

Prof. dr hab. Adam Prahl
Pracownia Chemii Biopolimerów
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 06.11.2015 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Malwiny Strenkowskiej pt. „Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do otrzymywania terapeutycznych mRNA: synteza, właściwości oraz przykładowe zastosowania”

Kwasy nukleinowe fascynowały i pochłaniały uwagę badaczy od dziesiątek lat. Nic w tym dziwnego, w nich bowiem zawarta jest informacja genetyczna żywych organizmów, one decydują, bezpośrednio lub pośrednio, o przynależności gatunkowej i ich prawidłowym funkcjonowaniu. Rozwój technik inżynierii genetycznej spowodował wzmożone zainteresowanie tą grupą związków, zwłaszcza w kontekście wykorzystania ich w celach terapeutycznych. Można w tym miejscu pokusić się o kilka przykładów tego typu zastosowań, najważniejszymi z nich wydają się być terapia genowa i immunoterapia przeciwnowotworowa. Oczywiście jak we wszystkich aplikacjach medycznych podstawowymi cechami terapii powinny być skuteczność i bezpieczeństwo, a gdyby dało się jeszcze zrobić to prosto i tanio... Najważniejsze aspekty jakie trzeba brać pod uwagę w tego typu działaniach to transfer materiału genetycznego do komórek pacjentów, zapewnienie mu odpowiedniej stabilności i skuteczność jego działania. Już wstępnie rozważając te trzy czynniki, kwasy rybonukleinowe, a w szczególności mRNA wydają się tutaj być idealnymi kandydatami na obiekty badań. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Malwiny Strenkowskiej poświęcona jest właśnie znalezieniu modyfikacji chemicznych w strukturze mRNA w celu zwiększenia stabilności biopolimeru i polepszenia jego potencjału farmakokinetycznego. Cel ten Doktorantka postanowiła osiągnąć poprzez wykorzystanie zmodyfikowanych chemicznie nukleotydów obecnych w dwóch regionach eukariotycznego mRNA, występujących na jego końcach, oznaczanych odpowiednio jako 5'-kap i ogon poli A.

Praca doktorska zrealizowana została w Zakładzie Biofizyki, Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką dr. hab. Jacka Jemielitego, prof. nadzw. UW. Opracowanie obejmuje 238 stron, podzielonych na 3 rozdziały, poprzedzone spisem treści, streszczeniem i wykazem najważniejszych skrótów i symboli. Pierwszą część pracy stanowi rozdział „Wstęp literaturowy” poświęcony przybliżeniu tematyki i przedmiotu badań. W rozdziale tym Doktorantka przedstawia charakterystykę kwasów nukleinowych i ich potencjalne wykorzystanie jako substancji leczniczych, zabiegi chemiczne jakie stosuje się w celu poprawienia stabilności i translacji mRNA oraz metody syntezy modyfikowanych chemicznie nukleotydów. Ta część pracy napisana jest dość starannie, a przedstawione informacje są znakomitym wprowadzeniem teoretycznym do dalszych części pracy.

Kolejny rozdział „Wyniki i dyskusja” jest najistotniejszy dla całej pracy. Zawiera on syntetyczny opis zadań, jakie Doktorantka stawia przed sobą i obrazuje to, co i jak zostało zaplanowane i wykonane w ramach realizacji badań. Całość zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów podzielić można na trzy podstawowe kategorie. Pierwsza dotyczy zabiegów dokonywanych w obrębie regionu 5'-kap, druga zabiegów w obrębie ogona poli A, natomiast trzecia dotyczy opracowania wydajnej metody syntezy nukleotydów modyfikowanych chemicznie w łańcuchu fosforanowym. Czynności związane z realizacją tych trzech podstawowych celów wzajemnie się przenikają i uzupełniają. W ten sposób zostały opracowane, cytując Doktorantkę, narzędzia molekularne w postaci zmodyfikowanych chemicznie nukleotydów do otrzymywania mRNA o potencjalnie zwiększonej stabilności i polepszonym potencjale translacyjnym oraz sama metodologia ich syntezy.

Jako najważniejsze osiągnięcia Doktorantki wymienić należy:

- opracowanie nowej metody syntezy nukleotydów chemicznie modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym;
- otrzymanie czterech nowych tetrafosforanowych analogów 5'-kapu, w strukturę których wprowadzono pojedynczą grupę tiofosforanową;
- otrzymanie pięciu nowych analogów 5'-kapu (dwóch w postaci pochodnych tri-, trzech tetrafosforanowych) modyfikowanych podwójnie grupą tiofosforanową;
- otrzymanie dwóch nowych nukleotydów modyfikowanych grupą tiofosforanową lub boranofosforanową i zbadanie ich inkorporacji do mRNA w obrębie ogona poli A;
- opracowanie, czy też dopracowanie metody syntezy i otrzymanie trinukleotydowych analogów 5'-kapu modyfikowanych pojedynczą grupą tiofosforanową.

Kolejność osiągnięć poczynawszy od pozycji drugiej ułożona została w oparciu o ilość uzyskanych na ich podstawie danych, intuicję recenzenta i entuzjazm Doktorantki zawarty w opisach. Pozycja pierwsza bezsprzecznie należy się opracowaniu pionierskiej metody syntezy nukleotydów użytecznych w modyfikowaniu cząsteczek RNA. W trakcie realizacji zadania opracowane zostały nowe reagenty użyteczne również w innych syntezach i precyzyjnie dobrane warunki reakcji w jakich ulegają one kolejnym przemianom. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na ogromną swobodę Doktorantki w pracy laboratoryjnej i biegłe operowanie zarówno technikami syntezy, jak i analizy otrzymanych pochodnych.

Dysponując otrzymanymi „narzędziami” Doktorantka wykonała szereg oznaczeń sprawdzając dany typ zastosowanej modyfikacji pod kątem jej wpływu na stabilność (degradację) i wydajność translacji mRNA uzyskując szereg ciekawych wyników, które z jednej strony okazały się osiągnięciem celu jaki został postawiony przed rozpoczęciem badań, z drugiej początkiem dalszych prac i wyjaśniania pojawiających się nowych problemów. Ponieważ praca z materiałem będącym przedmiotem badań Pani Malwiny nie należy do najłatwiejszych w trakcie realizacji zadań pojawiły się również i pewne niepowodzenia w postaci niskich wydajności niektórych procesów, czy też problemy z rozdzieleniem mieszanin diastereoizomerów powstających w trakcie syntez.

Po najobszerniejszym drugim rozdziale następuje rozdział trzeci „Część eksperymentalna” poświęcony krótkim opisom dotyczącym syntezy zaprojektowanych związków, wykonaniu analiz i badań biologicznych. W tej części znalazły się również (jako osobne podrozdziały) opis dorobku naukowego Kandydatki oraz bibliografia (spis liczy 178 pozycji obejmujących lata 1963-2014). Całość rozprawy opatrzona jest 81 rysunkami (w rzeczywistości jest ich dużo więcej, ale te zawarte w części trzeciej i przedstawiające struktury syntezowanych analogów nie są ponumerowane i wyszczególnione jako rysunki) i 23 tabelami.

Zaplanowane i przeprowadzone w ramach realizacji rozprawy doktorskiej badania charakteryzują się niezwykle wysokim poziomem naukowym – bezpośrednim dowodem na to są publikacje naukowe, będące efektem tych prac. Wspomniałem już wcześniej, iż pierwsza część dysertacji napisana jest raczej poprawnie, natomiast dwie pozostałe zawierają szereg różnych błędów edytorskich i niefortunnnych sformułowań będących również konsekwencją stosowania żargonów. Ma się wrażenie, że składanie całości obarczone było brakiem czasu na staranną korektę. Z racji obowiązku jaki spoczywa na recenzencie, chciałbym ten wątek jeszcze przez chwilę rozwinąć wskazując kilka przykładów różnych błędów.

W spisie treści tytuły poszczególnych, głównych podrozdziałów wymienione są zamiennie bezpośrednio po kropce lub z zachowanym odstępem, formatowanie zawartości jest niekonsekwentne. Tendencja ta powtarza się również w dalszej części pracy.

Błędy interpunkcyjne – głównie dość swobodne pomijanie przecinków (nawet przed spójnikami „że” i „który”) jest dość częste. Kolejny element to literówki: „hamaglutynina” na str. 23, nazwisko „Yoshikawa” napisane z małej litery na str. 87, „To Zdecydowanie...” na str. 162, oraz łącznie lub rozłącznie pisane wyrazy: „tak że” na str. 29, „cosprzyja” na str. 88, „nie opisanym” jako przymiotnik na str. 88, „doczynienia” na str. 102, „SP6stosując” str. 104, „działaniaDcp2” na str. 131.

Niefortunne sformułowania zdarzają się równie często. Oto kilka przykładów: „...wymagających rechromatografii” – str. 84; „Wszystkie analogi...poddano charakteryzacji...” – str. 98, „...w zależności od miejsca umiejscowienia modyfikacji...” – str. 102; „Jednakże, badania podatności mRNA na dekaping za pomocą Dcp2 wykazały jednak, że pojedyncza modyfikacja...”; „Mimo niskiej szybkości wydajność reakcji była wysoka...” – str. 122. Na szczególną uwagę zasługują tutaj „odbezpieczenie” jako kalka językowa w znaczeniu usunięcia osłony oraz „rozcieńczenie reakcji” i „dodanie do reakcji”. W pierwszym przypadku lepiej użyć po prostu odblokowanie lub uwolnienie grupy funkcyjnej i ze zdecydowanym naciskiem, że grupy funkcyjnej a nie osłony (taka interpretacja również znalazła się w pracy). Nie wiem dlaczego, ale mam wrażenie, że im częściej zwracam uwagę na ten właśnie element związany z zakładaniem i usuwaniem osłon (również w chemii peptydów, z którą stykam się codzienne), tym częściej błąd wraca do mnie w różnych opracowaniach. W drugim przypadku chodzi oczywiście o rozcieńczenie i dodanie np. mieszaniny reakcyjnej i do mieszaniny reakcyjnej.

Szata graficzna opracowania jest na wysokim poziomie, zamieszczone rysunki, schematy i tabele są przygotowane bardzo starannie. Jedyną wpadką, jaką zauważyłem to tabela nr 11 na str. 120. Na tej stronie w tekście znajdują się również odsyłacze do treści zawartych w tabeli, ale w nawiasach zabrakło jej numeru.

W całym tekście znalazłem także wiele zdań, które napisałbym zupełnie inaczej stylistycznie, jednak styl Doktorantki jest stosowany konsekwentnie w całej pracy i z racji braku kwalifikacji językowych na odpowiednim poziomie, nie chcę poddawać ich dyskusji.

Wszystkie wymienione powyżej niedociągnięcia dotyczą strony edytorskiej i w żaden sposób nie mają wpływu na jakość przedstawionych w pracy badań. To, że zostały wytknięte ma na celu uświadomienie Kandydatce do stopnia doktora, że czasami warto zwrócić również uwagę na formę prezentacji wyników prac. W tym miejscu chciałbym również pochwalić Panią Malwinę za to, że zdecydowała się na przedstawienie rozprawy w formie klasycznej, rezygnując z tzw. „spinki” publikacji naukowych opatrzonych krótkim opisem. Taka wersja, dopuszczona ustawowo, byłaby dużo łatwiejsza w przygotowaniu i obarczona dużo mniejszym ryzykiem popełnienia błędów, które pozwoliłem sobie przytoczyć powyżej. Mam również pewne pytania i wątpliwości dotyczące wykorzystania HPLC do oczyszczania i identyfikacji produktów syntez, pozwolę sobie jednak pozostawić to do dyskusji w trakcie samej obrony.

Oprócz wymienionych wyżej braków i słabych stron dysertacji trzeba zauważyć i docenić ogrom pracy i wysiłku włożony przez Doktorantkę w jej powstanie. Prace łączące badania z zakresu różnych dziedzin nie należą do prostych i wymagają szerokiej i różnorodnej wiedzy. Takimi umiejętnościami wykazała się w trakcie realizacji kolejnych zadań mgr Malwina Strenkowska. Uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej wyniki wnoszą wiele nowych informacji dotyczących zarówno wpływu chemicznej modyfikacji struktury wybranych do badań nukleotydów na stabilność i poziom translacji mRNA, jak i informacji dotyczących procedur samych syntez. Docenić należy, że w trakcie realizacji prac opracowane zostały pionierskie ścieżki syntezy modyfikowanych nukleotydów nieopisane do tej pory w literaturze.

Dorobek naukowy mgr Malwiny Strenkowskiej to cztery publikacje w recenzowanych czasopismach naukowym z listy JCR (kolejna praca znajduje na etapie przygotowania) oraz siedem komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych (jeden z nich to wystąpienie ustne). Zdecydowaną większość (aż sześć) stanowią konferencje międzynarodowe. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, iż publikowane i prezentowane wyniki odnoszą się bezpośrednio do efektów eksperymentów wchodzących w skład recenzowanej pracy.

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr Malwiny Strenkowskiej spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 17 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania Jej stopnia naukowego

doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Malwiny Strenkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka jakość badań obejmujących rozprawę, pokaźny dorobek naukowy Doktorantki (wyrażony i ilością, i jakością publikacji naukowych) oraz umiejętności jakimi wykazała się w trakcie realizacji prac, skłania mnie również do wystąpienia z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Adam Prahl