

Warszawa, 12-01-2026

dr hab. Roman Szczęsny, prof. IBB PAN

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech
"Transferowy RNA jako substrat deaminazy APOBEC3A"***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Pauliny Jackowiak, prof. ICHB PAN. Rolę promotora pomocniczego pełniła dr Lucyna Budźko.

Sekwencja nukleotydowa zawarta w genomie jest podstawową instrukcją decydującą o budowie i funkcjonowaniu komórek, tkanek i organizmów. Instrukcja ta może podlegać modyfikacji zarówno na poziomie DNA jak i RNA. Proces ten nazywany edycją kwasów nukleinowych jest katalizowany przez specyficzne enzymy odpowiedzialne m.in. za deaminację (deoksy)cytydyny do (deoksy)urydyny. Wiadomo, że u człowieka proces ten zależy od białek należących do rodziny AID/APOBEC. Białka te są zróżnicowane pod względem aktywności, lokalizacji wewnątrzkomórkowej, poziomu ekspresji i funkcji. Jednym z najlepiej poznanych reprezentantów rodziny białek AID/APOBEC jest białko APOBEC3A. Dotychczas wykazano, że białko to ma duże znaczenie dla edycji jednoniciowego DNA, a jego zwiększony poziom ekspresji może prowadzić do mutacji i rozwoju chorób nowotworowych. Z tego powodu badania APOBEC3A są istotne dla zrozumienia i potencjalnej prewencji niektórych chorób człowieka.

Badania ostatnich lat wykazały, że APOBEC3A może także modyfikować RNA. Jednakże, nie wiadomo było czy enzym ten może modyfikować transferowy RNA. Na podstawie trzech dobrze uzasadnionych przesłanek mgr inż. Karolina Hoffa-Sobiech postawiła hipotezę, że ludzkie białko APOBEC3A modyfikuje tRNA. Celem prac badawczych wykonanych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej było eksperymentalne zweryfikowanie tej hipotezy. W mojej ocenie cel rozprawy został dobrze zidentyfikowany i klarownie zdefiniowany. Do jego realizacji opracowano plan badawczy składający się z kilku etapów, których wykonanie pozwoliło osiągnąć zamierzony cel.

Posługując się metodami biologii molekularnej Doktorantka doprowadziła do heterologicznej nadprodukcji białka APOBEC3A oraz jego wariantu katalitycznie nieaktywnego w komórkach bakteryjnych, a następnie oczyściła badane białka stosując chromatografię powinowactwa i sączenie molekularne. Co ważne, warto podkreślić, że do produkcji białka APOBEC3A należało zoptymalizować warunki produkcji białka w komórkach bakteryjnych ze względu na jego „toksyczny” wpływ na komórki produkujące. Po uzyskaniu preparatu białka APOBEC3A w wersji „dzikiej” oraz w wersji z

podstawieniem kwasu glutaminowego w pozycji 72 na alaninę Doktorantka przeprowadziła serię badań biochemicznych, w których potwierdziła spodziewaną aktywność katalityczną APOBEC3A z wykorzystaniem jednoniciowego DNA jako substratu. Jednocześnie, wykazała, że białko w wersji E72A nie posiadało aktywności deaminazy deoksycytydyny lub jej pochodnych. W kolejnym etapie Doktorantka sprawdziła czy APOBEC3A może modyfikować tRNA wyizolowany z komórek ludzkich. Wstępna analiza przeprowadzona z wykorzystaniem ultrawydajnej chromatografii cieczowej wskazała, że może dochodzić do tego typu reakcji. Jednakże, kluczowe było potwierdzenie takiego wniosku wykorzystując alternatywną metodę opartą o sekwencjonowanie tRNA. W tym celu Doktorantka wykorzystwała procedurę zoptymalizowaną do sekwencjonowania tRNA. Co ważne, stwierdziła, że 35 izodekoderów tRNA podlega modyfikacji z wydajnością co najmniej 10%. W ten sposób mgr inż. Karolina Hoffa-Sobiech wykazała, że APOBEC3A może modyfikować ludzki tRNA *in vitro*. Co ciekawe, większość modyfikacji dotyczyło antykodonu, a poszczególne izodekodyery różniły się frakcją zmodyfikowanego tRNA. Wyniki badań Doktorantki sugerują, że modyfikacja tRNA zależna od APOBEC3A może wpływać na odczyt informacji genetycznej i pełnić rolę regulatorową. W kolejnym etapie badań Doktorantka stwierdziła, że APOBEC3A może *in vitro* edytować 5-metylocytydynę w liniowej cząsteczce RNA, a także do pewnego stopnia w wybranych tRNA. Badanie przeprowadzone przez mgr inż. Karolinę Hoffa-Sobiech wskazują, że aktywność APOBEC3A może zależeć od sekwencji lub struktury RNA.

Rozprawa doktorska została przygotowana w postaci monografii, w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Wstęp został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Przedstawiona do recenzji praca zawiera bogate piśmiennictwo. Doktorantka zadbała o to, aby starannie przygotować rozprawę pod względem edycyjnym. W pracy zauważyłem nieliczne błędy/pomyłki edycyjne. Te nieliczne błędy nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przygotowania rozprawy. Pracę czyta się bardzo dobrze. Uważam, że Kandydatka bardzo dobrze opanowała umiejętność przygotowywania tekstów naukowych.

Rozdział „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badań. Kandydatka przygotowując tę część rozprawy wykazała się znajomością tematyki badań, a także umiejętnością doboru poziomu szczegółowości prezentowanych informacji.

W rozdziale „Materiały i metody” w dokładny sposób opisane zostały stosowane metody oraz materiały badawcze. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów. Autorka opanowała warsztat badawczy niezbędny do realizacji celów prowadzonych badań.

W rozdziale „Wyniki” Autorka zaprezentowała wyniki przeprowadzonych badań w sposób ułatwiający ich analizę oraz zasadność wykonania poszczególnych eksperymentów. Autorka dobrze uzasadnia poszczególne etapy swoich prac. Część badań opisanych w rozprawie, tj. analiza dynamiki molekularnej modeli kompleksu APOBEC3A z tRNA lub analiza danych z sekwencjonowania NGS, zostało wykonanych przez innych członków Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN. Wskazuje to na umiejętność Doktorantki do współpracy z innymi badaczami co w mojej ocenie jest bardzo ważną umiejętnością.

Doktorantka w dojrzały sposób interpretuje rezultaty swojej pracy naukowej w rozdziale „Dyskusja”. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są omawiane i analizowane na tle danych literaturowych. W szczególności Autorka w interesujący sposób omówiła możliwe znaczenie funkcjonalne modyfikacji RNA zależnych od APOBEC3A.

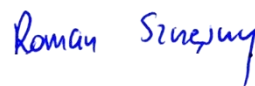
Główne wyniki uzyskane przez Autorkę zostały opisane powyżej. W tym miejscu chciałbym poprosić Autorkę o komentarz do następujących zagadnień:

- Czy białka z rodziny APOBEC są zależne tylko i wyłącznie od jonów cynku? Czy inne jony mogą być wykorzystywane jako kofaktor? Czy wpływa to na specyficzność substratową?
- Schemat przedstawiony na Rysunku 8 wskazuje, że aktywność APOBEC3A prowadzi do degradacji genomu. Jaki jest mechanizm tej degradacji? Dlaczego aktywność APOBEC3A prowadzi do degradacji genomu? Czy chodzi o genom wirusa czy gospodarza?
- Dlaczego w oznaczeniach z użyciem UPLC reakcję z APOBEC3A prowadzono przez 3 godziny, a w przypadku oznaczenia metodą biochemiczną 30 minut? Co wiadomo o szybkości reakcji katalizowanej przez APOBEC3A.
- Czy w preparacie białka analizowanego za pomocą spektrometrii mas wykryto GST? Czy sączenie molekularne pozwoliło na całkowite rozdzielenie GST od APOBEC3A? Sądzę, że wartościowe byłoby przedstawienie w pracy chromatogramu z sączenia molekularnego.
- Jaką wartość przedstawiają wykresy przedstawione na Rysunku 17 i 19 – średnią, medianę? Ile powtórzeń eksperymentu reprezentują?
- Dlaczego do analizy tRNA zastosowano próg pokrycia 250? Jak wyznaczono ten próg? (strona 86)

Osiągnięcia Doktorantki w upowszechnianiu wyników swoich badań oceniam pozytywnie. Doktorantka jest równorzędną pierwszą autorką pracy przeglądowej opisującej deaminazy jako narzędzie w medycynie i biotechnologii. Praca ta została opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie *Molecular Therapy Nucleic Acids*. Doktorantka jest również pierwszą autorką manuskryptu udostępnionego w repozytorium *bioRxiv* opisującego wyniki przedstawione w recenzowanej monografii. Pozwala to przypuszczać, że dorobek publikacyjny mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech zwiększy się w nieodległej przyszłości.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech **oceniam pozytywnie**. Podkreślić należy jednoznacznie sprecyzowany cel badawczy i konsekwentną ścieżkę badawczą. Uważam, że praca mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

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 mgr inż. Karoliny Hoffa-Sobiech do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**



dr hab. Roman Szczęsny