



Łódź, 5 kwietnia 2021

Dr hab. inż. Grażyna Leszczyńska, prof. Uczelni

Politechnika Łódzka
Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116
Tel. +48 313150
grazyna.leszczynska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Renaty Kasprzyk pt. „Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5' mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Renaty Kasprzyk została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Jemielitego oraz prof. dr hab. Andrzeja Wysmołka, na Uniwersytecie Warszawskim. Praca w tak wybitnych grupach badawczych pozwoliła Pani Kasprzyk na zrealizowanie niezwykle ambitnego i złożonego projektu badawczego którego zasadniczym celem było opracowanie nukleotydowych sond molekularnych umożliwiających badanie oddziaływań 5'-końca mRNA tzw. kapu z wybranymi białkami, mianowicie eIF4E (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E), DcpS (enzym degradacji kapu) oraz N7-MTaza (mRNA kap N7-guaninometylotransferaza) oraz sprawdzenie skuteczności wyselekcjonowanych sond w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych biblioteki małocząsteczkowych ligandów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Należy podkreślić, że znalezienie metod umożliwiających szybką selekcję niskocząsteczkowych leków pozwalających na inhibicję wywołujących choroby białek człowieka lub zahamowanie rozwoju niebezpiecznych patogenów stanowi jedno z aktualnych wyzwań współczesnej chemii medycznej, stymulowanych aktualną sytuacją pandemiczną na świecie. Niniejszy projekt doktorski doskonale wpisuje się w powyżej opisane, niezwykle aktualne trendy badawcze.

Praca doktorska mgr Kasprzyk została przygotowana w formie tradycyjnej. Liczący 267 stron dokument stanowi dość obszerne opracowanie, co jest wynikiem szerokiego zakresu prac badawczych jakie zrealizowała Doktorantka. Na zasadniczą część dysertacji składają się: *Cel pracy*; *Przegląd literaturowy*; *Metodyka badań*; *Badania własne*; *Podsumowanie*; *Część eksperymentalna* oraz *Bibliografia* licząca 333 odnośniki. Wymienione części pracy doktorskiej uzupełnia wykaz skrótów, objaśnienie zapisu struktur nukleotydowych, informacja o źródłach finansowania badań oraz całkowitym dorobku naukowym Doktorantki. Praca jest napisana językiem fachowym, ilość błędów literowych jest niewielka jeśli się weźmie pod uwagę objętość pracy, oprawa graficzna pracy jest na bardzo wysokim poziomie i znacząco ułatwia Recenzentowi śledzenie opisywanych przez Doktorantkę treści.

Główną podstawę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Kasprzyk stanowi siedem artykułów, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym między innymi *Chemical European Journal* oraz *Chemical Communication*. Artykuł w *Organic Biomolecular Chemistry* (2016, 14, 3863-3868) został wyróżniony przez edytora okładką czasopisma. Artykuły zostały opublikowane w latach 2016-2020 i po przejrzeniu bazy *Scopus* można śmiało powiedzieć, że spotykają się z zainteresowaniem środowiska naukowego. W trzech z siedmiu publikacji związanych z tematem rozprawy doktorskiej, Pani Kasprzyk jest pierwszym autorem, co pozwala sądzić, że rola Doktorantki w planowaniu i wykonywaniu badań była wiodąca. W tym miejscu zwrócę uwagę na fakt, że badania własne nie zostały przez Doktorantkę napisane w pierwszej osobie, co mogłoby utrudnić ocenienie faktycznego wkładu Doktorantki w badania, jednakże Pani Kasprzyk wyraźnie podkreśla udział i zakres prac zrealizowanych przez inne osoby, podając je z imienia, nazwiska oraz afiliacji.

Ponadto, Doktorantka jest współautorką 3 innych publikacji, przyznanego patentu krajowego oraz 5 komunikatów ustnych. W opisie doktoratu pojawia się wzmianka na temat przygotowywania dwóch kolejnych publikacji.

Na uwagę zasługuje skuteczność pani Kasprzyk w pozyskiwaniu funduszy na realizowanie badań naukowych. Doktorantka pozyskała cztery finansowania, w ramach projektów *Diamentowy Grant*, *Preludium*, *Etiuda* i *Start 2020*. Należy podkreślić, że Doktorantka odbyła staż zagraniczny w Zespole dr Pietscha, w Centrum Farmakologii Uniwersytetu w Kolonii, co zaowocowało dodatkowymi wynikami opisanymi w rozprawie.

Podsumowując tę część recenzji, uważam, że osiągnięcia naukowe pani Kasprzyk - jeśli weźmiemy pod uwagę wczesny etap kariery Doktorantki – są zdecydowanie imponujące.

Przechodząc do recenzji samej pracy doktorskiej, w pierwszej kolejności skoncentruję się na rozdziale *Przegląd literaturowy*. Jest on napisany w sposób dojrzały i w mojej ocenie posiada duży walor dydaktyczny. Zawartość tej części rozprawy uwzględnia

opis zagadnień bezpośrednio związanych z częścią badawczą rozprawy, takich jak charakterystyka kapu oraz białek związanych z jego metabolizmem, opis terapeutycznego zastosowania modyfikowanych analogów kapu oraz metod stosowanych do badań oddziaływań białko-ligand, zwłaszcza metod fluorescencyjnych oraz z zastosowaniem nanomateriałów. Ta część pracy została opatrzona 256 odnośnikami (nie licząc braku danych bibliograficznych w odnośniku nr. 215). W odbiorze Recenzenta szczególnie cenne jest scharakteryzowanie i porównanie opisanych w literaturze metod umożliwiających zbadanie oddziaływania pomiędzy ligandami a interesującymi Doktorantkę białkami metabolizmu kapu oraz dyskusja wpływu chemicznej modyfikacji łańcucha fosforanowego niskocząsteczkowych analogów kapu na właściwości całej cząsteczki.

W rozdziale kolejnym *Metodyka badań*, Doktorantka omówiła metody oddziaływania białko-ligand oparte o fluorescencyjne techniki detekcji (pomiar intensywności fluorescencji FLINT, pomiar polaryzacji fluorescencji FP, termoforeza mikroskalowa MST) oraz zmiany parametrów przepływu prądu elektrycznego w sfunkcjonalizowanym grafenie (spektroskopie FTIR, ramanowska i XPS).

Część *Badania własne*, Doktorantka rozpoczęła rozdziałem *Motywacja pracy* a następnie *Plan pracy*. Oba rozdziały dostarczają skondensowanych informacji na temat rangi problemu który zamierza Doktorantka podjąć, oraz planowanych zadań które pozwolą przybliżyć się do jego rozwiązania. Zgodnie z założeniem projektu Doktorantka zastosowała spektroskopię fluorescencyjną jako technikę pomiarową oddziaływań białko-ligand która umożliwiła wysokoprzepustowe badania przesiewowe dużej biblioteki małocząsteczkowych ligandów o właściwościach inhibitorów białek metabolizujących kap. Aby projekt doktorski mógł być zrealizowany, Doktorantka zsyntetyzowała naprawdę imponującą serię znakowanych fluorescencyjnie mononukleotydowych analogów kapu m^7 GTP, dinukleotydowych analogów Gp_3G i Gp_3A oraz analogów nukleotydów guanozynowych, modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym, w reszcie cukrowej lub zasadzie nukleinowej. W celu połączenia fragmentu nukleotydowego ze znacznikiem wykorzystane zostały metody syntetyczne oparte głównie o cykloaddycję azydkowo-alkinową katalizowaną jonami miedzi (I).

Spośród kilkunastu znakowanych fluorescencyjnie mononukleotydowych analogów kapu m^7 GTP wyselekcjonowano sondy znakowane pirenem ($m^7Gp_5C_4Py$ oraz $m^7Gp_3C_4Py$) jako najbardziej skuteczne do monitorowania odpowiednio, tworzenia kompleksów kap-eIF4E oraz hydrolizy kapu katalizowanej przez DcpS. Metody te określono nazwami PyFLINT-B oraz PyFLINT-HA. Opracowana metoda PyFLINT-B oraz odpowiednio zmodyfikowana mononukleotydowa sonda pirenowa $m^7Gp_{spp}OC_3Py$ D1 posłużyła do opracowania metody monitorowania tworzenia kompleksów kap-DcpS.

W celu opracowania metodyki umożliwiającej bezpośrednie monitorowanie reakcji N7-metylacji kapu, Doktorantka przetestowała kilkanaście znakowanych fluorescencyjnie dinukleotydowych sond Gp₃A i Gp₃G. Metodologię opracowano i zoptymalizowano dla enzymu Ecm1 z pasożyta *Encephalitozoon cuniculi*, ludzkiego białka RNMT-RAM oraz wirusowego VCE. Największa zmiana intensywności fluorescencji na skutek N7-metylacji obserwowana była dla sondy pirenowej Gp₃A znakowanej przez pozycję 3'-O adenozyiny (Gp₃A-3'-O-Py3 oraz odporny na hydrolizę analog GpCH2ppA-3'-O-Py3). Metodę określono jako PyFLINT-M.

Metody PyFLINT-B, PyFLINT-HA oraz PyFLINT-M poddano walidacji a uzyskana wartość parametru $z > 0,5$ zakwalifikowała je jako użyteczne w eksperymentach HTS. Metoda PyFLINT-B okazała się odpowiednia do szybkich i wydajnych pomiarów powinowactwa bibliotek ligandów do białka eIF4E, co potwierdzono poprzez charakterystykę biblioteki analogów kapu modyfikowanych pierścieniem triazolowym; przeprowadzono również charakterystykę serii mononukleotydów zawierających resztę tryptaminową oraz serii dinukleotydowych analogów kapu m⁷Gp₃(G/A) modyfikowanych grupą propargilową, kwasem foliowym lub cholesterolem. Zaletą metody PyFLINT-B jest około 10-krotne skrócenie czasu potrzebnego do wyznaczenia powinowactwa ligandów do eIF4E w porównaniu do metod dotąd stosowanych. Metodę PyFLINT-HA zastosowano do scharakteryzowania znanych nukleotydowych inhibitorów enzymu DcpS, serii mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych tryptaminą oraz potwierdzono możliwość badań inhibicji DcpS w ekstraktach komórkowych. Zastosowana w metodzie PyFLINT-HA sonda jest około 20 razy bardziej czuła niż stosowana do tej pory m⁷GTP_γS-AcPy oraz pozwala na monitorowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym. Za pomocą metody PyFLINT-B dedykowanej do badania tworzenia kompleksu DcpS-ligand przetestowano powinowactwo serii niefluoryzujących inhibitorów DcpS. Użyteczność PyFLINT-M pokazano w badaniach inhibicji Ecm1 z *E.cuniculi* i ludzkiej RNTMT-RAM dla których przetestowano serię analogów Gp₃A modyfikowanych w pozycjach C8 lub C6 guanozyiny, mono-, di- i trifosforany 8-winyloguanozyiny lub 7-metyloG, oraz związki farmakologicznie czynne z biblioteki LOPAC. Skuteczność czterech najsilniejszych inhibitorów została sprawdzona względem wirusowej N7-metylotransferazy. Należy podkreślić, że opracowana przez Doktorantkę metoda HTS monitorowania aktywności białka N7-MTazy oraz selekcji specyficznych inhibitorów jest pierwszą która opiera się na zmianach fluorescencji niskocząsteczkowych sond nukleotydowych. Skuteczności tej metody dowodzi fakt, że jest ona aktualnie wykorzystywana przez Doktorantkę w badaniach przesiewowych bibliotek związków hamujących aktywność N7-MTazy wirusa SARS-CoV-2 powodującego chorobę COVID-19.

Metoda fluorescencyjna oparta o pomiary polaryzacji fluorescencji FP została opracowana przez Dyplomantkę do charakterystyki miejsca wiążącego GTP ludzkiego białka transglutaminazy II (TG2). Do tego celu Doktorantka wykorzystała znakowane fluorescencyjnie analogi nukleotydów guanozynowych. Najlepszy znakowany analog GTP ($Gp_3C_2(5)FAM2$) zastosowano do opracowania metody anizotropii fluorescencji do monitorowania wiązania ligandów (modyfikowanych mono- i dinukleotydów G- lub m^7G -nukleozydowych) z białkiem TG2 oraz określenia wpływu stężenia Ca^{2+} na tworzenie kompleksu nukleotyd-TG2. Zastosowanie opracowanej metody do charakterystyki nieodwracalnych inhibitorów aktywności transamidacji białka TG2 pozwoliło Doktorantce wyciągnąć wniosek, że metoda może być zastosowana w testach inhibitorów miejsca aktywnego białka TG2.

Ponadto Doktorantka przeprowadziła charakterystykę dwuznakowanych sond mononukleotydowych z wykorzystaniem zjawisk fluorescencyjnych opartych o oddziaływania typu FRET, wygaszanie oraz sondy ekscymerowe (zawierające dwie molekuły pirenu). Wymienione sondy zostały wykorzystane do badań degradacji kapu przez enzym DcpS oraz w badaniach aktywności fosfodiesterazy PDE-I.

Wśród ambitnych celów badawczych Dyplomantki znalazło się ponadto opracowanie biosensora eIF4E na bazie grafenu sfunkcjonalizowanego analogiem kapu z założeniem, że zmiana przewodnictwa elektrycznego modyfikowanego nukleotydem grafenu umożliwi określenie stężenia eIF4E jako markeru nowotworowego. W tej części badań udało się opracować metodę, w której koniugat grafen-nukleotyd osadzono na powierzchni tranzystora. W metodzie tej grafit utleniono do tlenku grafenu a następnie sfunkcjonalizowano grupą azydkową i w reakcji CuAAC przyłączono dwa G-nukleotydy: oddziałujący z białkiem eIF4E nukleotyd m^7GTP oraz GTP uzyskując próbkę referencyjną.

Część pracy doktorskiej opisującą badania własne kończy niezwykle dobrze przemyślane *Podsumowanie* rezultatów badań Doktorantki oraz opis narzędzi badawczych jakie w swojej pracy wykorzystwała. Część *eksperymentalna* zawiera protokoły syntezy modyfikowanych nukleotydów, sond mono- i dwu-nukleotydowych, znaczników fluorescencyjnych oraz modyfikowanych nanomateriałów. Zamieszczone analizy spektroskopowe związków otrzymanych drogą chemiczną nie budzą wątpliwości. Nie do końca rozumiem intencję Doktorantki w numerowaniu stałych sprzężeń $J_1, J_2, \dots$, w opisie widm 1H NMR.

Kończąc recenzję części badawczo-eksperymentalnej pani Kasprzyk chciałabym poprosić Doktorantkę o komentarz do następujących spostrzeżeń Recenzenta:

- W badaniach tworzenia kompleksów $m^7Gp_3(A/G)$ -eIF4E (Tabela IV.7) zaobserwowano, że obecność cholesterolu w układach m^7Gp_3A , a zwłaszcza m^7Gp_3G i m^7Gp_3ppG zwiększa powinowactwo związku do białka eIF4E wraz ze wzrostem temperatury. W pozostałych przypadkach zestawionych w tabeli nie obserwuje się takiej zależności. Czy mogłaby Pani skomentować ten wynik?

- Wobec potwierdzonego przez Doktorantkę faktu, że w inhibicji N7-metylotransferaz istotną rolę odgrywa drugi nukleotyd, jak ocenia Pani możliwość zastąpienia adenozyiny w inhibitorach typu Gp_3A na nukleozyd pirymidynowy - urydynę lub cytydynę?

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi zbiór niezwykle ważnych badań, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu ogólnonaukowym. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych przez Doktorantkę prac badawczych, aktualność podejmowanej problematyki badawczej oraz użyteczność opracowanych metod, które zostały wdrożone w Zespole profesora Jemielitego i z powodzeniem stosowane. Tym samym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi właściwej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę o dopuszczenie mgr Renaty Kasprzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyniki badań uzyskanych przez Doktorantkę wnoszą istotny wkład w rozwój dziedziny, w szczególności proponują nowe, bardzo wartościowe rozwiązania HTS-selekcji związków oddziałujących z białkami metabolizmu kapu w oparciu o nukleotydowe sondy molekularne. Mając na uwadze istotę podejmowanych przez Doktorantkę problemów, jej niebywałą dojrzałość naukową oraz wyjątkową aktywność publikacyjną nie mam wątpliwości o konieczności wyróżnienia ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej. W związku z przedłożoną opinią, składam formalny wniosek do Rady ds. Stopni Naukowych Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kasprzyk.

Q. Lenczyński