

Dr hab. Joanna Kamińska
Pracownia Bioenergetyki i i Mechanizmów Chorób Mitochondrialnych
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa; ul. Pawińskiego 5a

Warszawa, 16.05.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Wojciecha Grabińskiego zatytułowanej:
System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2**

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pracy jest Pan dr hab. Adonis Karachitos.

Praca jest w formie zbioru, który obejmuje napisane po angielsku: dwa manuskrypty, z których jeden jest zdeponowany w repozytorium BioRxiv, drugi został złożony w Scientific Reports oraz opublikowaną pracę przeglądową. W pierwszej pracy eksperymentalnej zaprojektowano a następnie skonstruowano system do poszukiwania potencjalnych leków przeciwko SARS-CoV-2. System ten oparty jest o drożdże piekarskie. Został on użyty do przeszukania biblioteki leków, związków dopuszczonych przez Agencję Żywności i Leków (ang. FDA) w Stanach. W drugiej pracy system został zmodyfikowany i wykorzystany do opisu wpływu działania białka wirusowego, proteazy Mpro na mitochondria. Praca przeglądowa przybliży zaś czytelnikowi jak różne gatunki drożdży były używane do opisu działania w komórkach białek wirusa SARS-CoV-2, tj. scharakteryzowania ich oddziaływań z białkami komórek eukariotycznych, oraz do poszukiwania metod terapii infekcji tym wirusem. Tak więc manuskrypty i praca przeglądowa stanowią cykl spójny tematycznie. Poprzedzone są one informacjami przedstawiającymi sylwetkę Doktoranta (życiorys oraz opis aktywności naukowej). W dalszej części znajduje się spis skrótów, streszczenia osiągnięć pracy w języku polskim i angielskim, opis wyników rozprawy na który składają się podrozdziały: cel pracy, wstęp, główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej, podsumowanie i bibliografia. Ta część napisana jest w języku polskim. W części tej Doktorant omawia wspomniane publikacje/manuskrypty. Do każdej z prac dołączone są wymagane regulaminem oświadczenia współautorów, które wskazują na istotny udział Pana mgr. Grabińskiego w przedstawionych pracach.

Temat pracy doktorskiej i jej znaczenie naukowe

Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Studia doktoranckie Pana mgr. Grabińskiego przypadły w dużej części na lata pandemii. Nie dziwi zmiana tematyki badań po jej wybuchu i zajęcie się wirusem SARS-CoV-2, jego wpływem na komórki i poszukiwaniem leków przeciwko temu wirusowi. Pomysł na użycie drożdży jako modelu badawczego może wydawać się nieoczywisty dla osób, które nie pracują z tymi organizmami. Jest to jednak niedoceniany model, którego zalety i możliwości dotyczące użycia go do badań wirusów, nie tylko SARS-CoV-2,

przedstawione zostały w pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy. Wybór tego modelu do badań dla osoby, która wcześniej wykonała pracę licencjacką na drożdżach nie dziwi. Jest to jak najbardziej model adekwatny, bardzo przydatny do tworzenia układów badawczych, modeli chorób i poszukiwania na nie leków. Wybór białka, proteazy Mpro, jako badanego białka i celu działania terapeutycznego został dobrze przemyślany, gdyż jest to proteaza która z jednej strony jest niezbędna w cyklu życiowym wirusa, a z drugiej różni się od proteaz ludzkich. Tak więc, jej inhibitory nie powinny wpływać na aktywność proteaz ludzkich. Podobnie przemyślany jest wybór sposobu manipulowania genomem drożdży i pomysł na sterowanie ekspresją genu proteazy przez zmiany źródła węgla.

Zakład w którym Pan mgr Grabiński wykonał pracę doktorską od lat zajmuje się bioenergetyką. Naturalną konsekwencją tego jest zwrócenie uwagi na zmiany w działaniu mitochondriów w wyniku obecności w komórce proteazy Mpro, co zostało opisane w drugim manuskrypcie. W literaturze zwracano już uwagę na wpływ wirusa SARS-CoV-2 na mitochondria, łącząc to z tzw. long Covid. Prace łączące wirusa z mitochondriami dotyczą jednak głównie wywołania apoptozy przez wirusa. Nie ma doniesień łączących jedno, konkretne białko wirusowe - Mpro, jego obecność w komórce ze zmianami w działaniu mitochondriów. Warto podkreślić, że prac dotyczących mitochondriów w kontekście wirusa SARS-CoV-2, jak na olbrzymią liczbę prac dotyczących tego wirusa, jest niewiele. Oznacza to, że przedstawione wyniki są unikatowe.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie dla nauki

W pierwszej z cyklu prac w chodzącej w skład rozprawy Doktorant skonstruował system do badania działania proteazy Mpro wirusa SARS-CoV-2, który pozwolił na przeszukanie biblioteki około 1900 leków zaaprobowanych do użytku przez FDA i wytypowanie kilku potencjalnych związków w tym meisoindygo, jako leku ograniczającego toksyczne działanie proteazy na komórki drożdży, a co za tym idzie związku potencjalnie do wykorzystania do leczenia infekcji wirusem SARS-CoV-2. Potwierdzeniem istotności tego odkrycia jest praca która ukazała się już po zdeponowaniu manuskryptu z wynikami Doktoranta w BioRxiv, a która opisuje meisoindygo jako niekowalencyjny inhibitor proteazy Mpro (Gao i wsp., 2024).

Opisany w drugim manuskrypcie wpływ proteazy Mpro na mitochondria drożdży pokazuje, że taki układ badawczy można użyć do poznania mechanizmów leżących u podstaw zmian w działaniu mitochondriów, jakie opisane zostały u pacjentów zmagających się z long COVID. Pozwolić to może np. na wytypowanie nowych celów terapeutycznych.

Podsumowując prace Pana Mgr. Wojciecha Grabińskiego dotyczyły istotnej dla społeczeństwa kwestii, są oryginalne i wartościowe.

Poprawności formalno-językowa

W warstwie poprawności formalno-językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej Doktorant nie ustrzegł się różnych, drobnych błędów, które nie wpływają na ocenę wartości osiągniętych wyników. Są to np. użycie różne form skrótów nazw aminokwasów jednoterowe i trójliterowe w jednym tekście, brak formatowania nazwy genu tj. zapisu kursywą itp. Kolejna uwaga dotyczy drugiego z manuskryptów - ma nieponumerowane strony. Zabrakło też suplementów do manuskryptów do których są odnośniki np. w pracy 1 (Fig S2 wspomniana na str.7, Supplementary file 2 na stronie 9, Fig. S1, Supplementary file 1 wymienione na str. 14). Podany przykład pokazuje też, że pliki z danymi uzupełniającymi powinny być w innej kolejności wg. kolejności pojawiania się w tekście. W drugim

manuskrypcie brak dodatkowej tabeli z potencjalnymi substratami dla Mpro. Doktorant nie uniknął też błędów, które większość popełnia czyli mieszania nazw genów i białek. Przykładowo na str. 8 pierwszego z manuskryptów jest napisane: „We introduced a modified gene with D4K linker between EGFP and M^{pro}.”, co sugeruje hybrydę złożoną z DNA i białka.

Ocena metodologii

Dobór literatury i jej wykorzystanie

Doktorant zapoznał się z literaturą dotyczącą możliwości używania drożdży w badaniach dotyczących wirusów. Zaowocowało to opublikowaną pracą przeglądową opartą na 105 pozycjach literaturowych, w około 80% z lat 2020-24. Prace wcześniejsze dotyczą głównie podstaw pracy z drożdżami, co jest oczywiste, gdyż wiele z tych technik zostało opracowane już dość dawno, a należało je przedstawić w pracy.

Poprawność formułowania problemów badawczych

Pandemia spowodowana wirusem SARS-CoV-2 sprawiła przekierowanie wysiłków naukowców na opracowywanie terapii przeciwwirusowych. Przeprowadzone i przedstawione w dwóch manuskryptach badania stanowią ciąg logicznych eksperymentów od skonstruowania modelu i jego walidacji do użycia go do poszukiwania leków. W tworzeniu modelu Doktorant wykorzystał kilka faktów i technik:

- (1) znany od lat mechanizm represji genów zaangażowanych w używanie alternatywnych do glukozy źródeł węgla przez preferowaną przez drożdże glukozę.
- (2) technikę CRISPR-Cas9 do modyfikowania genomu drożdży wprowadzając w miejsce genu *GALI* sekwencje kodujące różne białka.

Stosując takie podejście badawcze osiągnął postawiony sobie cel.

Mam kilka uwag do opisu, wykonania niektórych eksperymentów i wyciąganych wniosków.

Nie znalazłam informacji na temat tego jak sprawdzane były nowe szczepy, tzn. jak sprawdzono integrację konstruktów w locus *GALI* w obu manuskryptach.

Ad praca 1.

Na stronie 8 jest napisane, że łącznik SAVLQ pozwala na odcięcie EGFP przez Mpro z odniesieniem do Ryciny 2A. Rycina ta przedstawia tylko strukturę białka fuzyjnego. Brakuje tu analizy typu Western blot pokazującej akumulację w czasie, po zaindukowaniu galaktozą ekspresji genu fuzyjnego, uwolnionego przez proteazę EGFP i obecność białka fuzyjnego EGFP-Mpro jeżeli ma ono łącznik D4K.

Kolejne pytania/uwagi dotyczą przeszukiwania biblioteki leków. (1) Nie dowiedziałam się jakiej biblioteki leków używał Doktorant. (2) Komórki były zagęszczane do OD=10. Ale w jakiej fazie wzrostu były hodowle, które były zagęszczane? Moje doświadczenie mówi, że w zależności od tego jaka była faza wzrostu kultury użytej do analizy to efekt, otrzymany wynik może być inny. Przykładowo w moich testach na pożywkach z siarczanem dodecyłu sodu komórki z kultur o niskim OD są wrażliwsze niż z kultur starszych, o wyższym OD. Użycie komórek z młodych kultur daje też możliwość wychycenia bardziej subtelnych zmian.

Ad praca 2

Pytanie dotyczy analizy poziomu świecenia EGFP (rycina 2). Komórki były zbierane z hodowli na pożywkach stałych, zawieszane w wodzie do jednakowej gęstości optycznej. Dlaczego nie analizowano z hodowli płynnych z jednoczesnym monitorowaniem wzrostu kultury? EGFP jest stabilnym białkiem, które akumuluje się w czasie wzrostu. Jeżeli zbierane komórki nie były z jednakowej fazy wzrostu to już to mogłoby generować różnice w poziomie EGFP. Czyli moje pytanie jest czy jeżeli wziąć 1 mL hodowli o OD 10 i 10 mL hodowli tego samego szczepu i zagęścić ją aby mieć 1 mL o OD 10 to czy zmierzony poziom EGFP byłby taki sam?

Pytanie do ryciny 5. Przeliczone zostało, że nie ma zwiększenia akumulacji anionu ponadtlenkowego jeżeli pod uwagę wziąć szybkość oddychania. Jak to zostało policzone? Jeden parametr jest wyrażony w $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1}$, a drugi w poziomie fluorescencji barwnika MitoSOX/OD komórek.

Drugie zastrzeżenie mam do wybarwiania mitochondriów tetrametylorodaminą. Nie zostało podane w jakiej fazie wzrostu były komórki barwione w eksperymencie. Wiadomo, że obraz mitochondriów odzwierciedla stan metaboliczny komórki, więc należy porównywać komórki z takiej samej fazy wzrostu kultury i w przypadku mitochondriów, aby przyjrzeć się ich morfologii kultury powinny być młode. Wprawdzie różnica między zdjęciem komórek w których produkowane jest białko EGFP-SAVLQ-Mpro w porównaniu do kontroli EGFP-D4K-Mpro jest ewidentna. Jednak obserwujemy wysoki poziom tła dla kontroli, nie widać ładnych mitochondriów. Może jest to tylko kwestia wydruku zdjęcia i oryginał wygląda inaczej.

Analizowałam odnośnik literaturowy dotyczący metodologii barwienia i stwierdziłam, że jest różnica w pH buforu użytego w trakcie barwienia. Jakie znaczenie miała zmiana pH?

W tym samym eksperymencie ewidentne jest, że wspomniane dwa białka fuzyjne mają różną lokalizację. EGFP-D4K-Mpro wydaje się być zagęszczone w jądrze komórkowym, czego nie widać dla EGFP-SALVQ-Mpro. Jednakże w opisie Doktorant pisze, o równomiernej dystrybucji białka fuzyjnego w obrębie komórki (str. 28). Proszę o komentarz.

Kolejne pytanie dotyczy potencjalnych substratów Mpro. Jak odróżnić toksyczność wynikłą z cięcia jakiegoś białka przez Mpro skutkującego brakiem białka pełnej długości od toksyczności wynikłej z działania uwolnionego fragmentu jakiegoś białka?

Ad praca 3

Moje pytanie dotyczy tekstu na stronie 5 tej pracy. Doktorant pisze o oddziaływaniu białka NSP1 wirusa z kompleksem HOPS, i wywołanych tym oddziaływaniem zaburzeniach transportu wewnątrzkomórkowego. Dalej jest napisane, że jest to zgodne z „porwaniem” organellum pośredniego między retikulum endoplazmatycznego (ER) a aparatem Golgiego tzw. ERGIC w czasie infekcji wirusem SARS-CoV-2 komórek ssaków. Proszę o przedstawienie toku myślowego dotyczącego połączenie tych faktów, gdyż ERGIC jak nazwa wskazuje to organellum na drodze transportu białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego, a HOPS uczestniczy w fuzji z błonami wakuolarnymi, lizosomalnymi czyli dla mnie na zupełnie innym etapie transportu wewnątrzkomórkowego.

I druga uwaga do tej pracy to w podpisie do ryciny 4 jest napisane, że delecje genów odpowiedzialnych za oporność wielolekową powodują, że komórki są przepuszczalne dla leków. Wspomniane delecje nie zmieniają pobierania leków tylko powodują brak możliwości

ich wytransportowania z komórki, gdyż białka kodowane przez wspomniane geny są pompami wyrzucającymi związki na zewnątrz komórki.

Pomimo wypisanych powyżej zastrzeżeń moja ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr Wojciecha Grabińskiego zatytułowanej „System Drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2” jest pozytywna. Badania są oryginalne, na odpowiednim poziomie technicznym i merytorycznym.

Wniosek końcowy

Uważam, że recenzowana praca doktorska odpowiada wszystkim ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr. Wojciecha Grabińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Joanna Kamińska