



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

dr hab. inż. Tomasz Laskowski, prof. PG

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

Gdańsk, 18.05.2026 r.

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marii Nalewaj pt. “*G-quadruplex motifs in the influenza A virus RNA genome: structural insights, ligand interaction, and potential function*” została wykonana w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Elżbieta Kierzek, natomiast funkcję promotora pomocniczego pełni dr Marta Szabat.

Rozprawa została przygotowana w języku angielskim i ma formę cyklu trzech publikacji naukowych, w których mgr Maria Nalewaj jest pierwszą autorką. Dwie prace mają charakter oryginalnych publikacji badawczych, natomiast jedna jest publikacją przeglądową. Wykaz publikacji obejmuje dwie prace opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* oraz jedną pracę opublikowaną w *PLoS One*. Obydwa czasopisma mają stosunkowo wysoki IF oraz odpowiednio wysoką punktację na liście ministerialnej czasopism naukowych.

Znaczenie rozprawy

Tematyka rozprawy mieści się na pograniczu biologii molekularnej RNA, chemii bioorganicznej, biologii strukturalnej oraz badań nad potencjalnymi strategiami przeciwwirusowymi. Głównym przedmiotem pracy są sekwencje potencjalnie zdolne do tworzenia G-kwadrupleksów RNA w genomie wirusa grypy typu A, ich konserwatywność, zdolność do fałdowania w stabilne struktury G4, oddziaływanie z ligandami specyficznymi względem G-kwadrupleksów oraz możliwe znaczenie tych struktur w cyklu replikacyjnym wirusa.

Podjęta tematyka jest aktualna i naukowo istotna. Wirus grypy typu A pozostaje ważnym obiektem badań ze względu na dużą zmienność genetyczną, znaczenie epidemiologiczne oraz potencjał pandemiczny. Jednocześnie coraz większe zainteresowanie budzą konserwowane struktury drugorzędowe wirusowego RNA, które mogą pełnić funkcje regulacyjne i stanowić

potencjalne cele dla nowych strategii terapeutycznych. W tym kontekście wybór G-kwadrupleksów RNA jako przedmiotu badań należy uznać za dobrze uzasadniony.

Zasadniczym celem rozprawy było ustalenie, czy w genomie RNA wirusa grypy typu A, szczepu A/California/04/2009(H1N1), występują sekwencje potencjalnie tworzące G-kwadrupleksy, czy wybrane motywy rzeczywiście fałdują się w struktury RNA G4 in vitro oraz czy mogą oddziaływać z ligandami specyficznymi względem G-kwadrupleksów, w szczególności TMPyP4 i BRACO-19. Zakres badań obejmował analizę bioinformatyczną, charakterystykę biofizyczną, badania oddziaływań ligand-RNA, modelowanie molekularne oraz doświadczenia biologiczne z wykorzystaniem systemu minireplikonu.

Ocena układu rozprawy i wstępu teoretycznego

Układ rozprawy jest klasyczny i przejrzysty dla dysertacji przygotowanych w formie cyklu publikacji. Praca zawiera wykaz publikacji, streszczenia, cele badań, wstęp teoretyczny, opis publikacji wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie, wykaz skrótów, bibliografię oraz załączniki obejmujące publikacje i oświadczenia o wkładzie Kandydatki. Taki układ oceniam jako logiczny, kompletny i zgodny z przyjętymi standardami przygotowywania rozpraw doktorskich opartych na cyklu artykułów naukowych.

Wstęp teoretyczny jest obszerny, dobrze uporządkowany i obejmuje najważniejsze zagadnienia potrzebne do zrozumienia przedstawionych badań. Autorka omawia znaczenie struktury RNA, podstawy biologii wirusa grypy typu A, charakterystykę G-kwadrupleksów, metody ich badania oraz najważniejsze ligandy specyficzne względem struktur G4. Szczególnie wartościowe jest to, że wstęp nie ogranicza się do prostego przeglądu literatury, ale dobrze uzasadnia przejście od ogólnego znaczenia struktur RNA do konkretnego problemu badawczego, jakim są motywy G4 w genomie wirusa grypy typu A.

Za bardzo wartościową uważam część dotyczącą struktur G-kwadrupleksowych oraz metod ich badania. Autorka poprawnie omawia budowę tetrad guaninowych, rolę kationów, polimorfizm topologiczny, różnice między G-kwadrupleksami DNA i RNA oraz funkcje biologiczne tych struktur. Trafnie przedstawia również narzędzia bioinformatyczne i eksperymentalne stosowane do identyfikacji oraz walidacji G4, w tym spektroskopię NMR, topnienie UV, dichroizm kołowy, fluorescencję, PAGE, test zatrzymania odwrotnej transkrypcji oraz ITC. Dobór tych zagadnień jest w pełni uzasadniony, ponieważ odpowiada metodologii wykorzystanej w publikacjach wchodzących w skład rozprawy.

Pod względem językowym i edytorskim wstęp teoretyczny oceniam bardzo wysoko. Nie stwierdziłem w tej części rozprawy istotnych uchybień terminologicznych, gramatycznych ani redakcyjnych. Tekst jest napisany poprawnym, komunikatywnym językiem naukowym i wskazuje na bardzo dobrą orientację Autorki w literaturze przedmiotu. Co ciekawe, nie znalazłem

w tej części ani jednej literówki, nie zauważyłem również żadnych uchybień terminologicznych ni gramatycznych.

Ocena publikacji wchodzących w skład rozprawy

Publikacje wchodzące w skład rozprawy tworzą spójny i logicznie uporządkowany cykl badawczy. Pierwsza praca dotyczy identyfikacji i charakterystyki potencjalnych motywów G4 w genomie wirusa grypy typu A, druga osadza problematykę w szerszym kontekście biologii strukturalnej wirusowego RNA, natomiast trzecia rozwija temat w kierunku oddziaływań RNA G4 z ligandami oraz potencjalnego znaczenia funkcjonalnego tych struktur. Wszystkie trzy publikacje są tematycznie powiązane z głównym celem rozprawy.

Pierwsza publikacja, „*Identification and structural aspects of G-quadruplex-forming sequences from the influenza A virus genome*”, dotyczyła bioinformatycznej identyfikacji potencjalnych sekwencji tworzących G-kwadrupleksy w genomie szczepu A/California/04/2009(H1N1). W pracy wskazano dwanaście motywów PQS zlokalizowanych w regionach kodujących różnych segmentów RNA wirusa, oceniono ich konserwatywność oraz zweryfikowano zdolność do tworzenia struktur G4 z użyciem komplementarnych metod biofizycznych. Najważniejszym wynikiem było wykazanie, że trzy motywy — 1KW, 7KW i 11KW — mogą tworzyć struktury RNA G4 in vitro.

Druga publikacja, „*Examples of structural motifs in viral genomes and approaches for RNA structure characterization*”, ma charakter przeglądowy. Jej rola w cyklu jest dobrze uzasadniona, ponieważ porządkuje aktualny stan wiedzy dotyczący motywów strukturalnych obecnych w genomach wirusowych oraz metod ich przewidywania i walidacji eksperymentalnej. Praca ta pokazuje, że badanie konserwowanych struktur RNA w genomach wirusowych jest częścią szerszego i dynamicznie rozwijającego się obszaru biologii strukturalnej RNA.

Trzecia publikacja, „*The interaction of RNA G-quadruplexes from the influenza A virus vRNA with TMPyP4 and BRACO-19 ligands*”, stanowi naturalną kontynuację pierwszej pracy badawczej. Autorka i współpracownicy zbadali oddziaływania trzech wcześniej wytypowanych struktur RNA G4, oznaczonych jako 1Q, 7Q i 11Q (to są te same sekwencje, co 1KW, 7KW oraz 11KW, funkcjonujące w tej publikacji pod zmienioną nazwą), z ligandami TMPyP4 i BRACO-19. W pracy zastosowano szeroki zestaw metod, obejmujący m.in. test zatrzymania odwrotnej transkrypcji, ITC, topnienie UV, CD, spektroskopię fluorescencyjną, modelowanie molekularne oraz system minireplikonu.

Za szczególnie wartościowe w trzeciej publikacji uważam połączenie charakterystyki biofizycznej z próbą oceny znaczenia biologicznego badanych motywów. Wyniki wskazały, że TMPyP4 i BRACO-19 oddziałują z analizowanymi strukturami RNA G4 w odmienny sposób, przy czym TMPyP4 wykazywał silniejsze oddziaływanie z badanymi RNA G-kwadrupleksami. Interesujący jest również wynik uzyskany w systemie minireplikonu: zahamowanie aktywności

polimerazy wirusowej obserwowano dla układu A/California/04/2009, natomiast efekt ten był minimalny lub nieobecny dla szczepu A/Puerto Rico/8/34. Wynik ten sugeruje możliwą zależność aktywności ligandów od sekwencji genomu wirusa i składu nukleotydowego analizowanych regionów bogatych w guaninę.

W mojej ocenie publikacje wchodzące w skład rozprawy tworzą przemyślany cykl, prowadzący od pytania podstawowego: czy *motywy G4 występują w genomie wirusa grypy typu A i czy fałdują się in vitro?*, do pytania bardziej aplikacyjnego, czyli: czy *mogą one stanowić cel oddziaływania małowcząsteczkowych ligandów przeciwwirusowych?*

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy

Za jedno z najważniejszych osiągnięć rozprawy uważam bioinformatyczną identyfikację dwunastu potencjalnych sekwencji G-kwadrupleksowych w genomie wirusa grypy typu A oraz ocenę ich konserwatywności wśród różnych szczepów wirusa. Szczególnie istotne jest to, że Autorka nie poprzestała na samym przewidywaniu bioinformatycznym, lecz poddała wytypowane sekwencje weryfikacji eksperymentalnej z wykorzystaniem zestawu komplementarnych technik biofizycznych. Pozwoliło to wyselekcjonować motywy rzeczywiście zdolne do tworzenia struktur RNA G4 in vitro.

Za szczególnie cenne uważam zestawienie wyników uzyskanych różnymi technikami, przedstawione w pierwszej publikacji. Pokazuje ono, że w badaniach struktur G-kwadrupleksowych pojedyncza metoda często nie wystarcza do sformułowania jednoznacznych wniosków. Dopiero połączenie metod o różnej czułości, swoistości i zakresie informacyjnym pozwala uzyskać wiarygodny obraz badanego układu. Pozytywnie oceniam również ostrożność Autorki w interpretacji wyników oraz uwzględnianie możliwości tworzenia przez analizowane sekwencje różnych form strukturalnych.

Drugim ważnym osiągnięciem cyklu jest publikacja przeglądowa, która zbiera i porządkuje wiedzę dotyczącą motywów strukturalnych RNA obecnych w genomach wirusowych. W mojej ocenie praca ta może stanowić wartościowy punkt wyjścia dla badaczy zainteresowanych poszukiwaniem nowych celów molekularnych w genomach wirusowych, zwłaszcza takich, których znaczenie wynika nie tylko z sekwencji, lecz także z lokalnej struktury RNA.

Trzecim istotnym osiągnięciem rozprawy jest zbadanie oddziaływań wybranych motywów G-kwadrupleksowych z ligandami małowcząsteczkowymi. Należy przy tym zachować ostrożność w określaniu TMPyP4 i BRACO-19 jako związków ściśle selektywnych względem G-kwadrupleksów, ponieważ część ligandów tego typu może wykazywać powinowactwo również do innych struktur kwasów nukleinowych. Nie zmienia to jednak faktu, że są to użyteczne narzędzia do oceny możliwości chemicznej modulacji badanych struktur. Wyniki przedstawione w rozprawie wskazują, że analizowane RNA G-kwadrupleksy mogą oddziaływać z ligandami w sposób zależny od struktury RNA i rodzaju związku.

Szczególnie interesujący jest aspekt funkcjonalny tych badań. Wyniki doświadczeń z wykorzystaniem systemu minireplikonu sugerują, że oddziaływanie ligandów z motywami G4 obecnymi w wirusowym RNA może wpływać na aktywność kompleksu replikacyjnego wirusa, przy czym efekt ten zależy od analizowanego szczepu. Na obecnym etapie należy traktować ten kierunek jako wymagający dalszych badań, jednak przedstawione wyniki przekonująco pokazują jego zasadność i otwierają interesującą perspektywę poszukiwania leków oddziałujących nie bezpośrednio z białkami wirusowymi, lecz z konserwowanymi elementami strukturalnymi wirusowego RNA.

Podsumowując, za najważniejszą wartość naukową rozprawy uważam konsekwentne połączenie analizy bioinformatycznej, walidacji strukturalnej, badań oddziaływań ligand–RNA oraz wstępnej oceny znaczenia biologicznego wybranych motywów G4.

Uwagi i pytania do Doktorantki

Przedstawiona rozprawa doktorska zasługuje na wysoką ocenę zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym. Poniższe uwagi mają charakter doprecyzowujący i dyskusyjny; nie wpływają one na moją jednoznacznie pozytywną ocenę pracy.

- 1) Pierwsza uwaga dotyczy sposobu przedstawienia indywidualnego wkładu Doktorantki w publikacje wchodzące w skład rozprawy. Załączone oświadczenia wskazują, że mgr Maria Nalewaj odegrała kluczową rolę w powstaniu przedstawionego cyklu publikacji, co potwierdza również fakt, że we wszystkich trzech pracach jest pierwszą Autorką. Jednocześnie opisy wkładu, sformułowane w kategoriach typowych dla sekcji *Author Contributions* w publikacjach naukowych, są w kontekście rozprawy doktorskiej dość ogólne. Proszę zatem Doktorantkę o bardziej szczegółowe omówienie jej własnego udziału w pierwszej oraz trzeciej publikacji badawczej, zwłaszcza o jednoznaczne określenie, przy których eksperymentach – czy to biofizycznych, biologicznych czy obliczeniowych – „maczała palce” (czy też końcówki pipet).
- 2) Druga uwaga ma charakter wyłącznie dyskusyjny i dotyczy pomiarów NMR przedstawionych w pierwszej publikacji. Z tekstu rozprawy wynika, że pomiary te nie były wykonywane przez Doktorantkę, dlatego nie traktuję tej kwestii jako zastrzeżenia kierowanego bezpośrednio do Autorki. Chciałbym jednak zauważyć, że eksperymenty protonowe ukierunkowane na obserwację rezonansów protonów iminowych zostały przedstawione dla temperatury 25°C. W przypadku kwasów nukleinowych temperatura rejestracji widma NMR może istotnie wpływać na ostrość sygnałów, równowagę konformacyjną oraz interpretację obecności lub braku struktur uporządkowanych. Szkoda więc, że w publikacji nie przedstawiono albo przynajmniej nie omówiono ewentualnych pomiarów wykonanych w różnych temperaturach. Podkreślam jednak, że uwaga ta nie stanowi zarzutu wobec Doktorantki, lecz jest komentarzem metodologicznym – do tego punktu Autorka zasadniczo w ogóle nie musi się odnosić.

- 3) Trzecie pytanie dotyczy sekwencji 9KW. Wyniki przedstawione w pierwszej publikacji sugerują, że jej interpretacja strukturalna nie jest jednoznaczna. Część danych może wskazywać na obecność elementów charakterystycznych dla G-kwadrupleksu lub struktury hybrydowej, podczas gdy inne obserwacje nie wspierają jednoznacznie tworzenia stabilnego G4. Zwróciłem również uwagę, że dla części sekwencji zaklasyfikowanych jako nietworzące G-kwadrupleksów zaproponowano struktury alternatywne w materiałach uzupełniających do pierwszej publikacji, natomiast w przypadku 9KW takiej propozycji nie znalazłem. Chciałbym zatem zapytać Doktorantkę, czy ma przypuszczenia, czym strukturalnie może być forma tworzona przez 9KW, a jeżeli nie – jakie dodatkowe eksperymenty mogłyby pomóc w rozwiązaniu tej diabolicznie zagmatwanej intrygi strukturalnej.
- 4) Czwarta uwaga dotyczy interpretacji wyników ITC przedstawionych w trzeciej publikacji. Chciałbym doprecyzować, czy podawana stechiometria wiązania ligandów TMPyP4 i BRACO-19 odnosi się do molowej ilości pojedynczej nici RNA obecnej w próbce, czy do jednostki strukturalnej tworzonej przez potencjalnie dwie lub więcej nici RNA. Jest to istotne, ponieważ w przypadku struktur wielocząsteczkowych przeliczenie stechiometrii względem pojedynczej nici lub względem całego uformowanego G-kwadrupleksu może prowadzić do odmiennej interpretacji liczby miejsc wiązania liganda.
- 5) Piąta uwaga dotyczy modelowania molekularnego. W trzeciej publikacji podano informację o wykorzystaniu pakietu GROMACS, procedurze równoważenia oraz czasie symulacji, ale zabrakło mi kilku szczegółów technicznych istotnych dla oceny wiarygodności symulacji kwasów nukleinowych, zwłaszcza zastosowanego pola siłowego, termostatu, barostatu oraz temperatury symulacji. Interesuje mnie również wybór 150 mM NaCl jako środowiska symulacji. Samo stężenie jonów jest zrozumiałe, natomiast w przypadku G-kwadrupleksów szczególne znaczenie mają kationy potasu koordynowane między G-tetradami. W związku z powyższym, wybór KCl wydawałby się bardziej naturalny, zwłaszcza jeżeli jony K^+ obecne między tetradami nie były utrzymywane dodatkowymi więzami strukturalnymi w trakcie symulacji właściwej (a przynajmniej nie ma o takowych więzach wzmianki w sekcji 2.7. publikacji trzeciej). Chciałbym zatem zapytać Doktorantkę o szczegóły parametrów zastosowanych w modelowaniu oraz o uzasadnienie wyboru środowiska jonowego.
- 6) Szóste pytanie dotyczy możliwości uzyskania wysokorozdzielczych danych strukturalnych dla kompleksów badanych RNA G4 z ligandami. W trzeciej publikacji wykazano, że sekwencje 1Q, 7Q i 11Q oddziałują z TMPyP4 oraz BRACO-19, a modelowanie molekularne 1Q miało pomóc w wyjaśnieniu obserwacji eksperymentalnych oraz trudności związanych z uzyskaniem danych strukturalnych o wysokiej rozdzielczości. Chciałbym zatem zapytać: czy podejmowano próby badań NMR lub krystalograficznych kompleksów RNA G4 z analizowanymi ligandami? Jeżeli tak, interesujące byłoby krótkie omówienie napotkanych problemów eksperymentalnych, takich jak heterogeniczność konformacyjna, agregacja, wymiana ligandów, niewystarczająca stabilność kompleksów lub trudności z uzyskaniem jednorodnej próbki.

Podsumowując, moje pytania dotyczą przede wszystkim doprecyzowania wkładu Doktorantki w prace badawcze oraz kilku aspektów interpretacyjnych i metodologicznych, które naturalnie pojawiają się w tak złożonym, interdyscyplinarnym projekcie. Nie zmieniają one mojej pozytywnej oceny rozprawy, lecz stanowią zaproszenie do dyskusji nad ograniczeniami zastosowanych metod, interpretacją struktur niejednoznacznych oraz możliwymi kierunkami dalszych badań.

Podsumowanie

Reasumując, przedłożoną do recenzji pracę doktorską oceniam jednoznacznie pozytywnie i pragnę podkreślić jej istotny wkład w rozwój badań nad funkcjonalnością genomów wirusowych, w tym przypadku — genomu wirusa grypy typu A. W związku z powyższym, uroczystie 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 Marii Nalewaj do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, mając na względzie rzetelność zaprezentowanych prac, ich znakomity opis oraz wiodący wkład autorki w powstanie spójnego cyklu publikacji o doniosłym znaczeniu naukowym, wnioskuję również do ww. Komisji o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marii Nalewaj.**

dr hab. inż. Tomasz Laskowski, prof. PG

