



**Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Dział Chemii Bioorganicznej,
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź**

Dr hab. Piotr Guga,
tel: 42-6803248;
e-mail: pguga@cbmm.lodz.pl

Łódź, 17.12.2018r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Ciechanowicz
zatytułowanej „Analogi kapu zawierające ugrupowanie triazolowe w łańcuchu fosforanowym –
synteza, wbudowywanie do RNA oraz badania wpływu modyfikacji na funkcje końca 5' mRNA”**

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska mgr Sylwii Ciechanowicz jest elementem dorobku Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, a została wykonana w ramach międzywydziałowych interdyscyplinarnych studiów doktoranckich w zakresie matematyczno-przyrodniczym pod kierunkiem dr. hab. Jacka Jemielitego w Centrum Nowych Technologii UW oraz prof. dr. hab. Andrzeja Dziembowskiego w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii UW. Zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595) „*Rozprawa doktorska, przygotowywana pod opieką promotora, powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub artystycznego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej lub artystycznej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej.*”, zatem moja opinia dotyczy tych właśnie aspektów dysertacji.

Rozprawa opisuje syntezę ponad 40 związków nukleotydowych zawierających cząsteczkę triazolu w obrębie łańcucha polifosforanowego, a będących analogami struktury, której angielska nazwa to *cap*. Doktorantka stosuje spolszczoną nazwę „kap” i jej formy deklinacyjne (kapu, z kapem, później jest też „kaping”), i chociaż wiem, że przygotowała rozprawę w ośrodku o ogromnych w skali światowej zasługach dla rozwoju tej dziedziny wiedzy, to już na wstępie recenzji pozwolę sobie stwierdzić, że preferowałbym stosowanie bardziej sympatycznie brzmiącej (przynajmniej dla mnie) nazwy „*czapeczka*”, ewentualnie *kapturek*. Ale oczywiście, niezależnie od użytego terminu, praca dotyczy struktury obecnej na 5' końcu cząsteczek mRNA, która bierze udział w najważniejszych procesach związanych z metabolizmem RNA. Ponieważ procesy enzymatycznej degradacji mRNA zaczynają się od jej odcięcia, zaczęto poszukiwać takich chemicznych modyfikacji, które czyniłyby cząsteczki mRNA bardziej odpornymi na działanie enzymów hydrolitycznych, a jednocześnie nie pogorszyły ich powinowactwa do czynnika inicjującego translację. Waga tego zagadnienia nie podlega dyskusji, ponieważ od wielu lat w obszarze chemii, biochemii i biologii molekularnej prowadzone są badania nad syntezą modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i kwasów

nukleinowych (czasem dość słabo przypominających występujące w przyrodzie pierwowzory), które w zamierzeniu twórców mają umożliwić sterowanie procesami biologicznymi. Wśród tych biologicznych celów regulacja ekspresji genów jest zapewne hasłem najczęściej rozpoznawanym przez statystycznego Kowalskiego, co nie znaczy, że hasło to jest równie szeroko rozumiane. Celem projektu doktoranckiego było (tu zacytuję) *sprawdzenie, czy jedna z najpopularniejszych obecnie strategii syntetycznych, jaką jest chemia „click”, może stanowić alternatywną metodę syntezy funkcjonalnych mimików struktury końca 5' mRNA*. Wprawdzie według Słownika Języka Polskiego pod redakcją W. Doroszewskiego, a także według słownika PWN, mimik to człowiek wyszkolony w mimice, potrafiący wyrażać uczucia i myśli przy pomocy ruchu mięśni twarzy, to jednak rozprawa nie dotyczy tworzenia tak uzdolnionych przedstawicieli rodzaju ludzkiego. Jej celem było sprawdzenie, czy szeroko obecnie stosowana metoda syntezy oparta na cykloaddycji cząsteczek zawierających ugrupowanie azydowe i alkinowe może być zastosowana do (praktycznie nieograniczonego) wzbogacania biblioteki modyfikowanych *czapeczek*. Część literaturowa rozprawy (ponad pięćdziesięciostronicowa) jest dość heterogeniczna i obejmuje dotyczące *czapeczki* wątki biologiczny (struktura, najważniejsze właściwości oraz funkcje biologiczne), oraz chemiczny (metody syntezy i modyfikacje chemiczne) i terapeutyczny, a także rozdział dotyczący ogólnych zasad chemii typu „click” i jej zastosowań w modyfikacji nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych. Oczywiście nie ma sensu spierać się o dobór wątków, bo jest to sprawa osobistego stosunku Autorki do tego ogromnego obszaru poszukiwań i dokonań, zwłaszcza, że praca powstała w ramach interdyscyplinarnych studiów doktoranckich w zakresie matematyczno-przyrodniczym. O kilku usterkach będę pisał nieco dalej, natomiast w tym miejscu ograniczę się do stwierdzenia, że rozdział czytałem z przyjemnością, bo jest napisany w przemyślany i usystematyzowany sposób i świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki.

W pracy obecne są wątki syntetyczny, fizykochemiczny (wyznaczanie stałych asocjacji otrzymanych związków z białkami) i biochemiczny. We wszystkich trzech Doktorantka wykonała dużą pracę i chociaż nie udało się uzyskać związków o ponadprzeciętnych właściwościach biologicznych (w tym obszarze badań jest to raczej reguła) to wyniki zebrane dla nowych analogów *czapeczki*, dotychczas nie opisanych w literaturze, poszerzyły naszą wiedzę, a to jest przecież istotą badań podstawowych. Podkreślić należy opracowanie nowatorskiej post-transkrypcyjnej metody przyłączania nowych analogów *czapeczki* na 5' końcu RNA z wykorzystaniem chemii typu „click”. Podczas realizacji zadania badawczego wykonane zostały szeroko zakrojone badania biologiczne. Przypnę, że ponieważ jestem chemikiem syntetykiem (aczkolwiek pracującym w chemii kwasów nukleinowych) to ten obszar wiedzy jest mi mniej znany. Na szczęście Doktorantka ułatwiła mi zapoznanie się z tą częścią rozprawy stosując logiczną i przemyślaną narrację.

Podsumowując osiągnięcia Doktorantki mogę stwierdzić, iż mgr Sylwia Ciechanowicz wykonała zadanie badawcze przed nią stojące, jednocześnie budując dający powody do dumy dorobek publikacyjny, obejmujący również prace, które przyjęły ostateczny kształt po zamknięciu dysertacji.

W moim przekonaniu wypełnienie pozostałych wymagań ustawowych dotyczących ogólnej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej również nie budzi zastrzeżeń.

Powyższe stwierdzenia jednoznacznie wskazują, jaki będzie końcowy wniosek recenzji, ale zanim do niego dojdę chciałbym podzielić się kilkoma uwagami krytycznymi, jakie nasunęły mi się podczas lektury. Jak w każdym dziele o dużej objętości, w przedłożonej rozprawie (liczącej ponad 170 stron) można znaleźć błędy redaktorskie, jak błędy literowe, składniowe i interpunkcyjne, lub wyrażenia zbyt mocno osadzone w żargonie albo skróty myślowe prowadzące czasem do zaskakujących efektów. Te sprawy zatem pomijam, chociaż określenia „aktywności enzymatyczne potrzebne do syntezy kapu są konserwowane u Eukariontów” (str. 19), „Degradacja mRNA może zachodzić na różnych etapach jego życia” (str. 22), lub informacje, że „niemałą labilność wykazuje proton przy węglu C8” (str. 25) a mieszaninę reakcyjną mieszano przez xxx godzin (str. 136) nie brzmią dobrze. Termin „boranofosforanowy” jest wprawdzie szeroko stosowany w literaturze polskojęzycznej, ale angielskie słowo *boranophosphate* oddaje obecność grupy borowodorowej a nie boranowej, natomiast o „wodzie miliporowej” (str. 117) dotychczas nie słyszałem. Takich uchybień jest trochę więcej (np. 2,2'-ditiopirydyna, str. 73 i 120; „reakcję mieszano” str. 124 i 125), ale skupię się na kilku elementach, które są na tyle dyskusyjne, iż oczekiwałbym komentarza ze strony Doktorantki. Pozwalam sobie wypisać je w kilku punktach.

1. Autorka podaje na stronie 107, że w widmach ^1H NMR analogów typu 1 i 2 obserwuje się sygnały świadczące o silnym efekcie odsłaniającym pierścienia triazolowego dla protonów $\text{H5}'$ i $\text{H5}''$ znajdujących się przy atomie węgla bezpośrednio z nim połączonym. I dalej, że „Różnica w przesunięciach takich protonów $\text{H5}'$ i $\text{H5}''$ w stosunku do protonów $\text{H5}'$ i $\text{H5}''$ przy atomie węgla bezpośrednio połączonym z resztą fosforanową wynosi aż kilkadziesiąt ppm.” Przyznaję, że przesunięcia chemiczne jąder atomów wodoru (wbrew pozorom $\text{H5}'$ i $\text{H5}''$ to nie są protony) w znanych mi „typowych” związkach nie wymagają skali obejmującej kilkadziesiąt ppm, a co najwyżej piętnaście. Znane są wprawdzie zmiany przesunięcia chemicznego w widmach ^1H NMR wywołane obecnością metalu przejściowego sięgające nawet 600 ppm, ale to na pewno nie jest taki przypadek. W tym miejscu muszę niestety stwierdzić, że jakość reprodukowanych w dysertacji widm NMR jest niezadowalająca i nie spełnia wymogów rozprawy naukowej, dlatego proszę o wyjaśnienie tej kwestii podczas publicznej obrony.
2. Na str. 119 Autorka stwierdza, że ilości uzyskanych produktów nukleotydowych będzie wyrażała w milijednostkach optycznych (mOD) „będących odpowiednikiem iloczynu objętości roztworu danego związku i absorbancji tego roztworu”. Pierwsze pytanie, to dlaczego „milijednostki”, a nie powszechnie stosowane „jednostki” oznaczane jako OD, ewentualnie OD_{260} ? Może się tu zdarzyć konfuzja, ponieważ nieobyty z tą metodą liczenia czytelnik uzna, że np. 5184 mOD otrzymanego związku **9a** to 5,18 OD powszechnie stosowanych, co oznacza

poniżej 0,5 mikromola materii (1 mikromol pochodnej guanozyny to ok. 12 OD). Zrobienie widma ^{31}P NMR z 0,5 mikromola związku fosforoorganicznego jest możliwe, ale mocno uciążliwe. Teraz pytanie drugie. Absorbancja, najczęściej definiowana jest jako logarytm dziesiętny odwrotności transmitancji ($A = \log(1/T)$), chociaż tak naprawdę rozwiązaniem odpowiedniej całki jest logarytm naturalny. Niezależnie od podstawy użytego logarytmu absorbancja jest wielkością bezwymiarową, więc pomnożona przez litry da nam wynik w litrach. Pan Przemysław Wanat w swojej pracy licencjackiej z czerwca 2012 roku definiuje, że chodzi o objętość podaną w ml, więc wynik będzie ewentualnie w mililitrach. Czy to jest właściwa miara ilości nukleotydu?

3. Opis metodyki pomiarów NMR jest niezwykle skromny. Nie podano zakresów przemiatania ani alokowanej dla pomiaru wielkości pamięci, zatem nie można określić rozdzielczości widma (Hz/Pt). Nie podano liczby pojedynczych eksperymentów (skanów), ani też sposobu obróbki widm (poszerzenie liniowe czy Gaussowskie, krotność uzupełniania FID-u zerami, etc.). Oczywiście bez tych parametrów można wykonywać pewne analizy danych, ale fakt że widma ^{31}P NMR wykonano bez szerokopasmowego odsprzęgania jąder atomów wodoru jest zaskakujący i ważny, a nie został zadeklarowany w pracy. Podejrzanie braku odsprzęgania powziąłem po stwierdzeniu w opisach widm ^{31}P NMR wartości sprzężeń spinowo-spinowych atomów fosforu z atomami wodoru obecnymi w pozycji 5' nukleozydu (z wyjątkiem związku **4f**, gdzie jest podane tylko sprzężenie pomiędzy atomami fosforu) oraz z atomami wodoru w łącznikach węglowodorowych. W dyskusji wyników brak jest uzasadnienia dla takiego postępowania, które samo w sobie utrudnia wykonanie pomiaru, bo *BB decoupling* znacząco zwiększa jego czułość. Poza tym, brak odsprzęgania prowadzi do rejestrowania skomplikowanych multipletów, np. dla jedynego atomu fosforu w związku **8a**.
4. W widmie ^{31}P NMR związku **14a** znaleziono stałą sprzężenia pomiędzy atomami fosforu o wartości 25,1 Hz. Natomiast w związku **14c** o bardzo zbliżonej budowie analogiczna stała sprzężenia ma wartość jedynie 2,5 Hz. Czy istnieje wytłumaczenie dla tak znaczącej różnicy?
5. Na stronie 124 opisana jest ogólna procedura otrzymywania dinukleotydowych analogów typu 1 i 2. Proszę o wyjaśnienie mojego błędu w rozumowaniu, bo skoro alkin stosowany jest w stężeniu 0,2-1,0 M i 3 eq. związków z ugrupowaniem azydowym występują w stężeniu końcowym z przedziału 0,6-3,0 M (co jest jak najbardziej sensowne), to dlaczego 0,2 eq. CuSO_4 może osiągać stężenie 0,5-6,0 M, a 0,4 eq. askorbinianu sodu to już 1-12 M. Poza tym, czy roztwór askorbinianu sodu rzeczywiście może osiągnąć 12 M stężenie, bo przy masie cz. 198 g/mol stężenie 10 M to już prawie 2000g/litr.

Ufam, że powyższy spis usterek świadczy głównie o pewnej niedostatecznej dozie skrupulatności w redagowaniu pracy i że odpowiednie widma NMR (wzmiankowane w pkt. 3-4) zostaną zaprezentowane podczas publicznej obrony i uczynią moje wątpliwości bezprzedmiotowymi. Zakładając że tak się stanie mogę stwierdzić, że cel naukowy rozprawy został przez mgr Sylwię

Ciechanowicz osiągnięty i **rozprawa spełnia wymogi ustawowe**. Przedstawiona w dysertacji praca syntetyczno-analityczna i badania biochemiczne wymagały szerokiej wiedzy, wytrwałości i zaangażowania. Dowodzą, że Doktorantka jest gotowa do dalszej kariery zawodowej. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Sylwii Ciechanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'P. Gajda', is positioned in the center of the page.