

2017 -09- 19 *JB*

POLSKA AKADEMIA NAUK



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 0 61 852 85 03, sekretariat 0 61 852 89 19
fax: 0 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327
NIP 777-00-02-062

Dr hab. Marcin K. Chmielewski, prof. nadzw. IBCh PAN

Poznań, 16.08.2017

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

Ul. Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Waszczuk

pt. "Syntetyczne analogi trimetyloguanozyno kapu modyfikowane w mostku trifosforanowym jako narzędzia do badania snurportyny i optymalizacji sygnału transportu dojądrowego dla czynników terapeutycznych"

Przedstawiona do recenzji dysertacja Pani mgr Małgorzaty Waszczuk została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Jacka Jemielitego przy wsparciu promotora pomocniczego dr hab. Anny Niedźwieckiej.

Celem opisanych w rozprawie prac badawczych było zaprojektowanie i przeprowadzenie chemicznej syntezy nienaturalnych analogów trimetyloguanozynowego kapu (skrót: TMG kap) posiadających chemiczną modyfikację w obrębie mostka 5'-5' trifosforanowego. Ponieważ autorka dysertacji podejrzewała, że niektóre z otrzymanych modyfikacji mogą mieć istotny wpływ na biologiczne procesy regulowane przez TMG kap, dlatego po zakończeniu części syntetycznej przeprowadziła badania powinowactwa tych analogów do snurportyny (ang. Snurportin 1). Snurportyna jest białkiem adaptującym, pośredniczącym w aktywnym transporcie jądrowym małych jądrowych RNA bogatych w urydynę (U snRNA). Dzięki obecności sześciu cząsteczek tryptofanu (Trp) snurportyna posiada właściwości fluorescencyjne, które ulegają wygaszeniu podczas oddziaływania z ligandem, co jest wykorzystywane w technice pomiarowej. Właściwości te pozwoliły doktorantce na podjęcie badań w kierunku wyznaczenia stałych asocjacji oraz określenia zależności pomiędzy

wewnątrzcząsteczkowym oddziaływaniem warstwowym modyfikowanych analogów TMG kap-u z snurportyną. Celem tych badań było określenie, który z otrzymanych analogów posiada zwiększone powinowactwo do snuroptyny oraz podwyższoną odporności na degradację, co stanowi potencjalne narzędzie terapeutyczne.

Określenie czy nowe związki posiadają potencjalne właściwości biologiczne lub terapeutyczne jest obecnie kluczową przesłanką do podjęcia prac koncepcyjnych nad opracowaniem metody ich chemicznej syntezy. Przeprowadzenie wieloetapowej syntezy chemicznej pozwoliło na otrzymanie nowych analogów TMG kap-u o unikalnych właściwościach oraz poszerzyło umiejętności syntetyczne eksperymentatora.

Podjęte przez doktorantkę badania w kierunku syntezy nowych analogów TMG kap-u oraz określenie ich potencjalnego efektu terapeutycznego uważam za jak najbardziej uprawnione i pożądane. Było to jednak zadanie trudne i bardzo pracochłonne, z którym doktorantka poradziła sobie doskonale, wykazując się umiejętnościami i wiedzą w zakresie syntezy organicznej oraz znajomości technik instrumentalnej analizy chemicznej. Nie bez znaczenia jest też umiejętność prawidłowej analizy danych eksperymentalnych i formułowanie prawidłowych wniosków.

Rozprawa doktorska na 153 stronach zawiera typowe dla tego typu opracowań części: wstęp, abstrakt w języku angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis treści, część literaturową, cel pracy, przedstawienie badań własnych i dyskusję wyników, część eksperymentalną, podsumowanie, bibliografię (która zawiera 164 pozycje), oraz nie ujęty w spisie treści spis rysunków i tabel. Praca została przygotowana z najwyższą starannością, o czym świadczy wysoka estetyka prezentacji oraz dbałość o detale. Dzięki przejrzystości poruszanie się po rozprawie nie sprawia dużych problemów, a jedynym dostrzeżonym przez recenzenta mankamentem jest fakt, że cel pracy powinien być umieszczony na początku całej rozprawy. Pozwoliłoby to na łatwe i szybkie zorientowanie się w kierunku prowadzonych prac oraz szybkie weryfikowanie postawionych w nim hipotez oraz celów naukowych.

Część literaturowa wprowadza czytelnika w tematykę związaną z nietypowymi strukturami końca 5' RNA czyli cząsteczki tzw. kap-u. Struktura kap-u składa się z rzadkiego nukleozydu jakim jest 7-metyloguanozyna przyłączonego, również nietypowym dla kwasów nukleinowych, mostkiem 5',5'-trifosforanowym do końca 5' łańcucha RNA. W kolejnych rozdziałach opracowania doktorantka w zwięzły sposób przedstawia szlak biosyntezy TMG kap-u, a wraz z nimi przegląd najważniejszych procesów biologicznych, w których TMG kapy są zaangażowane. W interesujący sposób przedstawiono rolę syntetycznych analogów kap-u w transporcie terapeutycznych oligonukleotydów. W dalszej części omówiona jest metodyka chemicznej syntezy TMG kap-u, która podzielona jest na 5 etapów. Autorka

omawia również ważne z punktu widzenia tematu dysertacji podejścia syntetyczne pozwalające modyfikować mostek 5'-5' trifosforanowy za pomocą ugrupowania metylenowego i amidowego. Ciekawą częścią tego przeglądu literaturowego jest omówienie metod syntezy borofosforanów. Część literaturową kończy rozdział o spektroskopii biomolekuł, co jest istotnym elementem w kontekście uzasadnienia podjętej tematyki badawczej. W części literaturowej dopatrzyłem się kilku błędów merytorycznych.

Np. strona 33 użycie stwierdzenia „*Nukleozydy także są chiralne*” w omawianym kontekście jest niejasne. Nukleozydy są cząsteczkami posiadającymi kilka centrów chiralnych jednakże w praktyce stosuje się jeden diastereoizomer. *Nukleozydy posiadają jedną określoną konfigurację, a wprowadzenie kolejnego centrum symetrii powoduje powstanie mieszaniny dwóch diastereoizomerów.*

Również stwierdzenie: „*Enzymy mają zdolność rozróżniania substratów, w zależności od ich konfiguracji absolutnej*” jest niepoprawne gdyż konfiguracja absolutna jest teoretyczną konwencją oznaczenia przestrzennego ułożenia podstawników, a enzymy rozróżniają diastereoizomery lub enancjomery o konkretnej konfiguracji.

Na stronie 25 niewłaściwie określono funkcję odczynnika BDCP, który jest odczynnikiem chlorującym, a nie tak jak autorka wskazuje odczynnikiem fosfitylującym. Również wzór strukturalny odczynnika BDCP na rys 1.27 jest niepoprawny.

Na tym etapie oceny chciałbym poprosić doktorantkę o

1. wyjaśnienie mechanizmu działania BDCP użytego w reakcji chlorowania diestru fosforanowego.
2. W rozdziale 1.2.2 doktorantka omawia metodę fosforylacji nukleozydów za pomocą trichlorku fosforu oraz jego wysoką regioselektywność. Bardzo proszę o omówienie innych znanych metod fosforylacji stosowanych w chemii nukleozydów.

Dyskusja Wyników poprzedzona jest krótkim, ale precyzyjnym opisem celu pracy doktorskiej. Cel został jasno zdefiniowany i dotyczy opracowania i przeprowadzenia chemicznej syntezy nowych analogów TMG kapu, które zachowałyby wysokie powinowactwo do snurportyny oraz uzyskały zwiększoną odporność na degradację. Dodatkowo określono cele pośrednie z zakresu syntezy oraz cele biofizyczne, których realizacja pozwoli na osiągnięcie celu głównego pracy. W ramach badań własnych Pani mgr Waszczuk przeprowadziła syntezę 13 modyfikowanych analogów TMG kap-u. Modyfikacja polegała na zamianie atomu tlenu pomiędzy atomami fosforu α i β oraz β i γ , na mostek metylenowy (związki 4, 5 i 6), mostek amidowy (związki 7 i 8) oraz zamianie atomu tlenu na grupę boranową przy atomie fosforu β

(związki 11a i 11b) oraz na atom siarki przy atomie fosforu α (związki 9a i 9b) i atomie fosforu β (związki 10a i 10b). Przeprowadziła również syntezę dwóch niemodyfikowanych analogów TMG kap-u (związki 1 i 2), które posłużyły jako związki referencyjne oraz analogu o wydłużonym łańcuchu do 4 atomów fosforu. Dwie ostatnie modyfikacje polegały na wprowadzeniu w pozycji 2' nukleozydu grupy antranilowej (związek 12) i N-metyloantranilowej (związek 13), które będą pełnić rolę znacznika fluorescencyjnego umożliwiającego monitorowanie TMG kap-u bądź RNA zawierającego kap w układach biologicznych. Wszystkie produkty syntezy chemicznej zostały prawidłowo zidentyfikowane za pomocą analizy NMR, a ich masa potwierdzona w analizie masowej. W dalszej części doktorantka omawia kolejne etapy chemicznej syntezy analogów TMG-kap-u.

Badania własne i dyskusja wyników zostały zilustrowane dużą ilością grafiki, na którą składa się: 8 tabel, 6 schematów przedstawiających struktury i modele chemiczne, 12 schematów przeprowadzonych reakcji chemicznych, 4 schematy obrazujące wykonane analizy HPLC, 2 rysunki obrazujące analizę widm NMR, 27 rysunków widm adsorpcyjno-emisyjnych i fluorescencyjnych oraz 2 rysunki ukazujące stabilność biologiczną analogów. Sposób prezentacji wyników pokazuje, że doktorantka potrafi zaplanować i wykonać syntezę chemiczną analogów TMG kapu oraz przeprowadzić charakterystykę spektralną otrzymanych preparatów. Badania biofizyczne jak również badanie oddziaływań z snurportyną pokazują, że doktorantka opanowała praktyczną wiedzę z zakresu chemii instrumentalnej i potrafi wyciągać logiczne wnioski z uzyskanych wyników eksperymentalnych. W tym miejscu należy docenić wysiłek, jaki doktorantka włożyła w analizy fluorescencyjne, które były podstawowym narzędziem w ocenie przydatności syntetycznych analogów TMG kap-u.

Pani mgr Małgorzata Waszczuk jest współautorem czterech artykułów naukowych dwóch indeksowanych (Organic & Biomolecular Chemistry IF=3,235, cyt. 8; Bioorganic & Medicinal Chemistry IF=2.88, cyt. 7) oraz dwóch komunikatów konferencyjnych. Pani Waszczuk (z d. Zytek) w trzech opracowaniach występuje, jako pierwszy wiodący autor.

Nie znalazłem natomiast żadnych informacji dotyczących podjęcia prób ochrony praw własności w postaci zgłoszeń patentowych w omawianym zakresie merytorycznym. W świetle potencjalnego zastosowania biologicznego syntetyzowanych analogów TMG kap-u uważam, za zasadne podjęcie kroków w celu uzyskania ochrony prawnej opracowanych rozwiązań.

Na tym etapie oceny proszę o odpowiedź na następujące pytania:

1. Proszę o wyjaśnienie, czy doktorantka wykonywała analizę czystości patentowej i dlaczego nie podjęto ochrony własności *know-how* uzyskanych wyników przed opublikowaniem?

2. Na stronie 80 doktorantka opisuje wyznaczanie wartości pK_a za pomocą metody dopasowywania krzywej na widmie fluorescencyjnej w zmiennym pH. Dlaczego autorka nie zdecydowała się na pomiar pK_a metodami eksperymentalnymi (np. miareczkowaniem)? Stwierdzenie, że wyniki są zgodne z danymi literaturowymi nie jest podparte odnośnikiem. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób wykonano dopasowanie krzywej?

Podjęta tematyka, jak również zakres wykonanych prac syntetycznych i analitycznych zaprezentowanych w dysertacji pozwala mi stwierdzić, że Pani mgr Małgorzata Waszczuk w pełni osiągnęła poziom naukowy wymagany do uzyskania tytułu naukowego doktora nauk chemicznych. Po lekturze rozprawy doktorskiej jestem przekonany, że jest ona sprawnym eksperymentatorem dobrze poruszającym się w zagadnieniach zaawansowanej chemii organicznej oraz osobą, która potrafi stawiać hipotezy naukowe oraz rozwiązywać postawione przez nią zadania.

Za najważniejsze oryginalne osiągnięcia naukowe Autorki uznaję:

1. opracowanie i przeprowadzenie chemicznej syntezy 13 nowych związków będących analogami kap-u o potencjale biologicznym (związki **1-13**),
2. wyznaczenie stałej asocjacji otrzymanych analogów z snurportyny na podstawie miareczkowania fluorescencyjnego,
3. określenie zależności wiązania snurportyny od tworzenia oddziaływań warstwowych, co wykazano porównując zmniejszającą się intensywność fluorescencji do stałej asocjacji.

Na zakończenie recenzji, spełniając obowiązek recenzenta, chciałbym zwrócić doktorantce uwagę na błędy merytoryczne oraz edytorskie poczynione w rozprawie doktorskiej, poniżej wymieniam tylko te najpoważniejsze. Nie wpływają one w żaden sposób na pozytywną ocenę pracy, ale mają tylko charakter uwag korekcyjnych:

1. W definicji skrótów i w pracy doktorantka stosuje symbol A dla adeniny i adenozyiny i G dla guaniny i guanozyiny. Prawidłowo stosuje się Ade dla adeniny i A dla Adenozyiny Gua dla guaniny a G dla guanozyiny. Do oznaczenia Guaniny autorka stosuje symbol Guo (strona 57) lub symbol Gua (strona 47) lub G (strona 75). Symbol Guo jest również stosowany do oznaczenia guanozyiny (strona 46, 103). m^7G jest zamiennie używane z m^7guo (np. strona 46 i odwrotnie na stronie 47). Należy ujednolicić symbole i umieścić jednolitą wersję w wykazie skrótów.

2. Na stronie 57 we wzorze na rysunku 3.1 w pozycji 3' i 2' powinny być podstawniki R1 i R2, tak aby korespondowało to z tabelką 3.1
3. Uważam, że część pracy *badania własne i dyskusja wyników* powinny być opisane w pierwszej osobie, gdyż opisuje czynności prowadzone przez autorkę. Natomiast tylko *część eksperymentalna* w stronie biernej.
4. Numeracja związków jest chaotyczna i bardzo trudno zorientować się, jaki związek jest aktualnie omawiany. Związki powinny być numerowane po kolei. Podobnie w części eksperymentalnej, preparatyka nie jest opisana według kolejności numeracji związków. Substraty stosowane w syntezie mają wyższe numery niż otrzymane produkty.
5. W opisach eksperymentalnych należy stosować numery poszczególnych związków. Autorka stosuje nazwy np. związek np. strona 108 lub nazwy literowe $m^3_{2,2,7}$ strona 109. Opisy powinny być ujednolicone.
6. Na stronie 64 jest opis: „*produkt 30 otrzymano w postaci brązowego oleju a nie w postaci białego proszku*”, czyli ciała stałego. Może związek nie został odpowiednio oczyszczony? Niestety w części eksperymentalnej brak preparatyki, aby to stwierdzenie zweryfikować.
7. Na stronie 67 autorka stwierdza, że dodatek lutydyny jest problemem podczas rozdziału chromatograficznego bo wiąże się ze złożem. Należałoby napisać więcej na temat konsekwencji i sposobu tego wiązania.
8. Strona 67 nie kwaśne pH, raczej kwasowe pH.
9. Na stronie 71 jest stwierdzenie „*ciekawe właściwości atomu boru*” należy napisać dokładniej, jakie?
10. Na stronie 100 jest stwierdzenie że „*(kap-y) są degradowane przez różne nukleazy*” należy dopisać jakie.
11. Na stronie 103 w opisie techniki HPLC są określenia układów gradientowych jako : słaby, standardowy i mocny. Z opisu wynika, że układy gradientowe różnią się tylko czasem, natomiast nie ma innej informacji na temat zmiany stężeń. Prawdopodobnie autorka miała na myśli zwiększające się stężenie metanolu, co przełożyła na określenie słaby i mocny. Prostym sposobem opisu różnicy w gradientach jest podanie parametru zmiany % metanolu w jednostce czasu.

W świetle wykonanej przeze mnie recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Waszczuk, spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym*. Należy zaznaczyć, że została przygotowywana pod opieką promotora oraz promotora pomocniczego, i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie chemicznej syntezy nowych analogów TMG kap-u oraz zawiera oryginalne badania trwałości powstałych kompleksów z aktywnym białkiem komórkowym (snurportyną). Kandydatka zaprezentowała szeroką wiedzę teoretyczną i praktyczną w dziedzinie chemii organicznej oraz w zakresie analizy fizykochemicznych właściwości otrzymanych związków. Wszystkie otrzymane wyniki zostały poprawnie udokumentowane oraz zaprezentowane w rozprawie doktorskiej. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



dr hab. Marcin K. Chmielewski