

Prof. dr hab. Jacek Stawiński

Poznań, 8 kwietnia 2019

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Warmińskiego

Projektowanie i synteza narzędzi molekularnych do badań struktury i funkcji końca 5' mRNA (kapu) oraz badanie ich kompleksów z białkami metodą krystalografii rentgenowskiej

wykonanej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki
Uniwersytetu Warszawskiego

pod kierunkiem dr. hab. Jacka Jemielitego, prof. UW

Eukariotyczne mRNA posiadają na swoim 5' końcu fragment strukturalny składający się z 7-metyloguanozyny połączony z pierwszym transkrybowanym nukleotydem wiązaniem 5'-5' trifosforanowym (m^7GpppN). Ta unikalna struktura, określana początkowo jako „blocked and methylated structure”, została odkryta w 1975 r. niezależnie przez C.-M. Wei (w laboratorium B. Mossa) i Y. Furushi (w laboratorium A.J. Shatkina) i obecnie znana pod nazwą kapu (od ang. *cap* - a *protective lid or cover for an object*). Oprócz dwóch głównych funkcji, jakie pełni kap w cytoplazmatycznym mRNA – ochrona mRNA przed jego przedwczesną enzymatyczną degradacją oraz inicjowanie procesu translacji, odgrywa on również kluczową rolę m.in. w splicingu oraz transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy.

Na gruncie polskim badania nad funkcją kapu w aspekcie molekularnych mechanizmów regulacji ekspresji genów (np. synteza analogów kapu, ich oddziaływanie z białkami, rola w inicjowaniu procesu translacji, etc.) zostały zainicjowane w połowie lat 80. ubiegłego wieku w grupie prof. dr. hab. Edwarda Darzynkiewicza. Tematyka ta w ostatnim dziesięcioleciu została twórczo rozwinięta i poszerzona poprzez prace dr. hab. prof. UW Jacka Jemielitego i dr Joanny Kowalskiej, i właśnie z tej grupy pochodzi recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska.

Ogólnym celem pracy doktorskiej mgr. Marcina Warmińskiego, wg słów Autora, było stworzenie nowych narzędzi molekularnych do badania procesów biologicznych w które zaangażowany jest koniec 5' mRNA, w formie związków chemicznych o zadanej strukturze i oczekiwanych właściwościach fizykochemicznych i biochemicznych, oraz przebadanie ich kompleksów z wybranymi białkami oddziaływującymi ze strukturami typu kap. Dla Doktoranta były to więc dwa równoległe wątki badawcze: syntetyczny (zaprojektowanie i otrzymanie nowych analogów kapu) i badania strukturalne samych analogów oraz ich kompleksów z wybranymi białkami oddziaływującymi z fragmentami kap.

Kandydat wywiązał się z powierzonego mu zadania znakomicie, a wyniki jego badań stały się istotną częścią wielu publikacji w renomowanych czasopismach naukowych (m.in. w *Angewandte Chemie*, *Journal of the American Chemical Society*, *Organic Letters*, *Nucleic Acids Research*).

Tekst rozprawy podzielony jest na siedem rozdziałów, zawiera 226 pozycje literaturowe, oraz wiele schematów, tabel, widm NMR i obrazów trójwymiarowych struktur.

Część *Przegląd Literaturowy* stanowi dość obszerne wprowadzenie do chemii i funkcji biologicznych kapu i jego analogów, oraz badań strukturalnych kompleksów kap z białkami odpowiedzialnymi za regulację translacji mRNA. Miało to na celu pokazanie niniejszej pracy w szerszym kontekście badań chemicznych i biologicznych prowadzonych w tym zakresie na świecie, oraz danie czytelnikowi podstawowych informacji, koniecznych do lepszego zrozumienia badań własnych Kandydata, dyskutowanych w następnych rozdziałach. Podobnie jak cała praca, część ta jest bogato ilustrowana wzorami chemicznymi, równaniami reakcji, kolorowymi schematami i strukturami rentgenograficznymi.

Bardzo zasadnym było wyodrębnienie jako osobnej części *Metodyki Badań*, w której autor opisuje chemię i procedury syntetyczne stosowane w pracy, oraz podaje teoretyczne i eksperymentalne podstawy używanych technik instrumentalnych. Dotyczy to, m.in. stosowania rentgenografii w badaniach kompleksów białko-ligand, spektroskopii NMR w badaniach konformacyjnych nukleotydów, oraz termoforezy mikroskalowej (MST) dla oznaczenia oddziaływań białko-ligand. Dzięki temu, w opisie badań własnych Autor mógł swobodniej prowadzić swoje wywody logiczne bez konieczności odwoływania się do odpowiednich podstaw teoretycznych stosowanych technik eksperymentalnych.

Obie części, *Przegląd Literaturowy* i *Metodyka Badań*, są dobrze wyważone, a sposób prezentacji materiału wskazuje, że Doktorant swobodnie porusza się w skomplikowanych często obszarach chemicznej syntezy analogów fosforowych, badań strukturalnych, oraz biochemii i biologii molekularnej.

Cel pracy został ogólnie, ale jasno wyartykułowany w pierwszej części rozprawy (*Cele Projektu i Koncepcja Pracy*), a następnie uszczegółowiony w rozdziale *Badania Własne*. Jest to najbardziej obszerna część rozprawy doktorskiej.

Przy racjonalnym projektowaniu nowych analogów kapu podstawowe znaczenie ma znajomość oddziaływania tego typu struktur z odpowiednimi białkami. W tym przypadku były to, m. in. czynnik inicjujący translację eIF4E oraz dwa białka hydrolityczne usuwające kap: DcpS oraz Dcp2. Ponieważ mogą one być również ważne z punktu widzenia potencjalnych, terapeutycznych zastosowań analogów kapu, kompleksy z tymi białkami Doktorant wybrał jako główne cele badawcze.

W pierwszym etapie swoich badań, Autor zaprojektował różne analogi nukleotydowe dla poznania molekularnych podstaw oddziaływań kap-białko. Chociaż niektóre z białek oddziaływujące z kapem wiążą się nawet z prostymi mono- i dinukleotydowymi analogami, Autor zdecydował się na syntezę bardziej złożonych struktur typu trinukleotydowych analogów kapu. Pozwoliło to poszerzyć wachlarz możliwych struktur analogów kapu o nowe kombinacje modyfikacji w mostku trifosforanowym i na pierwszym transkrybowanym nukleozydzie, zarówno w jego części cukrowej jak i na zasadzie heterocyklicznej i wiązaniu 3',5'-internukleotydowym, a nawet na zastąpieniu tego ostatniego nową grupą atomów, np. łącznikiem triazolowym.

W celu śledzenia lokalizacji analogów kapu we wnętrzu komórki, Autor opracował metody fluorescencyjnego znakowania struktur kapu z zachowaniem zdolności transkryptów do ulegania translacji. Takie znaczniki fluorescencyjne zostały wprowadzone w różne miejsca di- i trinukleotydowych analogów kapu.

Ta chemiczna część badań została opisana w p. 4.3 jako *Projektowanie i synteza chemiczna analogów końca 5' mRNA*. Synteza zaprojektowanych struktur nie była zadaniem trywialnym i wymagała rozwiązania wielu, nowych problemów chemicznych. Otrzymane wyniki, o dużej wartości poznawczej z punktu widzenia syntetycznej chemii organicznej, zostały opublikowane jako wieloautorskie komunikaty lub pełne prace w znakomitych czasopismach naukowych.

Ze względu na obszerność tych badań nie sposób je wszystkie opisać nawet

bardzo skrótowo w niniejszej recenzji. Wspomnę jedynie kilka z nich, a mianowicie (i) opracowanie syntezy trinukleotydowych analogów kapu z modyfikacją β -tiofosforanową oraz rozdział odpowiedników P-diasteromerów, (ii) funkcjonalizację kapu grupą acetylenową dla późniejszej cykloaddycji z azydkami, oraz syntezę odpowiednich 5'-azydo rybooligonukleotydów jako substratów, (iii) opracowanie syntezy analogów kapu zawierających wiązanie P-S-C, oraz (iv) wykorzystaniem *click chemistry*, do opracowania syntezy nowej klasy cyklicznych analogów oligorybonukleotydów. Wszystkie chemiczne rozwiązania zaproponowane przez Autora cechuje nowatorstwo, syntetyczna efektywność, a otrzymane wyniki należy ocenić je jako ważną zarówno dla chemii kwasów nukleinowych jak i chemii fosforu.

Dla wybranych analogów kapu Doktorant przebadął ich właściwości biologiczne, a mianowicie, powinowactwo do czynnika inicjującego transkrypcję eIF4E, efektywność wbudowywania analogów kapu do mRNA, oraz podatność na hydrolizę enzymatyczną otrzymanych konstrukcji.

Otrzymane trinukleotydowe analogi kapu okazały się dobrymi inicjatorami transkrypcji *in vitro*, które zapewniały również właściwą orientację wbudowywania kapu. Z tego punktu widzenia mogą one stanowić alternatywę dla dinukleotydowych analogów typu ARCA. Prof. Darżynkiewicz w kontekście potencjalnych terapeutycznych zastosowań analogów kapu. Mimo trochę bardziej złożonej struktury chemicznej, ich zaletą jest możliwość dodatkowej modulacji aktywności biologicznej poprzez wprowadzanie modyfikacji na 3' końcowym nukleotydzie.

Dla otrzymanych, znakowanych fluorescencyjnie analogów kapu Autor przebadął również ich użyteczność do wizualizacji mRNA w komórkach oraz monitorowania degradacji odpowiednich transkryptów. Takie znaczniki fluorescencyjne zostały wprowadzone w różne miejsca di- i trinukleotydowych analogów kapu. Autor przebadął dwa podejścia: znakowanie mRNA z użyciem kapu posiadającego wbudowaną sondę fluorescencyjną (znakowanie kotranskrypcyjne) oraz znakowanie posttranskrypcyjne, w którym chemiczny marker umieszczony we fragmencie kapu służył jako miejsce przyłączenia przyszłego fluoroforu.

Doktorant pokazał w badaniach na hodowli komórek HeLa, że transkrypty znakowane fluorescencyjnie w obrębie 7-metyloguanozyny mogą mieć dużą przydatność do monitorowania losu kapowanych mRNA w warunkach *in vivo*. Mimo, że dla biokonjugatów z markerem fluorescencyjnym wydajności translacji były zwykle niższe niż dla innych analogów kapu (np. ARCA, ARCA-F), to były one jednak ok. 40

razy wyższe niż dla niekapowanych lub zakończonych niefunkcyjnym kapem (np. ApppG) mRNA.

Przechodząc do badań strukturalnych modyfikowanych analogów kapu. Dotychczasowe dane eksperymentalne jasno wskazują, że chemiczne modyfikacje w obrębie mostka 5'-5' trifosforanowego mają największy wpływ na biologiczne właściwości kapu, ale brakowało odpowiednich danych strukturalnych dotyczących oddziaływania właśnie tego fragmentu trifosforanowego z bardzo ważnym białkiem, a mianowicie, czynnikiem inicjującym translację eIF4E.

Punktem wyjścia dla tych badań Doktoranta była ekspresja i oczyszczanie odpowiednich białek metodami inżynierii genetycznej oraz ich krystalizacja w formie kompleksów z niektórymi z opisanych wyżej analogami kapu. Kandydat poddał próbom kokrystalizacji z białkiem eIF4E 50 różnie modyfikowanych chemicznie analogów kapu, otrzymując dla 27 z nich kryształy pozwalające na jednoznaczne wymodelowanie konformacji liganda. Były to m.in. analogi kapu modyfikowane w pozycji β -fosforanu atomem siarki (oba diastereomery), grupą boranową (oba diastereomery), β -tiofosforanowe pochodne z usztywnionym pierścieniem rybozy 7-metyloguanozyny (oba diastereomery), niemodyfikowane i β -tiofosforanowe trinukleotydowych pochodnych kapu, γ -tiofosforanowe pochodne, oraz analogi kapu z modyfikacjami w pozycji mostkowej funkcji tri- i tetrafosforanowej (grupy CH_2 , NH , CF_2 i CCl_2). Dzięki starannie dobranym obiektom badawczym (i również odrobinie szczęścia przy krystalizacji odpowiednich kompleksów) Doktorant uzyskał cenne informacje na temat wpływu różnych modyfikacji kapu na trwałość tworzonych kompleksów z białkiem inicjującym translację eIF4E. Zostały one podsumowane w części 4.5.8 i najważniejsze z nich to stwierdzenie, że (i) kap najsilniej oddziałuje z białkiem eIF4E poprzez fragment 7-metyloguanozyny oraz grupę β fosforanową, (ii) dominujący wpływ na stabilizację kompleksów mają oddziaływania elektrostatyczne typu mostków solnych, (iii) modyfikacje niemostkowe, w przeciwieństwie do mostkowych, zmieniają znacznie rozkład ładunku elektrycznego w reszcie fosforanowej, co przekłada się na siłę wiązania z białkiem, (iv) oddziaływanie elektrostatyczne Arg157 i Lys162 z grupą β fosforanowa jest na tyle silne, że w odpowiednich przypadkach może wymusić zmianę konformacji i ułożenia mostka trifosforanowego w kompleksie analogu kap z białkiem eIF4E.

W próbach krystalizacji kompleksów analogów kapu z dwoma pozostałymi białkami, mianowicie z enzymami dekapującymi DcpS i Dcp2, Doktorant miał trochę mniej

szczęścia. Mimo, że udało otrzymać się tylko jeden kompleks białka DcpS z jednym z P-diasteromerów bardzo aktywnego analogu kapu zawierającego jako chemiczne modyfikacje dwa wiązania P-S-C i jedno P=S, Doktorant wyjaśnił prawdopodobne przyczyny obserwowanej dużej odporności tego analogu kapu na hydrolizę i jego wysokiego powinowactwa do badanego enzymu.

Ze względu na oczekiwany wpływ konformacji pierścienia rybozy 7-metylguanozyny w strukturze kapu na oddziaływania z enzymami, badania strukturalne prowadzone metodami rentgenograficznymi zostały uzupełnione analizą konformacyjną w roztworze niektórych analogów kapu (oznaczenie parametrów pseudorotacyjnych, ^1H NMR). Dodatkowo, dla wielu kompleksów przeprowadzono analizę termodynamiczną oznaczając odpowiednie stałe dysocjacji K_d kompleksów lub stałe inhibicji IC_{50} .

Podsumowując tę część należy podkreślić, że badania strukturalne zostały przeprowadzone bardzo wnikliwie, z dużą dbałością o szczegóły, a otrzymane wyniki i ich interpretacja nie budzą wątpliwości. Dodatkową wartością jest zaproponowanie przez Doktoranta, na podstawie badań własnych, nowych struktur chemicznych dla analogów kapu o potencjalnie nowych właściwościach chemicznych i biologicznych.

Część Eksperymentalna (rozdział VI) jest dość obszerna i zawiera opis procedur eksperymentalnych, poczynwszy od chemicznej syntezy analogów kapu, syntetycznych, niemodyfikowanych i modyfikowanych oligonukleotydów i ich koniugatów, poprzez pozyskiwanie i oczyszczanie białek do badań krystalograficznych metodami inżynierii genetycznej, a skończywszy na rozwiązywaniu i udokładnianiu struktur odpowiednich kompleksów. Procedury są szczegółowo opisane, a otrzymane związki dobrze scharakteryzowane.

Pracę czyta się łatwo dzięki jasnej i logicznej prezentacji materiału oraz starannej szacie graficznej, ilustrowanej licznym kolorowym schematami, rysunkami i planszami.

Uwagi polemiczne/komentarze

1. Recenzowana praca zawiera w sumie 228 stron i zdaniem recenzenta jest trochę za obszerna jak na rozprawę doktorską. Bardzo dużo ilość różnorodnego materiału faktograficznego wykluczała możliwość dogłębnej dyskusji w ramach kilkustronicowej recenzji. Bardziej odpowiednią formą mogłaby być kolekcja odpowiednich publikacji z komentarzem autora.
2. Z drugiej strony, chciałbym stwierdzić, że praca Doktoranta może stanowić

doskonale kompendium wiedzy dla każdego zainteresowanego sprawami chemicznej syntezy i biologicznych właściwości kapu. Sposób prezentacji materiału, dyskusja, etc., wskazują na głęboką wiedzę Doktoranta w tej dziedzinie oraz na umiejętność ciekawej i jasnej narracji. Daje to recenzowanej rozprawie również duży walor dydaktyczny.

3. Praca doktorska bazuje na wielu publikacjach, które Kandydat połączył interesującą narracją. Zabrakło mi jednak szczegółowych odnośników literaturowych do prac własnych, umożliwiających poznanie dodatkowych szczegółów, które z konieczności musiały zostać pominięte w tekście rozprawy. Również trudno było zorientować się, które fragmenty pracy zostały już opublikowane, a które wymagają jeszcze weryfikacji i są raczej hipotezami dopuszczalnymi w pracy doktorskiej.
4. Badania prezentowane w pracy są badaniami multidyscyplinarnymi, a publikacje z natury wieloautorskie. Należy zaznaczyć jednak, że w różnych miejscach swojej rozprawy Doktorant wyraźnie zaznaczał udział innych osób w realizacji poszczególnych projektów, oraz zakres wykonanych przez nich prac.
5. Całą pracę cechuje bardzo staranna edycja. Zauważyłem jedynie kilka literówek i błędów w formatowaniu.
6. Str. 74, rys. 46. Reakcja utleniania fosforynu. Proszę o szczegółowe uzasadnienie etapów 1 i 2 podanego mechanizmu i skorygowanie ewentualnych błędów.
7. Str. 101 i 102, rys. 71. Przy analizie widm ^1H NMR amidofosforynów Doktorant używa wyrażenia *efekt diastereotopowy* podstawnika, podczas gdy chodzi o relację diastereotopową atomów wodoru grupy CH_2 oraz grup metylowych. Proszę o komentarz dotyczący topowości (*topicity*) atomów lub grup atomów w cząsteczce.
8. Str. 105. Możliwość migracji wiązania internukleotydowego w czasie hydrolizy produktu ubocznego (fluorofosfonianu) w środowisku kwaśnym (HCl , pH1, 3 dni). Czy podanymi metodami spektralnymi można rzeczywiście wykryć obecność małych ilości produktów izomeryzacji?
9. Str. 111. Doktorant rozdzielił 2'- i 3'-karbaminiany propargylowe pochodne kapu. Jaka jest skłonność tych związków do migracji pomiędzy pozycjami 2' i 3' reszty rybozy?
10. Str. 111, rys. 83. Podany mechanizm dla reakcji propargyloaminy z cyklicznym węglanem nukleozydu może budzić pewne wątpliwości. Dlaczego? Proszę

uszczegółowić mechanizm i podać uzasadnienie.

11. Str. 144. Doktorant zaobserwował, że w kompleksach β -tio(seleno)analogu kapu z białkiem eIF4E, oddziaływanie siarki z Arg157 i Liz162 było na tyle preferowane, że wymuszało w jednym z diastomerów zmianę konformacji i ułożenia mostka trifosforanowego. Doktorant przypisał to korzystnym oddziaływaniom elektrostatycznym w związku z większą lokalizacją ładunku ujemnego na atomie siarki (selenu). Ponieważ siarka i selen w tych związkach są miękkimi centrami nukleofilowymi, czy istnieje alternatywne lub uzupełniające wytłumaczenie tego zjawiska w świetle teorii Pearsona HSAB?
12. Str. 145. Stwierdzenie ...*W przypadku boranofosfonianów ładunek ujemny jest jednoznacznie zlokalizowany na grupie BH₃...* wydaje się być zbyt kategoryczne. Prosiłbym o komentarz w tej kwestii.
13. Str. 145. Przy zastąpieniu atomu siarki w β -tioanalogu kapu grupą BH₃ następuje zmiana deskryptorów stereochemicznych R_P/S_P opisujących konfigurację absolutną przy centrum fosforowym, mimo że chiralność (*sense of chirality*) nie uległa zmianie. Być może przy takich okazjach dyskutując sprawy stereochemiczne wygodniej byłoby używać nomenklatury stereochemicznej D_P/L_P , w której zmiana deskryptorów stereochemicznych następuje tylko przy zmianie chiralności.

Wnioski

W podsumowaniu stwierdzam, że temat podjęty przez Doktoranta jest zagadnieniem o dużym znaczeniu z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, a przedstawione wyniki badań znacząco poszerzają naszą wiedzę o funkcji i strukturze kapu końca 5' mRNA oraz jego oddziaływaniach z odpowiednimi białkami. Sposób prezentacji materiału, interpretacja wyników eksperymentalnych, dobór metod badawczych w zależności od rozwiązywanego problemu, wskazują na dużą wiedzę Kandydata w dziedzinie syntetycznej chemii organicznej, biochemii RNA i analizie rentgenograficznej, a osiągnięte wyniki, na dużą biegłość eksperymentalną.

W świetle powyższego, nie mam żadnych wątpliwości, że recenzowana rozprawa spełnia z dużym marginesem wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Marcina Warmińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na wyjątkowo duże walory poznawcze pracy, bardzo wysoki poziom przeprowadzonych badań, multidyscyplinarne podejście do rozwiązywania problemów naukowych, dużą wartość dydaktyczną całego opracowania, oraz znakomity dorobek naukowy mgr. Marcina Warmińskiego, stawiam wniosek o przyjęcie recenzowanej pracy doktorskiej z wyróżnieniem.

