

Prof. dr hab. Krzysztof Liberek
Zakład Biochemii Białek
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 7.01.2026

Opinia o rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech zatytułowanej
„Transferowy RNA jako substrat deaminazy APOBEC3A”

W rozprawie doktorskiej mgr inż. Karolina Hoffa-Sobiech przedstawia badania mające na celu weryfikację hipotezy mówiącej, że cząsteczki tRNA mogą być substratem ludzkiej deaminazy APOBEC3A. Praca doktorska mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN pod kierunkiem promotora dr hab. Pauliny Jackowiak, prof. ICHB PAN oraz promotora pomocniczego dr Lucyny Budźko.

Rozprawa doktorska ma układ tradycyjny. Liczy 138 strony. Praca opatrzona jest *Wstępem*, w którym autorka opisuje funkcje występujących u człowieka poszczególnych 11 deaminaz, należących do rodziny AID/APOBEC. Białko APOBEC3A, należące do tej rodziny i będące tematem rozprawy doktorskiej, jest opisane szczególnie dokładnie. Pokazano między innymi, że ta deaminaza wykazuje zdolność do deaminacji cytydyn w jednoniciowym DNA oraz mRNA. Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej.

W rozdziale *Materiały Metody* doktorantka bardzo dokładnie opisała stosowane przez siebie procedury i podejścia eksperymentalne. Według mnie zabrakło tu jednak choćby krótkiego opisu zamieszczonych w doktoracie doświadczeń wykonanych przez współpracowników doktorantki, co utrudnia ich zrozumienie.

W rozdziale *Wyniki* doktorantka przedstawiła badania, które zastosowała w celu scharakteryzowania aktywności, puli substratów i preferencji deaminazy APOBEC3A. Tok badawczy jest dobrze zaplanowany. Jako kontrolę negatywną w eksperymentach zastosowano enzymatycznie nieaktywny wariant deaminazy APOBEC3A. Oba te enzymy

zostały przez doktorantkę sklonowane do plazmidów ekspresyjnych, nadprodukowane w *E. coli* oraz oczyszczone. Klonowanie i nadprodukcja dzikiej formy APOBEC3A nastręczała problemy z uwagi na toksyczność tego białka dla bakterii, co wymusiło modyfikacje w procedurach i zastosowanie plazmidu ze ścisłą kontrolą nadprodukcji produktów białkowych. Następnie doktorantka analizowała aktywności wyizolowanych enzymów wobec substratów (ssDNA, oraz jednoniciowe fragmenty RNA), dla których takie aktywności zostały uprzednio opisane. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi, co pozwoliło na przystąpienie do analizy aktywności deaminazy względem tRNA. Doktorantka wyizolowała pulę tRNA z komórek HEK293T, poddała je deaminacji przy użyciu APOBEC3A i pokazała metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej, że deaminacja cytydyn zachodzi. Następnie określiła wzór edycji tRNA przez APOBEC3A wykorzystując do tego stworzoną przy użyciu metody YAMAT-seq bibliotekę tRNA. Takie podejście pozwoliło doktorantce zidentyfikować 55 izodekoderów tRNA, w których cytydyna ulegała edycji na 87 zidentyfikowanych izodekoderów tRNA. Doktorantka pokazała, że w większości przypadków do edycji cytydyn dochodzi w pętli antykodonu. Znalazła też przypadki edycji w pętli D i pętli zmiennej. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła doktorantce na określenie częstości występowania poszczególnych nukleozydów w bliskim otoczeniu cytydyny, która uległa deaminacji. Należy jednak zauważyć, że analiza zdolności APOBEC3A do deaminacji cytydyn w tRNA *in vitro* została wykonana w warunkach preferujących zachodzenie tej reakcji enzymatycznej. Czas reakcji to 3 godziny a stechiometria enzymu w stosunku do hipotetycznych substratów wynosiła ok. 1:1. Czy doktorantka prowadziła podobne reakcje w warunkach mniej preferencyjnych? Czy doktorantka rozważała analizę zdolności APOBEC3A do deaminacji cytydyn w tRNA w warunkach *in vivo*, np. w komórkach HEK293T, przy nadprodukcji i/lub wyciszeniu ekspresji APOBEC3A?

Następnie doktorantka analizowała edycję cytydyny do urydyny w tRNA w komórkach nowotworowych. Wykorzystała w tym celu sekwencje krótkich RNA zdeponowane w ramach projektu *The Cancer Genome Atlas*. Analizy dokonano na poziomie fragmentów (tRF) pochodzących z tRNA z uwagi na brak sekwencji tRNA w bazie, wynikający z metodycznych problemów z sekwencjonowaniem całych tRNA. Zidentyfikowano dwa izodekodery, w których edycja następowała w szeregu nowotworach u stosunkowo dużej liczby pacjentów. Jeden z nich ulegał edycji w pierwszej, a drugi w trzeciej pozycji antykodonu. Należy zauważyć, że edycja została wykryta u kilkunastu procent pacjentów oraz że częstości edycji były znaczące

niższe niż te uzyskane przez doktorantkę dla tych izodekoderów w eksperymentach edycji *in vitro*. Doktorantka nie znalazła korelacji pomiędzy poziomem edycji poszczególnych izodekoderów a ekspresją genu APOBEC3A. Czy doktorantka analizowała, jaki był procent pacjentów, u których równocześnie zachodziła edycja w obu analizowanych izodekoderach? Czy był on wyższy niż wynikający z niezależnego występowania aktów edycji? Czy u takich pacjentów analizowano poziom ekspresji APOBEC3A? Należy też zauważyć, że cytydyny, które ulegały deaminacji w obu izodekoderach nie znajdowały się w preferowanym motywie sekwencyjnym 5'UC, który został zdefiniowany przez doktorantkę w wyniku analizy deaminacji w tRNA pochodzącym z komórek HEK293T i który był zgodny z wynikami innych autorów uzyskanymi dla mRNA i ssDNA. Czy może to sugerować, że to nie deaminaza APOBEC3A odpowiada za tego typu edycję w komórkach nowotworowych?

Następnie doktorantka analizowała zdolność APOBEC3A do deaminacji 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym fragmencie mRNA oraz w tRNA - Leu-CAA. Doktorantka pokazała, że APOBEC3A deaminuje 5-metylocytydynę, natomiast nie posiada takiej aktywności w stosunku do 5-hydroksymetylocytydyny.

Zauważam, że Doktorantka bardzo wyraźnie zaznacza w doktoracie, które eksperymenty wykonała sama, a które we współpracy (np. analizy z wykorzystaniem ultrawydajnej chromatografii cieczowej, eksperymenty dynamiki molekularnej czy też analizy bioinformatyczne). Zamieszczenie tych wszystkich eksperymentów było istotne dla przedstawienia toku badawczego tak, aby stanowił on całość.

W rozdziale *Dyskusja* doktorantka przedstawia swoje wyniki w szerszym kontekście. Przedstawia możliwe konsekwencje deaminacji cytydyn w tRNA prowadzące między innymi do błędnego wbudowywania aminokwasów do syntezy białek i ewentualnych zmian w metabolizmie tRNA. Doktorantka krytycznie dyskutuje wyniki związane z potencjalną deaminacją cytydyn przez APOBEC3A w materiale pochodzącym z nowotworów.

Inne uwagi:

Opis oczyszczania APOBEC3A sugeruje, że preparat oczyszczonego białka był w rzeczywistości mieszaniną APOBEC3A i znacznika GST. Doktorantka nie wskazała czy i w jaki sposób pozbyła się znacznika GST. Na stronie 74 doktorantka pisze „Po trawieniu trombiną, analiza elektroforetyczna wykazała obecność prążka odpowiadającego zarówno białku APOBEC3A jak i GST, z których każde ma masę ~23 kDa (rysunek 12).” Kilka linii dalej stwierdza: „Drugi etap oczyszczania otrzymanych preparatów białkowych przeprowadzono metodą

sączenia molekularnego. Zastosowanie tego podejścia pozwoliło na rozdział poszczególnych białek (a więc odciętego znacznika GST, rekombinowanego białka, trombiny oraz potencjalnych pozostałości rekombinowanego białka z nieodciętym znacznikiem GST) ze względu na ich rozmiar i zebranie ich w oddzielnych frakcjach.” Czy rzeczywiście poprzez sączenie molekularne oddzielono znacznik GST od APOBEC3A? Oba te białka posiadają bardzo podobną masę molekularną. W doktoracie nie pokazano całości wyników sączenia molekularnego.

Doktoranta aktywność APOBEC3A badała między innymi metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej (UPLC). Opisy tej metody są na stronie 79 oraz w podrozdziale 3.2.14.2 (Materiały i metody). Dotyczą one jednak wyłącznie tego, co zostało wykonane przez doktorantkę samodzielnie, czyli sposobu przygotowania próbek do dalszej analizy. W żadnym z tych miejsc nie ma informacji, że po rozdziale chromatograficznym przeprowadza się również analizę przy użyciu spektrometrii mas. Natomiast na stronie 84 niespodziewanie pojawia się zdanie „Spektrometria mas umożliwiła ilościową analizę zmian poziomu cytydyny oraz urydyny w badanych próbach.” Informację o powiązaniu technik chromatograficznych ze spektrometrią mas do analizy aktywności APOBEC3A w metodzie UPLC można dopiero znaleźć w manuskrypcie złożonym w bazie preprintów bioRxiv (doi.org/10.1101/2025.06.10.658825) zawierającym przedstawione w doktoracie badania.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech przedstawia nowe, oryginalne badania, w których analizuje ona aktywność deaminazy APOBEC3A wobec tRNA. Analiza została przeprowadzona zarówno w warunkach *in vitro* jak i doktorantka podjęła próby znalezienia efektów tej modyfikacji w puli tRNA pochodzących z komórek nowotworowych umieszczonych w bazie danych. Doktorantka pokazała również, że APOBEC3A posiada zdolność do deaminacji 5-metylocytydyny w fragmencie mRNA oraz w tRNA.

Uważam, 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.). Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.