



Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot

Poznań, dn. 25.05.2026 r.

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl
tel. (61) 829-59-31

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Nalewaj
pt. „G-quadruplex motifs in the influenza A virus RNA
genome: structural insights, ligand interaction, and
potential function”

dla Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Praca doktorska Pani mgr Marii Nalewaj została wykonana w **Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu** pod kierunkiem **prof. dr hab. Elżbiety Kierzek** oraz promotora pomocniczego **dr Marty Szabat**. Rozprawa została przygotowana w formie cyklu 3 publikacji naukowych w języku angielskim.

1. Tematyka rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy struktur drugorzędowych genomu **wirusa grypy typu A (IAV)**. IAV jest przyczyną sezonowych epidemii oraz sporadycznych pandemii, a jego zwalczanie jest utrudnione przez wysoką zmienność genetyczną. Pomimo tej zmienności, pewne motywy strukturalne wirusowego RNA (vRNA) pozostają wysoce zachowawcze i pełnią kluczowe funkcje w cyklu replikacyjnym, co czyni je obiecującymi celami dla nowych strategii terapeutycznych.

Głównym przedmiotem zainteresowania Doktorantki są **G-kwadrupleksy (G4)** – niekanoniczne struktury kwasów nukleinowych powstające w regionach bogatych w guaninę. Choć ich obecność wykazano w genomach innych wirusów, ich rola w biologii wirusa grypy nie została dotąd w pełni poznana.

Celem pracy było określenie, czy sekwencje potencjalnie tworzące G-kwadrupleksy (PQS) występują w genomie szczepu pandemicznego IAV (A/California/04/2009(H1N1)), a następnie zbadanie ich zdolności do fałdowania się w stabilne struktury G4 RNA *in vitro*.

Badania opisane w rozprawie koncentrują się na dwunastu zidentyfikowanych bioinformatycznie motywach PQS, z których trzy (oznaczone jako 1Q, 7Q i 11Q) zostały szczegółowo scharakteryzowane metodami biofizycznymi. Motywy te zlokalizowane są w regionach kodujących kluczowe białka wirusa: podjednostki polimerazy (PB1, PB2) oraz hemagglutyninę (HA). Wykorzystanie

systemów minireplikonowych pozwoliło Doktorantce wykazać, że wybrane G-kwadrupleksy mogą stanowić miejsca przyłączania dla leków przeciwwirusowych, skutecznie hamując proces namnażania się wirusa.

2. Układ pracy

Praca doktorska **mgr Marii Nalewaj** została przygotowana w postaci cyklu opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech artykułów naukowych wraz ze 70-stronicową dysertacją, w której przedstawiony jest wstęp teoretyczny do cyklu oraz ich omówienie i podsumowanie. Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani **mgr Marii Nalewaj** zostały opublikowane w latach 2021 – 2025, w międzynarodowych czasopismach recenzowanych. Były to:

- **Tomaszewska, M., Szabat, M., Zielińska, K., Kierzek, R.** Identification and structural aspects of G-quadruplex-forming sequences from the influenza A virus genome. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 6031 (artykuł eksperymentalny) - IF 4.9, 140 pkt. MNiSW,
- **Nalewaj, M., Szabat, M.** Examples of structural motifs in viral genomes and approaches for RNA structure characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 15917 (artykuł przeglądowy) - IF 4.9, 140 pkt. MNiSW,
- **Nalewaj, M., Sliwiak, J., Zielinska, K., Zmora, P., Niedzialek, D., Wieczorek, G., Kierzek, E., Szabat, M.** The interaction of RNA G-quadruplexes from the influenza A virus vRNA with TMPyP4 and BRACO-19 ligands. *PLoS One*, 2025, 20(11): e0335975 (artykuł eksperymentalny) – IF 2.6, 100 pkt. MNiSW.

70-stronicowa dysertacja stanowi wstęp teoretyczny do tego cyklu prac. Nie ma ona typowego układu dysertacji, gdyż zamiast rozdziałów z wynikami i dyskusją, zawiera skrócony opis publikacji wchodzących w skład rozprawy (rozdział pt. *Brief description of the publications included in the doctoral dissertation*, składający się z 11 stron). Ponadto praca zawiera rozdział omawiający cel publikacji wchodzących w skład pracy (*The aim of the presented publications*, 1 strona), rozbudowany wstęp teoretyczny (*Introduction*, 34 strony), listę publikacji wchodzących w skład rozprawy (*List of publications included in the doctoral dissertation*, 1 strona), streszczenia w j. angielskim (*Abstract*, 2 strony) i polskim (2 strony), podsumowanie pracy (*Summary*, 2 strony), listę zastosowanych skrótów (*List of abbreviations*, 2 strony) oraz listę bibliografii (*References*, 11 stron). Dodatkowo rozprawa zawiera suplement (*Appendix*) z dwoma załącznikami: **Appendix 1** zawiera reprinty wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy wraz z materiałami dodatkowymi, a **Appendix 2** zawiera oświadczenia dotyczące wkładu Doktorantki w te prace. **Całość dysertacji liczy 153 strony**, zilustrowanej 7 rysunkami oraz 2 tabelami. Zastanawia umieszczenie listy skrótów pomiędzy dysertacją a suplementem (str. 58) z reprintami prac. Byłoby wyraźnie lepiej, gdyby ta lista była umieszczona na początku dysertacji, zaraz po abstraktach.

3. Wiedza teoretyczna

Rozdział Wstęp (**Introduction**) w dysertacji mgr Marii Nalewaj obejmuje strony 11–44 i stanowi kompleksowe wprowadzenie teoretyczne w tematykę pracy, łączące wiedzę z zakresu wirusologii, biologii strukturalnej RNA oraz chemii bioorganicznej. W pierwszym podrozdziale

Autorka opisuje biologię wirusa IAV, szczegółowo omawiając organizację jego segmentowanego genomu RNA (8 segmentów vRNA) oraz cykl życiowy, ze szczególnym uwzględnieniem etapów replikacji i transkrypcji zachodzących w jądrze komórkowym. Podkreśla rolę struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych vRNA w regulacji kluczowych procesów wirusowych, takich jak pakowanie genomu czy unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Kolejny podrozdział zawiera szczegółową charakterystykę G-kwadrupleksów jako niekanonicznych struktur kwasów nukleinowych powstających w regionach bogatych w guaninę (PQS). Autorka omawia ich polimorfizm strukturalny (topologie równoległe, antyrównoległe i hybrydowe), czynniki wpływające na ich stabilność (np. kationy metali, pH) oraz ich funkcje biologiczne w komórkach i genomach innych wirusów. W trzecim podrozdziale Doktorantka przedstawia przegląd narzędzi bioinformatycznych służących do identyfikacji PQS w genomach oraz szeroki wachlarz technik biofizycznych i biologicznych wykorzystywanych do ich charakterystyki. Ostatnia część wstępu skupia się na małowiązących związkach zdolnych do oddziaływania ze strukturami G4. Autorka szczegółowo opisuje właściwości pięciu ligandów użytych w pracy: BRACO-19, TMPyP4, TMPyP2, NMM oraz Tioflawiny T, omawiając ich mechanizmy wiązania oraz potencjał jako innowacyjnych leków przeciwwirusowych.

Do tego rozdziału mam kilka drobnych uwag/pytań:

1. W podrozdziale 1.1. opisywana jest organizacja genomu wirusa grypy typu A. Ryc. 1 przedstawia strukturę wirionu, jednak na kolejnych stronach brakuje poglądowego rysunku pokazującego organizację genomu RNA wirusa IAV w postaci ośmiu segmentów.
2. Str. 21, Fig.3 - na rysunku brakuje objaśnień, dopiero w publikacji *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15917, Fig. 3 znajduje się podobny rysunek, na którym są oznaczone reszty guanozyny jako "G"; Ponadto brak jest oznaczenia źródła rysunku – czy jest to rysunek autorski?
3. Str. 38, Fig. 6 - brak oznaczenia źródła obrazka, czy jest to rysunek autorski?
4. Str. 50 – „For instance, the MD method was used to study the non-structural protein of SARS-CoV-2.” - czy wiadomo o które dokładnie białko niestrukturalne wirusa chodzi?

4. Samodzielność badawcza

Pani mgr Maria Nalewaj wykazała się biegłością w stosowaniu szerokiego wachlarza **interdyscyplinarnych technik badawczych**, obejmujących identyfikację motywów PQS w genomie IAV przy użyciu narzędzi takich jak QGRS Mapper i G4RNA Screener, wykorzystanie metod biofizycznych - spektroskopii NMR, dichroizmu kołowego (CD), czy kalorymetrii ITC, a także metod biologii molekularnej i komórkowej, jak test zatrzymywania odwrotnej transkrypcji (RT stop assay) oraz badań funkcjonalnych w systemach minireplikonowych IAV w hodowlach komórek HEK 293T.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie (od dwóch do ośmiu współautorów). **We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem**, co wskazuje na Jej wiodącą rolę w opisanych badaniach. Niemniej jednak w obydwu pracach opublikowanych w *IJMS* wskazany jest taki sam udział Doktorantki, jak i drugiej współautorki Pani dr M. Szabat. Do rozprawy w załączniku 2 (**Appendix 2**) dołączono oświadczenia Doktorantki i autorów korespondencyjnych publikacji tworzących rozprawę, dr M. Szabat i prof. dr hab. Ryszarda Kierzka, w których szczegółowo wyjaśniono, na czym polegał udział Pani mgr Marii Nalewaj w danej pracy. Załączone oświadczenia wskazują wiodący udział Doktorantki we wszystkich pracach składających się

na rozprawę doktorską, poczynając od projektowania i wykonania większości prac laboratoryjnych, analizy i interpretacji wyników, przygotowania rysunków i spisania manuskryptów. W pracy przeglądowej udział Doktorantki również polegał na wyszukaniu artykułów źródłowych, przygotowania rysunków, oraz napisania i edycji manuskryptu.

5. Oryginalność rozprawy

Głównym celem pracy było wykazanie obecności motywów potencjalnie tworzących G-kwadrupleksy (PQS), zbadanie ich zdolności do fałdowania się w stabilne struktury RNA G4 *in vitro* oraz ocena ich wpływu na replikację wirusa jako innowacyjnych celów terapeutycznych. Autorka przedstawiła wyniki w trzech oryginalnych publikacjach, które zostały już pozytywnie zrecenzowane i opublikowane, dlatego nie ma potrzeby dogłębnej ich analizy przez Recenzenta. W pierwszej pracy eksperymentalnej (Tomaszewska i in., 2021) Autorka dokonała identyfikacji dwunastu zachowawczych motywów PQS w genomie szczepu pandemicznego IAV, z których trzy zostały jednoznacznie potwierdzone jako stabilne struktury RNA G4 *in vitro* przy użyciu interdyscyplinarnych metod biofizycznych. Druga praca eksperymentalna dotyczyła specyficznego oddziaływania ligandów TMPyP4 i BRACO-19 z G-kwadrupleksami RNA wirusa grypy A. Autorka udowodniła, że ligandy te różnią się mechanizmami wiązania i skutecznie zatrzymują proces replikacji wirusa *in vitro*, co sugeruje, że wybrane G-kwadrupleksy RNA mogą być potencjalnymi celami dla leków przeciwwirusowych. Obie prace eksperymentalne podbudowane są pracą przeglądową (Nalewaj i Szabat, 2022), która integruje wiedzę o motywach strukturalnych wirusów RNA (ze szczególnym uwzględnieniem IAV i SARS-CoV-2), wskazując na kluczową zależność między architekturą genomu a jego funkcjami biologicznymi, co stanowi podstawę dla projektowania leków przeciwwirusowych.

Podsumowując, publikacje Pani mgr Nalewaj dostarczają unikalnych dowodów na to, że **motywy G-kwadrupleksowe w genomie IAV są obiecującymi celami dla nowych strategii przeciwwirusowych**, co stanowi istotny wkład w rozwój genomiki strukturalnej RNA.

W rozdziale „References” na 11 stronach Autorka wykazała 183 pozycje literatury, przedstawiające najważniejszą literaturę przedmiotu, w większości z ostatnich kilkunastu lat, co świadczy o świetnym rozeznaniu Autorki w opisywanej tematyce.

6. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony

W tym miejscu zebrałem pewne kwestie merytoryczne / pytania, o których wyjaśnienie chciałbym prosić:

1. Na str. 27 rozprawy Autorka wspomina, iż grupa badawcza prof. V. Brazdy z Brna w Czechach wykonała podobne badania.: “*Such research was conducted by the Brazda group, which performed studies similar to ours and investigated all newly sequenced variations of the H1N1 influenza virus to find PQS motifs.*”

W dalszej części tekstu pada uszczegółowienie: „*Similarly, Brazda et al. analyzed the IAV genome in vitro to identify such structures. The studies of both groups, ours and Brazda's, have shown that RNA G4 structures can form within IAV genomes, and they are often present within regions important for viral replication.*”

Oczywiście jest to naturalne, że nad podobnymi zagadnieniami pracują różne grupy naukowców. Chciałbym jednak prosić o omówienie czym dokładnie różniły się te badania, Doktorantki oraz grupy prof. V. Brazdy? Jak wyglądała kwestia pierwszeństwa publikacji tych wyników?

2. Chciałbym zapytać, dlaczego do eksperymentów z minireplikonami użyto jedynie ligandów TMPyP4 i TMPyP2, natomiast nie wykorzystano w badaniach ligandu BRACO-19?
3. Na str. 56 Autorka umieściła rozdział pt. „*Summary*”, stanowiący podsumowanie pracy doktorskiej. Jednak podsumowanie to, jeśli chodzi o treść i długość, jest bardzo podobne do abstraktu na początku pracy i wydaje się być w tym miejscu niepotrzebne. Być może rozdział pt. „*Results summary*” etc., byłby lepszym rozwiązaniem.

Dysertacja doktorska Pani mgr Marii Nalewaj napisana jest prawidłowo, poprawną angielszczyzną i dobrze się ją czyta, praca zawiera dopracowane rysunki i przejrzyste tabele. Dostrzegłem tylko kilka drobnych błędów – stylistycznych, literowych czy interpunkcyjnych, których jest bardzo niewiele. Dla porządku wymienię niektóre z nich:

- Str. 8-9 - W polskim streszczeniu obecne są różne style pisania - bezosobowy i personalny: „Celem pierwszego etapu **moich** badań było określenie...”, „**zaobserwowano różnice** we właściwościach...”, „Ponadto **przeprowadziliśmy**...”,
- Autorka używa często formy pierwszej liczby pojedynczej i w większości przypadków jest to w porządku, jednak w kilku przypadkach jest to niepotrzebne, np. str. 31, Nagłówek Tabeli 1 „*Summary of methods applied in **my** doctoral research...*”,
- Str. 32 – “**I** selected several commonly used techniques, and **I** described them in the following paragraphs.”, powinno być: “I selected several commonly used techniques, and described them in the following paragraphs”.
- Str. 34 – “...to study the interactions of G4 with ligands ^{132–134}.” - kropka kończąca zdanie i liczba oznaczająca referencję znalazły się w kolejnej linii.

7. Ocena końcowa z uzasadnieniem

Przedstawione powyżej krytyczne uwagi nie wpływają na bardzo wysoką końcową ocenę pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Marii Nalewaj stanowi świetne opracowanie naukowe, które wnosi istotny i oryginalny wkład w rozwój genomiki strukturalnej wirusów RNA oraz wirusologii molekularnej. Przedstawione wyniki badań świadczą o wysokiej biegłości Doktorantki w planowaniu złożonych doświadczeń oraz Jej umiejętności krytycznej analizy i interpretacji interdyscyplinarnych danych.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Pani mgr Maria Nalewaj z powodzeniem zastosowała szeroki wachlarz zaawansowanych technik badawczych, obejmujący metody bioinformatyczne, biofizyczne (spektroskopia NMR, CD, ITC, fluorescencja, topnienie UV) oraz zaawansowane testy biologiczne w układach komórkowych (systemy minireplikonowe). Umiejętność sprawnego poruszania się w tak odmiennych metodologiach dowodzi dojrzałości naukowej i samodzielności badawczej Kandydatki.

Ważnym osiągnięciem pracy jest kompleksowa identyfikacja i charakterystyka zachowawczych motywów G-kwadruplexowych w genomie pandemicznego szczepu wirusa grypy A (A/California/04/2009(H1N1)). Ponadto, Doktorantka wykazała po raz pierwszy specyficzny charakter oddziaływań pomiędzy wirusowymi strukturami G4 a ligandami TMPyP4 i BRACO-19. Szczególnie ważnym wynikiem jest potwierdzenie w układzie komórkowym, że stabilizacja motywów G4 przez ligandy skutecznie hamuje aktywność kompleksu polimerazy wirusowej, co otwiera nowe perspektywy w projektowaniu innowacyjnych leków przeciwwirusowych o nowym mechanizmie działania. **Dlatego biorąc pod uwagę wartość poznawczą przedstawionych wyników i duży potencjał aplikacyjny uważam, iż praca doktorska mgr Marii Nalewaj zasługuje na wyróżnienie.**

Oświadczam, 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 Marii Nalewaj do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**



Signed by /
Podpisano przez:

Robert Nawrot

Date / Data:
2026-05-25
22:35