

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgr. Wojciecha Grabińskiego

pt. System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2

wykonanej

w Zakładzie Bioenergetyki

Wydziału Biologii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem Pana dr. hab. Andonisa Karachitosa

Ocena formalna rozprawy

Praca przygotowana jest według obowiązującej od roku 2018 ustawy o tytule i stopniach naukowych, pozwalającej na przedstawienie rozprawy doktorskiej w postaci zbioru opublikowanych prac. Na rozprawę składają się trzy prace eksperymentalne (dwie eksperymentalne i jedna przeglądowa) i we wszystkich Pan mgr Grabiński jest pierwszym autorem. Jedna praca ukazała się w rozpoznawanym czasopiśmie naukowym, a dwie pozostałe przygotowane są do złożenia w redakcji (jedną z nich opublikowano jako nierecenzowany preprint). Na podstawie załączonych oświadczeń stwierdzam znaczący udział Doktoranta w powstaniu wszystkich publikacji.

Zgodnie z wymogami publikacje poprzedzone są omówieniem zagadnienia. Wstęp to solidnie przygotowany tekst, który w sposób rzeczowy wprowadza w tematykę badań. Autor skutecznie przedstawił zarówno znaczenie biologiczne głównej proteazy SARS-CoV-2 (M^{pro}), jak i uzasadnienie wykorzystania drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmu modelowego. Wstęp zawiera również omówienie struktury wirusa, znaczenia jego białek oraz aktualnego stanu wiedzy na temat istniejących inhibitorów M^{pro} . Mocną stroną jest prezentacja wagi pandemii COVID-19 i wyjaśnienie dlaczego główna proteaza stanowi istotny cel terapeutyczny. Wstęp miejscami zawiera potoczne sformułowania lub zbyt długie zdania, pojawiają się powtórzenia, ale wszystkie z tych kwestii są niekiedy nie do uniknięcia w rozprawach doktorskich.

Recenzja sekcji pt. „Skonstruowany system jako narzędzie do poszukiwania inhibitorów M^{pro}”

Autor zaprezentował starannie zaprojektowany system przesiewowy oparty na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, służący do identyfikacji inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2, M^{pro}. Ważnym atutem badań przedstawionych w tej części rozprawy jest bezpieczeństwo biologiczne (brak potrzeby stosowania wirusa) i możliwość szybkiego przesiewu w czasie (wielu związków jednocześnie). Wprowadzenie kontrolnego wariantu fuzyjnego EGFP-D4K-M^{pro} i modyfikacji związanych z genomem drożdży metodą CRISPR/Cas9 świadczy o zaawansowanej wiedzy Doktoranta z zakresu inżynierii genetycznej. Wyniki uzyskane w badaniach z meisoindigo, mimo pewnych niejednoznaczności, potwierdziły skuteczność systemu i jego potencjał w identyfikacji nowych inhibitorów M^{pro}.

Do tej części pracy doktorskiej mam następujące pytania (wszystkie podyktowane moim zainteresowaniem tym ciekawym tematem i moją dociekliwością, ale nie chęcią krytyki):

1. Czy wykonano kontrolne eksperymenty charakteryzujące białko M^{pro} w drożdżach, np. czy nie ulegało ono modyfikacjom, które mogłyby zmienić jego aktywność?
2. Jak usunięcie genów *PDR5*, *SNQ2* i *PDR1* wpłynęło na wzrost drożdży i w konsekwencji na wiarygodność testów przesiewowych? Dlaczego ostatecznie zdecydowano się na wykorzystanie tylko delekcji *PDR5*? Czy sugerowano się tutaj innymi, dostępnymi modelami?
3. W jaki sposób zmiana źródła węgla na sacharozę przyspieszyła testy przesiewowe? Czy mógłby Pan, w oparciu o dostępną wiedzę (oraz wyniki ujęte w Pana Publikacji nr 2), podjąć próbę identyfikacji czynników, które mogły wpłynąć na niepowodzenie testów przesiewowych na podłożu z glicerolem?
4. Dlaczego skuteczność ixazomibu była wyraźniejsza na pożywce stałej niż płynnej? Czy różnice w skuteczności mogą być związane z rozpuszczalnością/stabilnością?
5. Eksperymenty potwierdzające działanie meisoindigo jako inhibitora M^{pro} zostały przeprowadzone rzetelnie i uczciwie przyznano istnienie problemów interpretacyjnych wynikających z autofluorescencji związku. Nurtuje mnie pytanie dlaczego nie rozważono alternatywnych metod walidacji niezależnych od fluorescencji (różne systemy detekcji aktywności M^{pro} przedstawia Pan w Publikacji nr 3). Czy może wykonano takie eksperymenty? Być może można zmodyfikować testy FRET tak, aby zminimalizować interferencje meisoindigo?
6. Czy system drożdżowy można zaadaptować do analizy działania inhibitorów na inne wirusowe proteazy, np. HIV-1?

Recenzja sekcji pt. „Toksyczny wpływ M^{pro} na komórki drożdży związany jest z dysfunkcją mitochondriów”

W Publikacji 2, będącej logiczną konsekwencją Publikacji 1, zastosowano nowy model drożdżowy do analizy zależności między aktywnością M^{pro} a funkcjonowaniem mitochondriów w różnych warunkach metabolicznych. Wykorzystanie różnorodnych źródeł węgla, które pozwoliło na rozróżnienie wpływu metabolizmu fermentacyjnego vs. mitochondrialnego na

toksyczność M^{pro} to zdecydowanie nowatorskie podejście. Przy konstrukcji modeli drożdżowych Doktorant ponownie umiejętnie zastosował technologię CRISPR/Cas9.

Moje pytania do tej sekcji:

7. Czy zbadano poziom ekspresji M^{pro} w różnych warunkach, czy różnice w toksyczności wynikają z różnic w poziomie ekspresji?
8. Przedstawił Pan kolokalizację białek fuzyjnych M^{pro} z TMRM, który ocenia potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Czy istnieją dane sugerujące, że M^{pro} lokalizuje się w mitochondriach lub oddziałuje z ich błoną? Czy możliwe jest, że M^{pro} oddziałuje bezpośrednio z białkami mitochondrialnymi? Czy planowane są badania proteomiczne w celu identyfikacji potencjalnych interakcji?
9. Pytanie do całej pracy doktorskiej: Jaką przewagę ma system skonstruowany przez Pana nad systemem zaproponowanym w 2023 roku przez grupę Johna S. Choya (praca jest cytowana w Publikacji 2 w kontekście toksyczności M^{pro}).

Recenzja sekcji pt. „Drożdże jako skuteczna platforma badawcza w kontekście SARS-CoV-2”

Publikacja nr 3 to obszerne i bardzo dobrze skonstruowane opracowanie przeglądowe, które ukazuje drożdże jako wielofunkcyjną platformę badawczą w kontekście SARS-CoV-2. Praca obejmuje szerokie spektrum zastosowań drożdży, od badań nad interakcjami białek, przez systemy przesiewowe inhibitorów, po produkcję antygenów i szczepionek. W artykule zaakcentowano możliwości aplikacyjne, to jest produkcję składników szczepionek czy testy diagnostyczne. Drożdże zostały przedstawione jako „backstage heroes” - jako model dostępny, tani, szybki, elastyczny - to ma kluczowe znaczenie w sytuacjach nagłych, takich jak pandemia. W pracy nie znalazłam wyraźnego wskazania ograniczeń modelu drożdżowego, a na myśl przychodzi mi kilka – proszę o komentarz podczas obrony pracy doktorskiej.

Wnioski końcowe

Rozprawa podejmuje temat o ogromnym znaczeniu zarówno naukowym, jak i społecznym, to jest zgłębianie mechanizmów działania SARS-CoV-2 oraz poszukiwanie jego inhibitorów. Pan mgr Grabiński opracował innowacyjny system oparty na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, który pozwala analizować aktywność głównej proteazy wirusa (M^{pro}) oraz identyfikować jej inhibitory. Włączenie mechanizmów fluorescencji i toksyczności jako wskaźników aktywności M^{pro} świadczy o dużej pomysłowości i praktyczności rozwiązania.

Co warto podkreślić, praca jest interdyscyplinarna, łączy mikrobiologię, biotechnologię oraz wirusologię, co zwiększa jej wartość naukową. Znalezienie nowego inhibitora, meisindigo, to istotny wkład w rozwój potencjalnych leków przeciwwirusowych. Nowatorskim aspektem pracy jest zastosowanie drożdży jako narzędzia przesiewowego dla białka wirusowego, kontrola ekspresji genu M^{pro} poprzez promotor GAL1 i zbadanie wpływu proteazy na funkcjonowanie mitochondriów, co może otworzyć nowe ścieżki badawcze SARS-

CoV-2. Sądę, że tego rodzaju podejście może być przydatne również w badaniach nad innymi patogenami.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pana mgr. Wojciecha Grabińskiego to bardzo dobrze przygotowana, interdyscyplinarna, aktualna praca naukowa, świadcząca o dojrzałości naukowej Doktoranta oraz jego umiejętnościach w projektowaniu i prowadzeniu złożonych eksperymentów. Naukowa wartość rozprawy jest bardzo wysoka.

Praca zdecydowanie spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone 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 ze zm.). Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr. Wojciecha Grabińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną zaprezentowanych badań wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Kamila Gnywa