



Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Dział Chemii Bioorganicznej

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Tel. +48-42-6803248, +48-604-783945

www.cbmm.lodz.pl

Łódź, 10 lutego 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Jarmołowicz p.t.
„Small molecules interacting with Influenza virus RNA and SARS-CoV-2 RNA as potential inhibitors of replication”

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Jarmołowicz została wykonana w Pracowni Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Kierzek, w ramach projektu *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanego wspólnie przez zespoły z Politechniki Poznańskiej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Przedmiotem rozprawy jest poszukiwanie niskocząsteczkowych ligandów hamujących namnażanie wirusa grypy typu A (ang. *Influenza A virus*, IAV) i drugiego koronawirusa ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2).. Tematyka związana z genomiką strukturalną wirusów RNA od szeregu lat jest z powodzeniem rozwijana przez Promotorkę rozprawy, która zainicjowała badania w tym obszarze badawczym; odkrywa ważne funkcjonalnie motywy strukturalne wybranych wirusów RNA i zmierza do opracowania efektywnych inhibitorów cyklu życiowego tych wirusów w oparciu o niskocząsteczkowe związki organiczne i terapeutyczne kwasy nukleinowe. W dobie pandemii SARS-CoV-2 i efektywnych szczepionek przeciwwirusowych na bazie RNA badania te wpisują się w nowoczesny trend wykorzystania cząsteczek RNA jako potencjalnych celów terapeutycznych ale też jako potencjalnych leków.

W niniejszej recenzji przedstawiam ocenę ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w uprawianej dyscyplinie naukowej, umiejętności prowadzenia badań naukowych oraz oryginalności rozwiązanego problemu naukowego.

Rozprawa Doktorska napisana w języku angielskim, zawiera precyzyjnie opisany cel badań, streszczenie (także w języku polskim), wstęp przedstawiający aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (22 strony), opis wyników badań własnych i ich dyskusję (73 strony), krótkie podsumowanie oraz część eksperymentalną. Uzupełnieniem opisu jest lista tabel i rycin zawartych w rozprawie oraz spis literatury liczący 134 pozycje.

Ogólną wiedzę Doktorantki oceniłam zarówno na podstawie literaturowego opracowania zagadnienia przedmiotu, jak i dyskusji uzyskanych wyników w świetle już opublikowanych danych. We wstępie teoretycznym Doktorantka krótko scharakteryzowała stan wiedzy na temat struktury i cyklu replikacyjnego wirusa grypy typu A i koronawirusa SARS-CoV-2. Obydwa te wirusy zawierają informację genetyczną kodowaną w łańcuchu RNA i ich replikacja zachodzi z udziałem polimerazy RNA zależnej od RNA. Charakteryzują się znaczną genetyczną zmiennością związaną z występowaniem mutacji i reasortacji genetycznej prowadzącej do powstawania nowych podtypów, które w sprzyjających warunkach mogą wywołać pandemię. W ostatnich latach przyszło nam przeżyć dwie takie pandemie, spowodowane przez pojawienie się właśnie podtypu A wirusa grypy oznaczonego jako H1N1 (w roku 2009) i obecnie wirusa SARS-CoV-2 (od roku 2020). Dlatego w pełni zrozumiałe są próby opracowania

podejść terapeutycznych do zahamowania replikacji wirusów oraz zapobiegania śmiertelnym skutkom powodowanych przez nie infekcji. Doktorantka w zwięzły sposób omówiła strategie hamowania namnażania obu wirusów. Podejścia takie zwykle koncentrują się na blokowaniu interakcji pomiędzy wirusowym białkiem a komórką gospodarza, jednakże na potrzeby niniejszej rozprawy Doktorantka skupiła się na strategiach celowania w wirusowe RNA za pomocą wybranych grup inhibitorów, głównie oligonukleotydów antysensowych (ASO), krótkich interferujących RNA (siRNA) i tzw. peptydowych kwasów nukleinowych (ang. *peptide nucleic acid*, PNA). Wiele z cytowanych prac pochodzi z macierzystego zespołu, a dotyczą one wykorzystania potencjału terapeutycznych kwasów nukleinowych w rozpoznaniu specyficznych motywów strukturalnych wirusowego RNA i blokowaniu wirusa w procesie replikacji. Drugą ważną grupą leków celowanych w struktury kwasów nukleinowych (DNA i RNA) są organiczne związki niskocząsteczkowe. Doktorantka w tej części rozprawy bardzo skrótowo przypomniła zasady projektowania niskocząsteczkowych leków i omówiła kilka przykładów związków, wyselekcjonowanych jako ligandy wybranych elementów strukturalnych DNA i RNA, przy czym podkreśliła, że mniejsze znaczenie w tym rozpoznaniu ma sama sekwencja cząsteczek docelowych w porównaniu do struktury przestrzennej motywów kwasów nukleinowych.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag krytycznych, a mianowicie uważam, że Doktorantka zbyt skrótowo, i przez to nie do końca poprawnie merytorycznie, omówiła zasadę działania terapii antysensowej z zastosowaniem krótkich oligonukleotydów DNA. Z całą pewnością oligonukleotydy ASO nie „degradują RNA” (strona 22, zdanie szóste i kolejne), a zależność sekwencji ASO od sekwencji (czego?) nie jest klarownie wyjaśniona. Co więcej, w tekście brak wyjaśnienia mechanizmu strategii antysensowej poprzez aktywację RNazy H; kiedy ta aktywacja następuje i czym się różni oligonukleotyd DNA od gapmeru, jaki to ma związek z aktywacją enzymu. Kolejna moja uwaga dotyczy informacji o funkcji modyfikowanych cząsteczek siRNA (strona 27, wiersz 7), a mianowicie jaka była intencja autorki przy użyciu sformułowania „selected siRNAs were tested with a diverse number of modifications to improve siRNA inhibition”? Być może jest to tylko błąd gramatyczny / stylistyczny i chodziło o wyrażenie „to improve siRNA inhibition properties”. Proszę o wyjaśnienie. Warto też zwrócić uwagę na kolejne zdanie, mówiące o tym, że „2'-fluoro and triphosphate modifications showed the highest antiviral activity [56].” Proszę o sprostowanie tego stwierdzenia, bo prawdopodobnie chodzi tutaj o tiofosforanowe (a nie trifosforanowe) modyfikacje siRNA, co jest opisane w pracy wywodzącej się z macierzystego zespołu Doktorantki. Uwagi te nie dyskredytują wiedzy Doktorantki, natomiast są wskazówką o potrzebie stosowania precyzyjnego języka w tekstach naukowych.

Przechodząc do omówienia wartości merytorycznej rozprawy pragnę podkreślić, że cel pracy został precyzyjnie sformułowany i dotyczył identyfikacji związków organicznych, które wykazują wysokie powinowactwo do wirusowego RNA i mogą hamować propagację wirusa grypy typu A lub wirusa SARS-CoV-2. W pracy zastosowano panel kilku metod badawczych, tzw. mokrych, w tym badanie przesiewowe o wysokiej przepustowości (tzw. *high throughput screening*, HTS) ligandów wiążących RNA i badania replikacji wirusa w systemie komórkowym w obecności wyselekcjonowanych ligandów. Użyto również metody bioinformatyczne, w tym dynamikę molekularną motywów strukturalnych RNA i molekularne dokowanie wyselekcjonowanych ligandów do wybranych fragmentów RNA.

W pierwszych etapie badań zastosowano *skrining* związków dostępnych w dwóch komercyjnych bibliotekach, Lopac i Enamine, w stosunku do konserwatywnych motywów strukturalnych zidentyfikowanych w wirusowych RNA. Dla RNA wirusa IAV przetestowano 5, a dla SARS-Cov-2 7 motywów strukturalnych. Zastosowano tutaj wariant metody oparty na tzw. teście wyparcia wskaźnika fluorescencyjnego, polegający na wykorzystaniu fluorescencyjnego wskaźnika (jodku TO-PRO-1), silnie wiążącego się do RNA, a następnie podaniu indywidualnego składnika biblioteki. Dla związków stanowiących ligandy RNA obserwowano wyparcie barwnika fluorescencyjnego i zmianę intensywności

fluorescencji badanej próbki. W pierwszym etapie wyznaczono wartości EC_{50} dla 12 motywów strukturalnych RNA, a finalnie wyselekcjonowano 9 takich motywów (M1V, M4, U1, N1, H-M1, H-M2, H-N1, 3U i U2, wymienionych w Tabeli 5), dla których udało się opracować test HTS.

Mam tutaj kilka uwag krytycznych odnośnie przygotowania tego testu. Po pierwsze, w pracy zabrakło mi dokumentacji potwierdzającej strukturę zsyntezowanych oligonukleotydów RNA, oraz ich termodynamicznej charakterystyki fałdowania, a więc uzyskania właściwej i stabilnej struktury drugorzędowej dla każdego RNA. Jest to szczególnie ważne, zwłaszcza że w kilku przypadkach, w celu zwiększenia stabilności struktury danego motywu, do RNA wprowadzono dodatkowe pary G-C. Po drugie, jakie były przesłanki do stosowania inkubacji RNA w temp. 65 °C, a nie wyższej? Ustrukturalizowana długa cząsteczka RNA rozplata się w temperaturze powyżej 80 °C, zaś odtwarzanie struktury następuje w niższych temperaturach, optymalnie w temperaturze 65 °C. I jeszcze jedno pytanie, według jakiej zależności obliczono wartości EC_{50} dla wybranych motywów RNA?

W kolejnym etapie testu wyparcia dla każdego składnika biblioteki wyznaczono wartość IC_{50} , a więc wartość stężenia liganda, przy którym sygnał fluorescencji próbki RNA/barwnik zmniejszał się o połowę. I tak, wykorzystując 1280 bioaktywnych związków biblioteki Lopac, wyselekcjonowano finalnie 14 związków wiążących się do czterech motywów strukturalnych RNA – dwóch wirusa grypy (M1V i M4) oraz dwóch (N1 i U1) wirusa SARS-CoV-2. Wykazano, że tylko trzy związki (Table 8) stanowią selektywne ligandy motywu M1V, dwa motywu M4 (Table 9) i trzy motywu N1 (Table 10), natomiast żaden z wyselekcjonowanych ligandów nie był selektywny dla motywu U1. Wartości IC_{50} plasowały się na poziomie stężeń mikromolowych, a więc stosunkowo wysokich w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Interesującym wynikiem było wyselekcjonowanie związku M6545, który wykazywał silne powinowactwo do wszystkich badanych motywów strukturalnych RNA. W tej części rozprawy **mam dwie drobne uwagi krytyczne, a mianowicie, czy nie zreczniej byłoby nazwać wykresy dla wyznaczania wartości IC_{50} jako Ryciny (Figure), a nie Tabele (Table 8-10)? Takie rozwiązanie wybrano np. w Figurze 13, ale generalnie część zestawionych wyników powinna być zebrana w rycinach a nie w tabelach. Poza tym w Tabeli 8 pomyłony jest symboli liganda (drugi raz użyto nr B1686 zamiast D3768).**

W teście HTS z wykorzystaniem liczącej 8960 bioaktywnych związków biblioteki Enamine wyselekcjonowano 21 ligandów (Table 11) efektywnie wiążących się do ośmiu motywów strukturalnych RNA – jednego wirusa grypy (M1V) i siedmiu wirusa SARS-Cov-2 (U1,N1,H-M1, H-M2, H-N1, 3U i U2), z wartościami IC_{50} w zakresie mikromolowym (Table 12). Doktorantka wyróżniła motywy RNA wiążące selektywnie pojedyncze ligandy (np. 3U, H-M2, H-N1 czy N1), oraz motywy wiążące po kilka ligandów (np. H-M2 czy H-N1). W zasadzie, można uznać, że sytuacja, w której jeden ligand wiąże się do kilku motywów RNA, tak ja w przypadku związku Z1272208728 (wiąże się do H-M1, H-M2 i U1) czy Z134817028 (wiąże się do H-M1, H-M2 i H-N1) jest bardzo korzystna w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych, gdyż generalnie daje większą możliwość związania się tego liganda z wirusowym RNA.

Oczywiście, otrzymane w tej części wyniki powinny zostać przeanalizowane na gruncie wiedzy teoretycznej i sprawdzone praktycznie, co faktycznie miało miejsce w kolejnych etapach rozprawy doktorskiej. I tak, wykorzystując metodę dynamiki molekularnej przeprowadzono charakterystykę struktury trzeciorzędowej wybranych motywów strukturalnych vRNA SARS-CoV-2, a otrzymane modele 3D wykorzystano do dokowania molekularnego wyselekcjonowanych wcześniej ligandów. Wygenerowane zostały motywy wirusowego RNA SARS-CoV-2 użyte wcześniej w badania HTS, takie jak: U1, N1, H-M1, H-M2, H-N1, 3U i 3U (Tabela 3). W przypadku motywu N1 uwzględniono dwie struktury – N1a i N1b, które charakteryzują się podobną stabilnością w symulowanym systemie dynamiki

molekularnej i podobną stabilnością termodynamiczną. Otrzymane struktury motywów RNA dla wirusa IAV i SARS-CoV-2 poddano analizie grupowania według algorytmu k-średnich. W trakcie analizy wybrano 5 klatek (*clusters*) z symulacji pokazanych w Tabeli 15 i wyznaczono parametry grupowania. Poszczególne klatki, po odpowiednim przygotowaniu, posłużyły jako modele receptorów w dokowaniu molekularnym wcześniej wyselekcjonowanych ligandów. Badanie za pomocą oprogramowania AutoDock Vina 1.1.2. pozwoliło przewidzieć interakcje pomiędzy receptorem i ligandem, w tym pozycjonowanie obu cząsteczek względem siebie, możliwe wiązania wodorowe i odległości między atomami. Znakomitą część rozprawy stanowią wizualizacje poszczególnych motywów RNA z ligandami z obu testowanych bibliotek i zestawienia zmian energii swobodnej Gibbsa dla powstawania kompleksów poszczególnych ligandów wiążących się do poszczególnych klastrów tego samego motywu RNA. Najważniejszym wnioskiem z analiz *in silico* dla wszystkich kompleksów docelowych vRNA jest wykazanie powinowactwa pomiędzy wyselekcjonowanymi w metodzie HTS ligandami a badanymi motywami strukturalnymi RNA.

Finalnie, Doktorantka poprawnie sprawdziła aktywność wyselekcjonowanych w teście HTS ligandów (dla obu bibliotek) w systemie komórkowym. Do tego celu użyła komercyjnie dostępnych komórek nabłonkowych MDCK (ang. *Madin-Darby Canine Kidney*) pozyskiwanych z moczowodu psów, powszechnie wykorzystywanych w badaniach wirusologicznych. W pierwszym etapie, za pomocą testu fluorescencyjnego zidentyfikowała ligandy cytotoksyczne dla badanych komórek (6 związków z biblioteki Lopac i 14 z biblioteki Enamine). Pozostałe, odpowiednio, 8 i 7 związków, , przetestowała w kontekście ich aktywności inhibitorowej w stosunku do wirusowego RNA w komórkach zainfekowanych szczepem wirusa grypy typu A/California/04/2009 (H1N1). Wykorzystała tutaj immunofluorescencyjny test tworzenia ogniska (IFA) i metodę RT-qPCR. Test IFA pomaga wykluczyć nieaktywne i niezdolne do infekowania wiriony z ilościowej analizy wirusa. Wykazała, że wszystkie testowane związki hamują namnażanie wirusa, a w konsekwencji spadek miana wirusa. Wyniki te potwierdziła analizując ilość kopii wirusa IAV, za pomocą metody RT-qPCR. Otrzymane wyniki w sposób oczywisty potwierdziły, że cztery związki z biblioteki Lopac oraz trzy z Enamine hamowały namnażanie wirusa grypy IAV w znacznym stopniu. Warto zauważyć, że w badaniach tych udało się zidentyfikować kilka nowych związków hamujących propagację wirusa grypy, związków, które stanowią grupę kandydatów do dalszych badań jako potencjalne leki przeciwwirusowe.

Dla wszystkich badań Doktorantka przeprowadziła wystarczającą ilość powtórzeń i wyznaczyła statystyczną znamienność otrzymanych wyników. Niektóre wyniki z testu IFA zostały potwierdzone za pomocą mikroskopowej wizualizacji fluorescencyjnej komórek MDCK zakażonych wirusem grypy.

Pragnę podkreślić, że oceniana praca doktorska ma wybitnie interdyscyplinarny charakter. Dotyczy zarówno chemii medycznej, biologii molekularnej w szczególności biologii RNA, jak i wirusologii oraz obliczeń teoretycznych. Dlatego zrozumiałe jest, że Doktorantka w realizacji poszczególnych zadań skorzystała z profesjonalnej pomocy kilku innych Zespołów. Głównie chodzi tu o współpracę z Zakładem Chemii Strukturalnej i Biologii Kwasów Nukleinowych IBCH PAN w zakresie syntezy oligonukleotydów RNA, współpracę z Pracownią Analiz Molekularnych (dr M. Otrocka) oraz Pracownią Wysokowydajnych Badań Przesiewowych (dr R. Pilarski) IChB PAN, a także badań bioinformatycznych przeprowadzonych we współpracy z Laboratorium Maszyn Biomolekularnych (prof. Joanna Trylska), Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Korzystnie, w zespole tym Doktorantka odbyła staż naukowy, aczkolwiek nie podano jak długi. **Byłabym zobowiązana za sprecyzowanie, w jakim zakresie przebiegały te współprace, czy dały Doktorantce możliwość samodzielnego wykonania poszczególnych badań.**

W części końcowej rozdziału Wyniki i Dyskusja oraz w Podsumowaniu rozprawy przeprowadzono krótką dyskusję na temat otrzymanych wyników, podkreślając fakt, że przeprowadzone eksperymenty

potwierdziły przeciwwirusowe właściwości ligandów wyselekcjonowanych w teście HTS, w stosunku do wirusów grypy, bo tylko ten test mógł zostać przeprowadzony na komórkach zainfekowanych wirusem. Otrzymane wyniki były zgodne z oczekiwanymi, aczkolwiek efekt biologiczny jest zależny od dostępności motywu RNA i jego rzeczywistego znaczenia w cyklu replikacji wirusa. Wykazano, że niektóre z wyselekcjonowanych aktywnych związków przeciwwirusowych są czynnymi farmakologicznie lekami.

Ta część rozprawy, prezentująca wyniki i ich dyskusję, napisana została klarownie, starannie i w sposób logiczny. Pokazano strategię wyboru podejść eksperymentalnych mokrych i obliczeniowych. Część eksperymentalna zawierająca spis zastosowanych materiałów i opisy metod została opracowana starannie i przejrzyście. Jednakże w niektórych opisach nie podano danych koniecznych np. przy próbie powtórzenia badań. **I tak np. wspomniany wcześniej brak charakterystyki otrzymanych i użytych do badań ilości RNA, brak informacji czy w teście HTS użyto bufor z jonami magnezu, jeśli tak to w jakim stężeniu, jeśli nie to dlaczego.** Jaką rolę pełnił użyty w niskim stężeniu preparat BSA (surowiczej albuminy wołowej). Inne uwagi odnośnie charakterystyki termodynamicznej RNA umieściłam we wcześniejszej części recenzji.

Wszystkie przytoczone powyżej uwagi krytyczne nie powinny być postrzegane jako elementy kwestionujące wiedzę Doktorantki i jej osiągnięcia, nie wpływają one negatywnie na merytoryczną ocenę rozprawy, a są raczej wskazówką dla młodej uczoney jak unikać niedociągnięć przy redagowaniu tekstów naukowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy nowoczesnych badań w zakresie ogólnie ujętej chemii medycznej w zakresie wirusologii, odnoszącej się do identyfikacji związków wiążących się specyficznie do konserwatywnych struktur wirusowego RNA, jako podejścia do opracowania nowych leków przeciwwirusowych. Doktorantka wykazała się wiedzą w zakresie biologii RNA, biologii molekularnej i wirusologii oraz obliczeń teoretycznych. Profesjonalnie przeprowadziła powierzone jej zadania badawcze. Wykazała się umiejętnością prowadzenia interdyscyplinarnych badań naukowych. Rozwiązała oryginalny problem naukowy, a mianowicie metodami przesiewowymi zidentyfikowała serię ligandów wiążących się do wirusowych RNA i przeanalizowała właściwości tych ligandów metodami bioinformatycznymi oraz metodami biologii molekularnej w systemie komórkowym. Uważam, że wyniki tych badań powinny jak najszybciej znaleźć się w domenie publicznej, ewentualnie po uprzednim opatentowaniu.

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.), 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.

Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Poprawność nieznana

Dokument podpisany przez Barbara Nawrot
Data: 2023.02.10 11:51:55 CET