

Prof. dr hab. Barbara Nawrot
Koordynator Działu Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Tel. +48-42-6803248, +48-604-783945
www.cbmm.lodz.pl

Łódź, 15 czerwca 2020 r.

Recenzja Rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pietrow p.t. „*Synteza podwójnie funkcjonalizowanych dinukleotyдовых analogów końca 5' mRNA (tzw. kapu)*”

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Pietrow została wykonana w Pracowni Syntezy Organicznych Nanomateriałów i Biomolekuł na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr hab. Marzeny Jankowskiej-Anyszki (promotor rozprawy). Wyniki badań wchodzących w skład rozprawy były uzyskane w ramach dwóch grantów OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Przedmiotem rozprawy jest synteza analogów „czapeczki” (lub spolszczonej angielskiej nazwy *cap*, a więc „kapu”) - 5'-terminalnego fragmentu informacyjnego (matrycowego) RNA (mRNA) i ich charakterystyka fizyko-chemiczna i biologiczna. Tematyka ta od kilkunastu lat uprawiana jest przez naukowców wywodzących się ze Szkoły profesora Edwarda Darżynkiewicza, który w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku był światowym pionierem badań nad syntezą, strukturą i zastosowaniem analogów kapu w biologii komórkowej i strukturalnej, a od kilku lat także nad zastosowaniem terapeutycznym tych związków. Przedmiotem przedkładanej recenzji jest moja ocena ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki w uprawianej dyscyplinie naukowej, umiejętności prowadzenia badań naukowych oraz oryginalności rozwiązane go problemu naukowego.

Rozprawa Doktorska zawiera streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, część teoretyczną przedstawiającą aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (47 stron), opis celu pracy, opis wyników badań własnych (52 strony), krótkie podsumowanie oraz część eksperymentalną. Uzupełnieniem opisu jest spis literatury liczący 131 pozycji oraz wykaz stosowanych skrótów.

Ogólną wiedzę Doktorantki oceniłam zarówno na podstawie literaturowego opracowania zagadnienia przedmiotu, jak i dyskusji uzyskanych wyników w świetle już opublikowanych danych. We wstępie teoretycznym Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała stan wiedzy na temat biosyntezy cząsteczki kapu i jej funkcji w procesie potranskrypcyjnej obróbki mRNA, w transporcie mRNA do cytoplazmy i w inicjacji procesu translacji. Zanalizowała strukturę i funkcję eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 4E w rozpoznaniu naładowanej reszty 7-metyloguanozyny w cząsteczce mRNA. Następnie w zwięzły sposób omówiła syntezę analogów kapu i ich aktywność inhibitorową w procesie translacji *in vitro* i odporność na degradację enzymatyczną. Podkreśliła znaczenie analogów kapu w syntezie modyfikowanych transkryptów mRNA, użytecznych w badaniach biologicznych i medycznych. Dobrze zapoznała czytelnika z metodami wprowadzania nowych funkcji chemicznych w strategiczne pozycje pierścienia guaniny, reszty rybozy i w mostek polifosforanowy. Najbardziej ciekawym dla mnie okazało się omówienie dorobku zespołu Promotora rozprawy w zakresie

modyfikacji drugiego nukleotydu w strukturze kapu, a mianowicie wprowadzenie reszty kwasu lewulinowego w pozycję 2',3'-reszty rybozy oraz modyfikację grupy NH_2 guanozyny. Obydwie tak modyfikowane cząsteczki po przyłączeniu np. reszty biotyny czy krótkiego peptydu CPP (wspomagającego transport dokomórkowy) stanowią ważne narzędzia w badaniach biologicznych. Drugim zagadnieniem, w którym Doktorantka wykazała się pogłębioną wiedzą jest chemia tioli i disulfidów, oraz wykorzystanie ugrupowania disiarczkowego do wprowadzania dodatkowych grup funkcyjnych do związków organicznych. Rozdział ten świadczy o dobrej znajomości literatury i dobrze wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej ocenianej rozprawy.

Do tej części rozprawy ma jedynie kilka uwag krytycznych, a mianowicie: (1) Rysunek 2 przedstawia preferowaną konformację m7G, a nie kapu, jeśli jako kap rozumiemy strukturę dinukleozydotrifosforanu; (2) nie powinno się stosować określenia „wycięcie” intronu w procesie składania (tutaj też żargonowo: splicingu), ale trudno znaleźć inne dobre i poprawne po polsku słowo (jak chociażby „usunięcie” intronu); (3) warunki „kwasowe” a nie „kwaśne”; (4) Schemat 1: niepoprawnie narysowana struktura nukleotydu (odbicie lustrzane); (5) na str. 25 nieskładne zdanie zaczynające się od słów „Pierwsza praca...”; (6) czy „fosforotionian” to poprawna nazwa (z angielskiego „phosphorothioate”? Tioniany, to sole kwasów politionowych, np. tetratationian sodu ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$), zatem termin „fosforotionian” sugerowałby jakiś analog anionu kwasu politionowego z „podłączonym” gdzieś atomem fosforu. Czy nie powinno być „tiofosforan”?; (7) stężenie μM a nie uM ; (8) wiązanie „disiarczkowe” a nie „disulfidowe”, aczkolwiek nazwa „disulfidy” jest już dzisiaj powszechnie akceptowana dla związków zawierających wiązanie -S-S-; (9) „perhydrol” to nazwa zwyczajowa dotycząca 30-35% roztworu nadtlenu wodoru w wodzie, a prawidłowo powinno się nazwać „nadtlenuk wodoru” i określić stężenie czystej substancji w roztworze. Uwagi te nie dyskredytują wiedzy Doktorantki, natomiast są wskazówką o potrzebie stosowania precyzyjnego języka w tekstach naukowych.

Przechodząc do omówienia wartości merytorycznej rozprawy pragnę podkreślić, że cel pracy został sformułowany precyzyjnie i odnosi się głównie do wyzwań syntetycznych, a mianowicie opracowania syntezy trzech podwójnie sfunkcjonalizowanych analogów kapu modyfikowanych w obrębie drugiego nukleotydu (pierwszego transkrybowanego). Doktorantka zaplanowała też zbadanie związków w kontekście ułatwionego transportu do komórki i określenia lokalizacji cząsteczki modyfikowanego kapu. Nawiasem mówiąc, wyrażenie, że <znacznik fluorescencyjny „umożliwi” lokalizację komórkową związku> jest niepoprawne, ponieważ sugeruje, że znacznik wpływa na znalezienie się związku w komórce (choć to też może się zdarzyć), ale tutaj jednak chodzi o to, że znacznik pozwoli zlokalizować (określić miejsce), gdzie związek znajduje się w komórce.

W badaniach własnych Doktorantka stanęła przed trudnym zadaniem eksperymentalnego zweryfikowania procedur opisanych w literaturze dla realizacji własnych celów syntetycznych, wyboru najbardziej obiecującego podejścia i jego optymalizacji, bądź opracowania własnych procedur, dla uzyskania danego związku. Niebagatelnym wyzwaniem było także opracowanie procedur wyodrębniania, oczyszczania i identyfikacji otrzymanych związków. W pierwszym etapie badań własnych Doktorantka opracowała syntezę trzech podwójnie sfunkcjonalizowanych analogów 5'-fosforanu guanozyny. Ten etap badań okazał się stosunkowo prosty, można było zastosować wcześniej opracowane podejścia, po minimalnej optymalizacji warunków reakcji. Trudności nie nastęrczała również klasyczna fosforylacja grupy 5'-OH reszty G metodą Yoshikawy. Produkty reakcji na poziomie nukleozydu były wydzielane poprzez strącanie eterem etylowym, a nukleotydy oczyszczano metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE/Sephadex). Finalnie, Doktorantka przeprowadziła syntezę analogów kapu w warunkach dobrze rozpracowanych w Zespole dr hab.

Jankowskiej-Anyszki, poprzez kondensację zaktywowanego imidazolem difosforanu 7-metyloguanozyny z difosforanem podwójnie modyfikowanej reszty guanozyny, przy czym szczególną uwagę zwróciła na utrzymanie reżimu warunków reakcji aktywacji m7GDP, aby zapobiec dekompozycji pożądanego półproduktu im(m7GDP). Doktorantka wykazała, że grupa propargilowa na funkcji NH₂ guanozyny ma negatywny wpływ na wydajność reakcji kondensacji (tutaj nazwanej reakcją sprzęgania). Nie odniosła się przy tym do poprzednich wyników, opisanych w publikacji nr. 68, a więc efektywności syntezy związku 5 w reakcji opisanej w schemacie 8, gdzie atom wodoru grupy aminowej jest podstawiony resztą n-pentynyłu.

Za najciekawszą część badań własnych uważam tę, w której Doktorantka „dekorowała” przygotowane wcześniej, podwójnie modyfikowane analogi kapu resztami wnoszącymi określoną funkcję biologiczną czy biofizyczną. I tak np. zoptymalizowała alternatywne drogi syntezy analogu kapu dekorowanego krótkim 3-aa peptydem i resztą dansylową. W omówieniu zabrakło informacji, która z tych dwóch dróg (przedstawionych na Schematach 24 i 25) jest bardziej wydajna i eksperymentalnie łatwiejsza, zważywszy na fakt, że podejście według schematu 25 jest o jeden etap dłuższe. Ponadto, w wyniku dwuetapowej reakcji, według schematu 27, analogicznej do podejścia ze schematu 24, otrzymała podwójnie sfunkcjonalizowany, fluorescencyjnie wyznakowany analog kapu, zawierający 11-aa peptyd ułatwiający transport dokomórkowy. Doktorantka wykazała, że związek ten łatwo przechodzi przez błonę komórkową i kumuluje się w cytozolu. Ponadto, wykazuje zdolność skutecznego hamowania kap-zależnej translacji w systemie *in vitro* tj. w lizacie z retikulocytów króliczych i w komórkach MCF-7. Tutaj zaznaczę, że niewłaściwie zdefiniowano eksperymenty w systemie komórkowym jako eksperymenty *in vivo*, gdyż za takie uważa się eksperymenty prowadzone w organizmach żywych. Eksperymenty „w szkle” poprawniej jest nazwać eksperymentami *in vitro*, lub, jak w tym przypadku, uściślić, że chodzi o eksperymenty w hodowlach komórkowych.

Najwięcej problemów eksperymentalnych Doktorantka napotkała podczas „dekorowania” analogów kapu w miejscu funkcji tiolowej, poprzez syntezę odpowiednich disiarczków. Po licznych próbach wykorzystania podejść opisanych w literaturze i cytowanych w części teoretycznej rozprawy, udało się rozwiązać ten syntetyczny problem - wykazano bowiem, na poziomie GMP^S, że możliwa jest wydajna i selektywna wymiana pomiędzy disulfidem (tj. jednym tiolem zaktywowanym za pomocą tiomocznika) a drugim tiolem, prowadząca do asymetrycznych disulfidów GMP^S. Jedynym ograniczeniem tej metody jest fakt, że reakcja była selektywna dla alifatycznych tioli o krótkim łańcuchu. Podejście to otworzyło drogę do wprowadzania do cząsteczki nukleotydu/kapu dodatkowych grup funkcyjnych (OH, N₃, czy COOH), umożliwiających dalszą rozbudowę cząsteczki o podstawniki fluorescencyjne lub umożliwiające transport dokomórkowy. Przydatność opracowanej metody wykazana została również na poziomie dinukleozydotrifosforanu, a następnie na poziomie kapu (z m7G). W ten sposób otrzymano wysoce sfunkcjonalizowane analogi kapu (związki 4 i 5, schemat 44), użyteczne jako fluorescencyjne sondy o różnej długości linkera. Finalnie, wykorzystując zdobytą wiedzę i doświadczenie, udało się otrzymać podwójnie sfunkcjonalizowany analog 5'-końca mRNA zawierający ugrupowanie disiarczkowe i resztę etylenodiamino-dansylową. Szkoda, że nie udało się otrzymać podwójnie sfunkcjonalizowanego analogu kapu zawierającego ugrupowanie C6-disiarczkowe i znacznik fluorescencyjny w pozycji N2 guanozyny, albowiem niepowodzeniem skończyła się próba przeprowadzenia reakcji katalizowanej jonami miedzi Cu(I) reakcji *click* w obecności ugrupowania tiolowego, bądź disiarczkowego. Oczywiście, istnieje metoda 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena prowadzona bez udziału jonów miedzi (I), z naprężonymi cyklooktynami, ale w tym przypadku wymagałoby to zmiany strategii modyfikacji pozycji C2 w reszcie guanozyny. Ta część

rozprawy, prezentująca wyniki i ich dyskusję, napisana została klarownie, starannie i w sposób logiczny. Pokazano strategię wyboru podejść syntetycznych i opracowano efektywne metody funkcjonalizacji reszty kapu do celów biologicznych. O wysiłkach Doktorantki w osiągnięciu celów rozprawy niech świadczy fakt, że w opisie badań własnych 14-krotnie użyła stwierdzenia „nie dało się”, co jednak nie zniechęciło jej do dalszych poszukiwań efektywnych rozwiązań syntetycznych.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag, a mianowicie:

1. Na stronie 77 jest następujące zdanie: „W syntezie wiązania amidowego istotne jest pH mieszaniny reakcyjnej, które musi być stale monitorowane równoległe z postępowaniem reakcji, który kontrolowałam z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).” Jak korygowane było pH w tych reakcjach? Tej informacji zabrakło w powyższym opisie.
2. Na schemacie 26 narysowany jest peptyd penetrujący błonę komórkową, a w tekście użyte jest sformułowanie „kationowy peptyd...”. Jak powinna wyglądać struktura tego peptydu, aby zapewnione było efektywne oddziaływanie z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi białek błony komórkowej?
3. Należy unikać sformułowań typu „podstawienie fluoru”, „podstawienie siarki” itd., (podstawienie „atomu” fluoru, czy „atomu” siarki)
4. Schemat 22 ma nieprawidłowo zaznaczony kierunek reakcji etapów iv i v
5. Proszę o wytłumaczenie, co Doktorantka rozumie poprzez sformułowanie „cennaść dołączanej struktury” str. 74
6. Niepoprawnie użyte jest sformułowanie „substrat wyjściowy”
7. Co dokładnie Doktorantka ma na myśli pisząc „synteza wiązania amidowego” czy „wiązania disiarczkowego”? Moim zdaniem poprawnie powinno być „synteza związku”, a więc synteza amidu lub synteza disiarczku, a zawiązywanie/utworzenie wiązania amidowego, disiarczkowego
8. Poprawnie „trietyloamina” a nie „trójetyloamina”

Część eksperymentalna zawierająca opisy przeprowadzonych syntez i charakterystykę otrzymanych związków została opracowana starannie i przejrzyście. Jednakże tylko nieliczne z otrzymanych nowych związków zostały w pełni scharakteryzowane (^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR). Nie podano również rodzaju jonizacji dla widm masowych. Dziwi również brak opisu badań biologicznych, których wyniki są przedmiotem prac opublikowanych ze współautorstwem Doktorantki. Proszę o komentarz w tej sprawie w czasie publicznej obrony.

Wszystkie przytoczone powyżej uwagi krytyczne nie dyskredytują wiedzy Doktorantki i jej osiągnięć, nie wpływają negatywnie na merytoryczną ocenę rozprawy, a są raczej wskazówką dla młodego badacza jak unikać niedociągnięć przy redagowaniu tekstów naukowych.

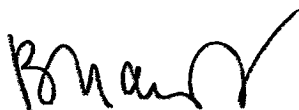
Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy nowoczesnych i aktualnych zagadnień związanych z wytwarzaniem analogów fragmentów naturalnych kwasów nukleinowych, które stanowią doskonałe narzędzia molekularne do badań biologicznych i ewentualnych zastosowań terapeutycznych. Możliwe zastosowania wytworzonych analogów kapu są zachętą do syntezy dalszych analogów naturalnych biocząsteczek z wykorzystaniem procedur syntetycznych opracowanych przez Doktorantkę.

Wniosek końcowy

Doktorantka jest specjalistką w zakresie chemii polifosforanów nukleozydów, analogów 5'-końca informacyjnego RNA. Wykazała się ogólną wiedzą w uprawianej dziedzinie nauki. Profesjonalnie przeprowadziła powierzone jej zadania badawcze. Wykazała się umiejętnością prowadzenia badań naukowych w zakresie syntetycznej chemii organicznej i rozwiązała oryginalny problem naukowy, a mianowicie opracowała syntezę kilkudziesięciu nowych, biologicznie ważnych związków. Udowodniła zdobycie wiedzy i doświadczenia na tym etapie rozwoju młodego badacza. Warto tutaj podkreślić, że wyniki jej badań włączone zostały do czterech publikacji w czasopismach z listy JCR, co świadczy o jej umiejętności profesjonalnego prowadzenia badań naukowych i potwierdza jej osobiste zaangażowanie w te badania.

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony do oceny materiał spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Pauliny Pietrow do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Barbara Nawrot