



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD GENETYKI I FIZJOLOGII KOMÓRKI
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 41 26 | +48 71 375 41 28
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Wrocław, 22.05.2025

dr hab. Donata Wawrzycka prof. UWr
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Grabińskiego zatytułowanej „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Wojciecha Grabińskiego została wykonana pod kierunkiem dr hab. Andonisa Karachitosa w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Trwająca od 2019r pandemia Covid19 (ang. Coronavirus disease 2019) wywołana przez należący do grupy beta-koronawirusów wirus SARS-CoV-2 stanowi ogromny problem nie tylko zdrowotny i epidemiologiczny, ale również gospodarczy. Światowa organizacja zdrowia WHO podaje, że w konsekwencji infekcji SARS-CoV-2 na świecie zmarło już ponad 7 mln ludzi (<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>). Pacjenci z tzw. long Covid odczuwają problemy zdrowotne nawet rok po infekcji. Opracowanie leku antywirusowego przeciw SARS-CoV-2, ale również innym koronawirusom (np. MERS, SARS), ograniczającego śmiertelność i eliminującego/łagodzącego objawy jest światowym wyzwaniem. W celu zaprojektowania efektywnych terapii niezbędne są szczegółowe badania molekularne, których celem jest zrozumienie patogenezы SARS-CoV-2, w tym roli poszczególnych białek wirusowych. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w tę istotną i aktualną tematykę badawczą, stanowi bowiem próbę wykorzystania systemu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do ekspresji genów wirusowych i identyfikacji potencjalnych inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2 (M^{pro}). Białko M^{pro} to funkcjonująca w formie homodimeru proteaza o strukturze silnie konserwowanej wśród ludzkich koronawirusów, a różnej od znanych ludzkich proteaz. Cecha ta jest wykorzystywana przy projektowaniu skutecznych leków przeciwwirusowych z jednoczesnym zachowaniem bezpieczeństwa dla człowieka.

Praca doktorska mgra Wojciecha Grabińskiego to praca pisemna, która została opracowana i przedłożona mi do recenzji jako rozprawa doktorska. Rozprawa ma charakter pracy pisemnej mieszanej tj. zawiera część stanowiącą opracowanie w j. polskim oraz wyniki badań eksperymentalnych w postaci załączonych manuskryptów w j. angielskim. Opracowanie składa się z 35 stron i zawiera: życiorys, dane o aktywności naukowej i osiągnięciach, streszczenia w języku polskim i angielskim, opis wyników rozprawy doktorskiej, informacje o finansowaniu. W rozprawie doktorskiej zawarto 3 powiązane tematycznie manuskrypty/publikacje, we wszystkich mgr Wojciech Grabiński jest pierwszym autorem. Jedną z prac to artykuł przeglądowy opublikowany w 2024r w czasopiśmie *International Journal of Molecular Science* (<https://doi.org/10.3390/ijms252312661>; *IJMS.*, 25(23), 12661. oznaczony jako Publikacja 3). Ponadto do rozprawy doktorskiej załączono materiały w formie przygotowanych manuskryptów.

Są to odpowiednio: (1) manuskrypt zdeponowany w bazie bioRxiv, stanowiący ogólnie dostępny tzw. preprint (doi.org/10.1101/2023.09.03.5555867; wersja z 26 sierpnia 2024r; oznaczony jako Publikacja 1), (2) manuskrypt przygotowany z zachowaniem wymogów stawianych publikacji naukowej, nieopublikowany, opatrzone przez autora komentarzem: „praca zostanie złożona do czasopisma Scientific Reports” (oznaczony jako Publikacja 2). W przypadku wszystkich prac dołączono oświadczenia współautorów o ich udziale w tworzeniu publikacji/manuskryptu. Badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej były finansowane w ramach subwencji badawczej Zakładu Bioenergetyki UAM i w ramach projektu nr 6/2020 finansowanego przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, którego kierownikiem był dr hab. Andonis Karachitos. Badania naukowe Doktoranta finansowane były również w ramach projektów NCN OPUS11 (2016/21/B/NZ4/00131, kierownik: dr hab. Hanna Kmita) i SONATA13 (2017/26/D/NZ1/00075; kierownik dr hab. Andonis Karachitos).

Główną część rozprawy doktorskiej stanowi „Opis wyników rozprawy doktorskiej” podzielony na podrozdziały: cel pracy, wstęp, główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej, podsumowanie, bibliografia.

Cele pracy zostały jasno określone i w pełni odpowiadają tematowi rozprawy.

W tematykę projektu rozprawy doktorskiej wprowadza *Wstęp*, w którym Doktorant pokrótce opisał strukturę genomu SARS-CoV-2 i kluczową rolę białka 3-chymotrypsynopodobnej proteazy (M^{pro}) w cyklu replikacyjnym wirusa SARS-CoV-2. Uzasadniono, dlaczego proteaza M^{pro} stanowi atrakcyjny cel w terapii Covid 19. W tym rozdziale scharakteryzowano również drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako dogodny model badawczy do badania potencjalnych leków i do heterologicznej ekspresji, w tym ekspresji genów wirusowych. Całość przedstawiono w sposób bardzo okrojony. Choć jest to tylko opracowanie do zestawu załączonych prac i wiele dodatkowych informacji wprowadzających znajduje się w odpowiednich załączonych manuskryptach, brakuje informacji o strukturze i mechanizmach toksyczności M^{pro} , opisanych już mutacjach wpływających na aktywność białka, stosowanych obecnie inhibitorach SARS-CoV-2.

Kolejna część opracowania „*Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej*” została podzielona na trzy sekcje charakteryzujące osiągnięcia opisane w poszczególnych dołączonych pracach (Publikacje 1-3).

Sekcja 1, odnosi się do opisanego w Publikacji nr 1 (manuskrypt zdeponowany w bazie bioRxiv, stanowiący ogólnie dostępny tzw preprint (doi.org/10.1101/2023.09.03.5555867; wersja z 26 sierpnia 2024r) skonstruowania systemu do produkcji M^{pro} z SARS-CoV-2 z wykorzystaniem modelu drożdży *S. cerevisiae*. System ten opiera się na heterologicznej ekspresji białka M^{pro} w formie koniugowanej z białkiem zielonej fluorescencji (EGFP). Odpowiedni fragment genomu wirusa został wprowadzony do chromosomu drożdżowego z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas9, umożliwiając regulowaną ekspresję pod kontrolą drożdżowego promotora genu *GAL1*. Co istotne jako łącznik GFP i M^{pro} wykorzystano sekwencję SAVLQ specyficznie rozpoznawaną i nacinaną przez M^{pro} (EGFP-SAVLQ- M^{pro}). Wykazano cytotoksyczny charakter M^{pro} dla komórek drożdżowych, indukcja ekspresji proteazy wiązała się z obniżeniem żywotności komórek. Funkcjonalność konstrukcji oceniano z wykorzystaniem GC376, znanego inhibitora proteazy M^{pro} . System ten został następnie z sukcesem wykorzystany przez Doktoranta jako narzędzie do identyfikacji potencjalnych związków hamujących działanie M^{pro} . Na uwagę zasługuje imponująca liczba przebadanych w ramach projektu związków. Badaniom przesiewowym poddano ponad 1800 inhibitorów, spośród których 10 wybrano do dalszych analiz. Wynikiem tych prac było zidentyfikowanie meisoindigo, pochodnej Indigo naturalis, związku o właściwościach cytotoksycznych, który zwiększał przeżywalność komórek drożdży ekspresujących toksyczną wirusową proteazę M^{pro} . Przeprowadzone badania potwierdziły, że drożdże *S. cerevisiae* stanowią dogodny, tani, bezpieczny i wydajny system do badań funkcji genów wirusowych i opracowania potencjalnych leków przeciwwirusowych. Co najważniejsze, dzięki prowadzonym przez Doktoranta badaniom po raz pierwszy wskazano hamujące aktywność proteazy M^{pro} działanie meisoindigo. Obserwacje te zostały potwierdzone i rozszerzone przez Gao i wsp (2024; <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116498>), co potwierdza przydatność

skonstruowanego przez Doktoranta systemu drożdżowego do szybkiego przeszukiwania bibliotek leków. Analiza przedstawionych w tej części osiągnięć nasunęła mi kilka pytań. W analizach funkcjonalności skonstruowanych szczepów wykorzystano porównanie fenotypu komórek produkujących EGFP-M^{pro} w obecności lub braku inhibitora proteazy. Brakuje jednak bezpośredniego dowodu na prawidłowość i funkcjonalność konstrukcji, którym byłoby wykrycie powstającego w komórkach drożdży białka EGFP-M^{pro} np. z wykorzystaniem przeciwciał anty-GFP. Czy przeprowadzono takie analizy? Czy meisoindigo w wyższych stężeniach jest dla komórek drożdży toksyczne i czy może być substratem transporterów z grupy MDR, w tym Snq2? Zmiany intensywności fluorescencji GFP odnoszono bezpośrednio do aktywności EGFP-SAVLQ-M^{pro} (publikacja 1, Ryc.6), a zmiana poziomu fluorescencji może wynikać również z toksycznego działania badanych inhibitorów. W przypadku starzejących się lub martwych komórek drożdży *S. cerevisiae* obserwuje się pewien poziom autofluorescencji przy zastosowaniu filtrów dla GFP, co może zaburzać interpretację wyników. Wykonanie analogicznych testów dla niepodlegającej procesowaniu wersji EGFP-D4K-M^{pro} i dla komórek ekspresujących samo GFP, w warunkach kontrolnych i przy obecności inhibitorów, pozwoliłoby na rozróżnienie cytotoksycznego efektu M^{pro} i/lub inhibitora. Czy takie badania kontrolne były wykonane? Na Ryc. 6 przedstawiono dane wyłącznie dla wersji EGFP-SAVLQ-M^{pro}. Czy wykorzystano inne metody do oceny przeżywalności komórek? Nie jest dla mnie jasne zastosowanie w badaniach opisanych w „Publikacja 1” białka mCherry. Część wyników badań została przedstawiona w suplemencie do „Publikacji 1”, który nie został dołączony do rozprawy.

Sekcja 2, odnosi się do opisanych w „Publikacji nr 2” (manuskrypt przygotowany z zachowaniem wymogów stawianych publikacji naukowej, nieopublikowany, opatrzonego przez autora komentarzem: „praca zostanie złożona do czasopisma Scientific Reports”) analiz toksycznego wpływu proteazy M^{pro} na komórki drożdży *S. cerevisiae*. Wyniki prowadzonych badań wskazują na powiązanie cytotoksyczności M^{pro} z dysfunkcją mitochondriów. W toku realizacji badań, z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas9, Doktorant skonstruował szczepy drożdżowe pozwalające na ocenę aktywności promotora *GAL1* jak i ocenę cytotoksyczności M^{pro} w zależności od użytego w podłożu źródła węgla. Zaobserwowano zwiększony efekt toksyczny M^{pro} w warunkach wymagających wysokiej aktywności metabolizmu mitochondrialnego np. w hodowli na podłożu z glicerolem. Analiza mechanizmów odpowiedzialnych za ten fenotyp obejmowała badania zużycia tlenu, produkcji reaktywnych form tlenu, obserwacje morfologii mitochondriów i potencjału błonowego. Otrzymane przez Doktoranta wyniki wskazują, że produkcja aktywnej formy proteazy M^{pro} negatywnie wpływa na wydajność fosforylacji oksydacyjnej, ale nie ma wpływu na produkcję wolnych rodników tlenowych. Ponadto przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazano, że M^{pro} zaburza funkcjonowanie mitochondriów, obniża potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, powoduje zmiany w strukturze mitochondriów. W tej części opracowania Doktorant wskazuje na obniżenie lub brak fluorescencji GFP w niektórych komórkach szczepu EGFP-SALVQ-M^{pro} sugerując, że wynikać to może np. z zaburzeń translacji wirusowego M^{pro} w komórkach drożdży. Ponawiam więc pytanie o weryfikację konstrukcji przy użyciu metody Western blot i przeciwciał anty GFP? Pojawia się też niekonsekwencja w interpretacji wyników fluorescencji, w „Publikacja 1” zanik fluorescencji jest odczytywany jako dowód aktywności M^{pro}, w „Publikacji 2” jako potencjalny problem z produkcją M^{pro}. Na rycinach 5 i 6 nie uwzględniono wyników dla szczepu kontrolnego promGAL1::GFP, dlaczego? Moją ciekawość zwróciły wyniki zaprezentowane na Ryc. 6 „Publikacji 2” – wewnątrzkomórkowa lokalizacja sygnału GFP-M^{pro} i kolokalizacja z wybarwionymi TMRM mitochondriami. W przypadku komórek produkujących formę EGFP-SAVLQ-M^{pro}, rozproszony równomiernie w cytoplazmie sygnał najprawdopodobniej wynika ze świecenia GFP uwolnionego po proteolizie EGFP-SAVLQ-M^{pro}. Natomiast w przypadku ekspresji formy EGFP-D4K-M^{pro}, gdzie teoretycznie proteaza jest stale połączona z GFP, wzór fluorescencji jest inny. Wewnątrz komórek widać wyraźne regiony, gdzie sygnał fluorescencji GFP jest zagęszczony. Najprawdopodobniej jest to obszar jądra komórkowego (można to zweryfikować odpowiednim barwieniem np. DAPI), można więc wnioskować, że w komórkach drożdżowych proteaza M^{pro} może być kierowana do jądra. Sugeruje to, że celem molekularnym proteazy M^{pro} mogą być białka jądrowe, w tym takie, które są odpowiedzialne za regulację

homeostazy mitochondriów. Ciekawi mnie czy taka hipoteza była weryfikowana? Jądrowa lokalizacja M^{pro} była obserwowana np. przez Song i wsp (J. Biol. Chem;299(3):102990; 2023), którzy wykazali, że substratem proteazy jest deacetylaza histonowa 2 (HDAC2). Skonstruowana przez Doktoranta, nietoksyczna wersja GFP-D4K-M^{pro}, mogłaby być podstawą do identyfikacji eukariotycznych interaktorów proteazy M^{pro} przy zastosowaniu np. techniki immunoprecypitacji w połączeniu ze spektrometrią mas. Czy takie badania były rozważane? W części „Discussion” „Publikacji 2” wskazano bowiem: „Using these data, we identified 23 proteins essential for mitochondrial function that contain potential cleavage sites for M^{pro} (Table S1). Niestety suplement w postaci tabeli nie został załączony do rozprawy doktorskiej, więc tym bardziej ciekawi mnie jakie białka znalazły się w tym zestawieniu.

Sekcja 3 opracowania odnosi się do artykułu opublikowanego w 2024r w czasopiśmie *International Journal of Molecular Science* (oznaczony jako Publikacja 3). Jest to artykuł przeglądowy, w którym Doktorant jest pierwszym autorem. W publikacji w doskonały, wnikliwy i analityczny sposób przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy na temat wykorzystania modelu drożdżowego w badaniach nad SARS-CoV-2. Opisano najczęściej wykorzystywane w badaniach techniki, wykorzystanie drożdży do badania interakcji Sars-CoV-2 z białkami gospodarza, wykorzystanie drożdży do konstrukcji szczepionek i tworzenia bibliotek przeciwciał.

Praca wzbogacona jest bardzo dobrze skonstruowanymi rycinami i tabelami. Materiał wskazuje na bardzo dogłębne zaznajomienie się Doktoranta z tematyką badań i umiejętność krytycznej analizy opracowań naukowych. Taka analiza jest bardzo dobrą podstawą do trafnego wyboru metod i modelu badawczego. Moim zdaniem ta publikacja powinna rozpoczynać charakterystykę osiągnięć Doktoranta, ponieważ jest doskonałym wprowadzeniem do opisywanej przez Doktoranta części eksperymentalnej. Natomiast w części opracowania w j. polskim do Publikacji 3 brakuje cytowań materiałów źródłowych.

Opracowanie kończy „Podsumowanie” stanowiące syntetyczne zestawienie głównych zadań badawczych i osiągnięć pracy doktorskiej, nie zawiera jednak dyskusji otrzymanych wyników. Dyskusja jest natomiast zawarta w rozdziałach „Discussion” dołączonych prac, gdzie otrzymane przez autora wyniki badań są prawidłowo omawiane i analizowane na tle danych literaturowych. Opis wykorzystywanych w pracy metod, stanowiący w klasycznym układzie rozprawy doktorskiej osobny rozdział, w przypadku tej pracy nie został uwzględniony. Jednakże, każda z załączonych prac zawiera odpowiedni opis użytych metod.

W części „Opis wyników rozprawy doktorskiej” Doktorant często odnosi się do rycin z załączonych manuskryptów. Uważam, że włączenie tych rycin do opisu wzbogaciłoby tekst, a jednocześnie zdecydowanie ułatwiłoby jego zrozumienie i interpretację.

Mam kilka drobnych uwag do niefortunnnych sformułowań:

- Str 26 – szczep toksyczny dla komórek zamiast np. toksyczna dla komórek wersja białka
- Str 27 – podobnie odnoszono się do toksyczności szczepu zamiast toksyczności białka
- Str 26 - Źródła węgla fermentacyjne zamiast fermentowalne
- Brak wyjaśnienia w tekście skrótów: TMRM, YSD, Y2H,

Jako załączniki do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów, w których wykazują swoją rolę w powstaniu poszczególnych publikacji cyklu. Wszystkie oświadczenia wskazują na wiodącą rolę Pana Wojciecha Grabińskiego w ustalaniu koncepcji badań, doboru metod, konstrukcji szczepów, wykonaniu eksperymentów, przygotowaniu i edycji manuskryptu.

Zgodnie z informacjami podanymi w rozprawie doktorskiej wyniki badań Pana Wojciecha Grabińskiego prezentowane były 12 razy na krajowych i międzynarodowych konferencjach, również w formie ustnej prezentacji wyników. W czasie trwania studiów doktorskich mgr Wojciech Grabiński zdobył finansowanie z FEBS YSF na wyjazd na Young Scientist Forum w Portugalii (2022r). Doktorant był również beneficjentem grantu w konkursie IDUB Minigranty Doktoranckie UAM. Poza pracami stanowiącymi podstawę tej rozprawy doktorskiej Pan Wojciech Grabiński jest również współautorem trzech publikacji, opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach (*IJMS*, 2024; *Frontiers in Phy*, 2021; *Zootaxa*, 2019), których

tematyka nie jest powiązana z tematyką rozprawy, ale wynikają z udziału Doktoranta w innych projektach naukowych. Pan Wojciech Grabiński brał udział w projektach naukowych NCN: OPUS11 (2016/21/B/NZ4/00131, kierownik: prof. dr hab. Hanna Kmita), SONATA13 (2017/26/D/NZ1/00075; kierownik dr hab. Andonis Karachitos) i OPUS1 (2011/B/NZ3/00359; kierownik: prof. dr hab. Hanna Kmita). Jest to dowód na szerokie zainteresowania badawcze Doktoranta i doświadczenie w pracy nie tylko z modelem drożdżowym.

Praca mgr. Wojciecha Grabińskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie oraz znajomość metodologii z zakresu biologii molekularnej.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 r. poz. 1571 ze zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Wojciecha Grabińskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



