ulegają jej wcale, co mogłoby pozwolić na wyjaśnienie mechanizmu tych różnic na poziomie molekularnym.

6. W ramach niniejszej rozprawy opracowano pierwsze modele wiązania pętli antykodonowej tRNA przez APOBEC3A. Czy podejmowane już były lub planowane są próby potwierdzenia modelu poprzez zbadanie stabilności oddziaływań lub tworzenia się kompleksu APOBEC3A-tRNA dla rekombinowanej deaminazy APOBEC3A zawierającej substytucje aminokwasowe w obrębie pętli L3?

Praca została napisana zrozumiałym i jasnym językiem naukowym. W tekście występują jedynie nieliczne błędy edytorskie, np. „ANNOVA” zamiast „ANOVA” w opisie rysunków 17, 19, 30 i 32 lub „deminować” zamiast „deaminować” na stronie 117. Podczas redagowania pracy wkraśl się błąd numeracji rozdziałów w części „Dyskusja”, dotyczący rozdziału 5.4.2 „Wpływ deaminacji na biogenezę i funkcje tRF” oraz rozdziału 5.4 „Deaminacja 5-metylocytydyny w RNA”, natomiast w wersji książkowej strona 34 poprzedza strony 32 i 33. Zwracam również uwagę na stosowane przez Doktorantkę sformułowanie „odporność na antybiotyki” zamiast poprawnego „oporność”. Ponadto, w opisie struktury trzeciorzędowej białka APOBEC3A Doktorantka wskazuje występowanie 5 β -harmonijek, co jest mylące, ponieważ w strukturze występuje jedna β -harmonijka (kartka) zbudowana z 5 β -wstążek.

Przedstawione przez mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej i naukowej przedstawionej pracy, którą oceniam bardzo pozytywnie. Stanowi ona istotny wkład w zrozumieniu funkcji APOBEC3A oraz wyjaśnienia zjawisk związanych z niestabilnością genomową, mutagenezą nowotworową oraz potencjalnym wykorzystaniem tych enzymów w biotechnologii i medycynie.

Podsumowując stwierdzam, że 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.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Elżbieta Nowak