

Poznań, 25 listopada 2018 r.

DZIEKANAT WYDZIAŁU FIZYKI
WPŁYNĘŁO

2018 -11- 30 J.B. J.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Sylwii Ciechanowicz

pt:

***Analogi kapu zawierające ugrupowania triazolowe w łańcuchu fosforanowym
- synteza, wbudowywanie do RNA oraz badania wpływu modyfikacji
na funkcje końca 5' mRNA***

Praca doktorska mgr Sylwii Ciechanowicz powstała w zespole dr hab. Jacka Jemielitego, w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz grupie badawczej profesora Andrzeja Dziembowskiego, w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Pierwsza część rozprawy doktorskiej, dotycząca chemicznej syntezy analogów kapu powstała w zespole dr hab. Jacka Jemielitego, a ich właściwości biologiczne badane były pod kierunkiem profesora Andrzeja Dziembowskiego. Jest to przykładem dobrej synergii badawczej dwóch grup, z których każda posiada duże doświadczenie w swojej dziedzinie.

Praca doktorska posiada klasyczny układ i składa się z wszystkich części wymaganych w tego typu rozprawach. W części literaturowej kandydatka zawarła informacje o syntezie, właściwościach fizykochemicznych i funkcjach biologicznych kapu. Mgr Ciechanowicz przedstawiła obszernie rolę kapu w procesach dojrzewania pre-mRNA, inicjacji translacji i degradacji mRNA. Szczególnie ciekawy był fragment części literaturowej, który dotyczył możliwości zastosowania analogów kapu do inhibicji translacji, oddziaływania z wybranymi białkami komórkowymi czy użyciu analogów kapu, jako szczepionek RNA. Terapeutyczne wykorzystanie analogów kapu przebiega się przez całą rozprawę doktorską. Takie podejście jest szczególnie cenne i świadczy, że doktorantka oprócz tego, że chce otrzymać nowe związki i dobrze scharakteryzować, myśli także o ich praktycznym wykorzystaniu. W części literaturowej mgr Ciechanowicz przedstawia także dokonania dotyczące wykorzystania podejścia typu *click* w chemii kwasów nukleinowych i ich składników. Jest to bardzo przydatne wprowadzenie do chemicznej syntezy analogów kapu opisanych w dalszej części rozprawy doktorskiej, gdyż właśnie o ten rodzaj chemii opierały się w większości chemiczne syntezy prowadzone przez mgr Ciechanowicz. Ta część rozprawy zawiera bardzo dużo informacji i sądzę, że warto byłoby pokusić się o przygotowanie publikacji przeglądowej na ten temat.

Tradycyjnie, najciekawsza część rozprawy doktorskiej dotyczy badań własnych, tak też jest również w tym przypadku. Najogólniej, celem badań prowadzonych przez mgr Ciechanowicz była chemiczna synteza dinukleotydowych analogów kapu, w których określone reszty fosforanowe

mostka fosforanowego zastąpione były pierścieniem triazolowym. Pierścień triazolowy wytwarzany był z wykorzystaniem chemii *click*. Przygotowanie dinukleotydowych analogów kapu wymagało syntezy wielu prekursorowych monomerów. Być może jedynie Doktorantka wie ile było tych związków. Ja mogę powiedzieć, że było ich bardzo dużo, samych analogów dinukleotydowych kapu było 36. Synteza dinukleotydowych analogów kapu zawierających pierścień triazolowy prowadzona była w sposób systematyczny. Mgr Ciechanowicz wprowadzała pierścień triazolowy w poszczególne pozycje mostka fosforanowego. Pierścień triazolowy czysto sąsiadował z łącznikami zawierającymi siarkę, azot czy tlen. Większość analogów kapu zawierała mostek trifosforanowy, ale zsyntetyzowała także analogii tetrafosforanowe. Grupa badawcza profesora Jemielitego, także będąc w przeszłości częścią zespołu profesora Darzynkiewicza, zsyntetyzowała i badała funkcje biologiczne wielu innych niż triazolowe dinukleotydowych analogów kapu. Ich wcześniejsze badania dostarczyły pewnych wskazówek i synteza analogów triazolowych często prowadzona była właśnie z uwzględnieniem wcześniejszych obserwacji. Osobiście za bardzo interesujące uważam podjęcie, w którym Doktorantka przygotowała pochodne 5'-azydo-5'-deoksynukleozydów czy ich odpowiedniki dinukleotydowe, do których dodawany był drugi komponent pozwalający uzyskać analog kapu. Sądzę, że takie podejście można byłoby zastosować nawet to syntezy oligonukleotydów. Resumując, część doktoratu dotyczącą chemicznej syntezy analogów kapu można stwierdzić, że mgr Ciechanowicz wykazała się dużą wiedzą, pomysłowością i determinacją, gdyż ilości otrzymanych analogów była duża i zajęła dużo czasu.

Jak wspomniano wcześniej, chemiczna synteza miała z założenia swój dalszy cel naukowy. Chodziło o wykorzystanie analogów kapu, jako potencjalnych terapeutyków. Kap pełni ważną rolę w procesach związanych z metabolizmem mRNA, głównie poprzez oddziaływanie z białkami wiążącymi kap i zabezpieczenie mRNA przed przedwczesną degradacją. Chcąc określić przydatność funkcjonalną analogów kapu, które chemicznie zsyntetyzowała doktorantka wykonała cały szereg testów i analiz biologicznych. Badania te wykonała pod kierunkiem profesora Andrzeja Dziembowskiego na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Pierwszy z testów dotyczy określenia siły wiązania analogów kapu z czynnikiem inicjacji translacji (poprzez określenie powinowactwa do białka eIF4E). Pozwoliło to określić funkcjonalność biologiczną otrzymanych analogów kapu. Doktorantka zauważyła, że na oddziaływania analogów kapu z białkiem eIF4E ma wpływ odległość pomiędzy pierścieniem triazolowym a resztą N7-metyloguanozyny. Dla kilku przygotowanych analogów kapu otrzymano wysokie wartości stałych asocjacji kompleksów eIF4E-analog kapu, co pozwala upatrywać w nich potencjalnych inhibitorów translacji w terapiach przeciwnowotworowych. Kolejny test biologiczny nowych analogów kapu dotyczył ich podatności na degradację spowodowaną przez enzym DcpS. Wszystkie analogi kapu cechowały się większą odpornością na degradację przez DcpS niż kontrolny niemodyfikowany analog kapu. Duża część badanych analogów kapu wykazała odporność na degradację nawet w dużych stężeniach enzymu.

Kolejny test z tej grupy wykazał, że analogii kapu słabo wiążą się z białkiem DcpS, co świadczy, że nie są one inhibitorami tego białka. Łącząc ich stabilność w obecności enzymu DcpS oraz zdolność wiązania się z czynnikiem inicjacji translacji (czynnik eIF4E) można byłoby dla niektórych z nich dopatrywać się zdolności inhibicji translacji bez wpływu na procesy zależne od DcpS.

Kolejny testem było wprowadzenie analogu kapu na 5' koniec RNA. Doktorantka użyła do tego celu polimerazy SP6, a mieszaninę otrzymanych RNA traktowała DNazymem, aby uzyskać RNA o tej samej długości. Doktorantka obserwowała duży wpływ typu modyfikacji kapu na wydajność jego wprowadzenia do modelowego RNA. Wszystkie testowane analogi kapu były mniej efektywne niż naturalny kap. Jakkolwiek, w pewnym zakresie obserwowała ogólne zależności pomiędzy umiejscowieniem pierścienia triazolowego w analogu kapu i wydajnością jego wprowadzenia do RNA. Analog kapu może zostać wbudowany do RNA od końca G lub N7-metyloG. Mgr Ciechanowicz dyskutuje ten problem, ale z opisu tej części pracy trudno się zorientować czy potrafiła określić, jaka część analogów kapu wiąże się od strony G, a jaka od strony metylowanej guanozyny. Warto byłoby ten problem wyjaśnić podczas obrony pracy doktorskiej. Doktorantka sprawdzała również odmienne podejście wprowadzenia kapu do RNA polegające na wytworzeniu prekursorowej wersji RNA z wiązaniem potrójnym na 5' końcu i dopiero na takim RNA wytwarzanie układu triazolowego metodą *click*. Negatywną stroną tego podejścia jest częściowa degradacja RNA jonami miedzi, jakkolwiek sam proces wytworzenia analogu kapu na 5' końcu przebiegał z zadawalającymi wydajnościami. Zaletą takiego podejścia jest jego uniwersalny charakter oraz otrzymywanie jedynie RNA zawierające kap przyłączony od końca G.

Ostatnim testem funkcjonalności analogów kapu było badanie translacyjnej aktywności RNA zawierających różne dinukleotydowe analogii kapów. Pomiar wydajności translacji opierał się na systemie reporterowym lucyferazy. Interpretacja wyników jest dość skomplikowana, gdyż na wydajności translacji miało wpływ wiązanie się białka eIF4E oraz właściwa orientacja wbudowania analogów kapu do RNA. Doktorantka zauważyła, że wydajność translacji wiąże się w pewnym stopniu z jej wcześniejszymi wynikami dotyczącymi pomiaru wiązania się dinukleotydowych analogów kapu i białka eIF4E. Wszystkie analogi cechowały się jednak niższymi wydajnościami translacji niż naturalny kap, chociaż dla kilku wydajność translacji była wysoka.

Inny przeprowadzony test polegał na ocenie stabilności kilku dinukleotydowych analogów kapu w buforach w zakresie pH 3-9. Większość z badanych analogów okazała się stabilna, jakkolwiek niektóre z nich cechowały się mniejszą stabilnością w skrajnych pH.

Podsumowując swoje badania biologiczne, mgr Ciechanowicz zauważa, że pierścień triazolowy jest słabo tolerowany przez białka zaangażowane w procesy zachodzące z udziałem kapu. Im analog jest bardziej podobny do naturalnego kapu, tym jego oddziaływanie w tymi białkami są lepsze.

Niejako efektem wcześniejszych badań analogów kapu była synteza czterech dodatkowych analogów, które w zamierzeniu Doktorantki zawierałyby wszystko to, co czego brakowało wcześniejszym analogom. Dla tych czterech oznaczono wydajności wprowadzania kapu oraz translacji. Dla części z nich uzyskane wydajności były wyższe niż wcześniejszych analogów i mają szansę być wykorzystane, jako funkcjonalnie specyficzne terapeutyki.

Mgr Ciechanowicz wykonała bardzo dużo trudnych syntez chemicznych. Otrzymane analogi są ważne z biologicznego punktu widzenia. Osobiście bardzo wysoko cenię sobie interdyscyplinarny charakter badań przedstawionych w pracy doktorskiej. Doktorantka wykonała trudne chemiczne syntezy bardzo wielu analogów kapu, scharakteryzowała je dokładnie metodami fizykochemicznymi, przeprowadziła kilka typów testów ich aktywności biologicznej. Jestem przekonany, że zdobyta wiedza i doświadczenie zgromadzone podczas syntezy i analizy aktywności biologicznej analogów kapu będą Jej pomocne w przyszłości.

Praca doktorska napisana jest pod względem formalnym poprawnie i sposób bardzo zwięzły prezentuje wyniki i wnioski z przeprowadzonych badań. Jeśli chodzi o styl pisania rozpraw doktorskich to pod tym względem jestem osobą tolerancyjną, jakkolwiek mgr Ciechanowicz zdecydowanie za dużo stosuje określeń żargonowych i wywodzących się bezpośrednio z języka angielskiego, kiedy można byłoby bez trudu użyć określeń polskich. Czasami sformułowania są bardzo skomplikowane, kiedy to samo można byłoby napisać prościej. Wydaje się, że praca doktorska spisywana było trochę w pośpiechu. Widać także, że „kucharzenie” jest w wąskim kręgu pozanaukowych zainteresowań Doktorantki, bo znalazłem w pracy kulinarne sformułowania stwierdzające, że do reakcji Doktorantka dodała „odrobinę wody” czy „szczyptę pirosiarczanu sodu”.

Prosiłbym Doktorantkę, aby podczas obrony swojej pracy doktorskiej podzieliła się swoimi przemyśleniami, dlaczego otrzymane analogi kapu są mniej aktywne niż naturalny kap, czy można byłoby niektóre z przygotowanych analogów wykorzystać, jako terapeutyki nakierowane na specyficzne procesy związane z patogenezą RNA, czy można byłoby zapewnić właściwą orientację włączania kapu w RNA.

Reasumując, uważam, że jest to ciekawa i wartościowa praca doktorska, która wnosi dużo informacji o chemicznej syntezie i wybranych właściwościach biologicznych nowych analogów kapu. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Sylwii Ciechanowicz spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Sylwii Ciechanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ryszard Kierzek

Prof. dr hab. Ryszard Kierzek