INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

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

Prof. dr hab. Jacek Stawinski

Poznan, 11 maja 2022

DZIEKANAT
SEKCJA ds. DOKTORANCKICH

Wpłynęło dnia 2022-05-12

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Marka Baranowskiego

Fluorofosforanowe analogi (oligo)nukleotydów jako narzędzia do badań procesów biologicznych

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

pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Jemielitego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej

W ostatnich dekadach rozwój nowatorskiej technik terapeutycznych bazujących na kwasach nukleinowych przyniósł znaczny postęp w terapii trudnych do leczenia chorób, w tym tych związanych z zaburzeniami genetycznymi. Techniki te, ukierunkowane na wyciszanie ekspresji uszkodzonych genów lub naprawę mechanizmów ich regulacji, wymagają wysoce precyzyjnych narzędzi molekularnych. Aby sprostać tym wyzwaniom otrzymano i przebadano szeroką gamę analogów oligonukleotydów, które są krótkim fragmentami DNA lub RNA z racjonalnie zaprojektowanymi modyfikacjami. Wśród nich analogi kwasu nukleinowego w których jedną grupę hydroksylową przy funkcji fosforanowej zastąpiono atomem fluoru, zyskują w ostatnich latach duże zainteresowanie jako związki o potencjalnych wartościach terapeutycznych lub otwierające nowe zastosowaniach w diagnostyce medycznej.

Istnieje kilka cech, które sprawiają, że związki zawierające wiązanie P-F są atrakcyjnymi surogatami estrów kwasu fosforowego. Wysoka elektroujemność fluoru i jego mały rozmiar ułatwiają korzystne nakładanie się orbitali atomu fluoru z orbitalami grupy fosforanowej, dzięki czemu wiązanie P-F jest niezwykle silne (-439 kJ/mol).

Ponieważ atom fluoru jest mniejszy niż grupa hydroksylowa (promień van der Waalsa odpowiednio 1,35 i 2,20 Å), zastąpienie niemostkowego atomu tlenu w ugrupowaniu fosforanowym przez fluor nie powoduje przeszkody sterycznej podczas interakcji z enzymami. Chociaż wprowadzenie atom fluoru eliminuje jeden formalny ładunek ujemny grupy fosforanowej, wytworzony analog może nadal brać udział w hydrofilowych interakcjach z wodą, ważnych dla biomolekuł. Należy dodać, że atom fluoru może być wykorzystany również jako grupa reporterowa w badaniach konformacyjnych fragmentów kwasów nukleinowych, w których spektroskopia 19F NMR, o czułości zbliżonej do 1H NMR, jest szczególnie przydatne. Najważniejszymi zaletami spektroskopii 19F NMR są znacznie większy zakres przesunięć chemicznych jąder 19F w porównaniu do 1H, duża wrażliwe na wpływ środowiska oraz zwykle nieskomplikowane widma. Dodatkowe informacje strukturalne można również uzyskać poprzez stosowanie technik relaksacyjnych NMR, np. dla określenia odległości między atomem fluorem a metalem skoordynowanym w odległym miejscu w cząsteczce.

Właśnie tej klasie związków poświecił swoje zainteresowania badawcze mgr Marek Baranowski, dla którego fluorofosforany, jako analogi nukleotydów, były obiektami badawczymi od czasów studiów licencjackich, poprzez studia magisterskie aż po recenzowane przeze mnie badania prowadzone w ramach studiów doktorskich. W tych ostatnich, głównym celem Doktoranta było zademonstrowanie możliwości stosowania fluorofosforanowych analogów nukleotydów i oligonukleotydów jako precyzyjnych narzędzi, w postaci tzw. sond molekularnych, do badań różnych procesów biologicznych, np. do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych i identyfikacji możliwych inhibitorów biorących w nich udział enzymów lub badania oddziaływań kwasów nukleinowych z innymi biomolekulami. We wszystkich tych badaniach rolę mentorów pełnili znakomici naukowcy Uniwersytetu Warszawskiego, dr hab. Joanna Kowalska i prof. dr hab. Jacek Jemielity.

Tekst rozprawy doktorskiej podzielony jest na 7 rozdziałów, zawiera 254 pozycje literaturowe, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów i wprowadzenie z opisem dorobku naukowego i komentarzem Doktoranta dotyczącym sposobu prezentowania wyników badawczych w recenzowanej dysertacji.

Rozdział 1, *Przegląd literaturowy*, stanowi dość obszerne (87 stron) wprowadzenie nie tylko do chemii fluorofosforanów jako analogów nukleotydów, ale również do wpływu jaki wywiera wprowadzenie atomu fluoru na konformację biomolekuł. Sposób prezentacji jest jasny, interesujący i wskazuje na dużą wiedzę Doktoranta w zakresie przedstawianego materiału. Podobnie jak cała praca, część ta jest bogato ilustrowana i bardzo informatywna. Dobór dyskutowanych zagadnień jest dobrze wyważony, a jedynie podrozdział poświęcony spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego mógłby ograniczyć się do spektroskopii 19F NMR, która to część z kolei mogłaby być bardziej rozwinięta kosztem dość szczegółowego wprowadzenia do techniki NMR. Natomiast podrozdział z krótkim opisem enzymów akceptujących fluorofosforany jako substraty uważam za bardzo celowy biorąc pod uwagę, ze fluorofosforany nie są naturalnymi substratami dla tych enzymów i ich interakcja z enzymami jest mniej znana.

Cel pracy został ogólnie, ale bardzo jasno sformułowany w części *Badania własne* i zaprezentowany w kontekście wcześniejszych zainteresowań badawczych Doktoranta, jako ich logiczna kontynuacja. Cele te zostały ponownie, ale już bardzo szczegółowo, wyartykułowane w podrozdziałach *Cele i obiekty badań*, poprzedzających dyskusje wyników dwóch najważniejszych wątków tematycznych badań Doktoranta: (i) zastosowanie pochodnych fluorofosforanów do profilowania preferencji substratowych wybranych enzymów kontrolujących metabolizm, ścieżki sygnałowe i integralność kwasów nukleinowych w komórce oraz (ii) fluorowe analogi oligonukleotydów jako sondy molekularne w badaniach 19F NMR.

Pierwszy projekt miał na celu opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej (HTS) do poszukiwania inhibitorów białek z rodziny triady histydynowej (HIT), które to białka są od lat w centrum zainteresowań badawczych grupy prof. dr. hab. Jacka Jemielitego i dr hab. Joanny Kowalskiej. Realizując ten eksperymentalnie wymagający projekt Doktorant opracował warunki do śledzenia postępu reakcji wybranych enzymów z odpowiednimi nukleozydo fluorofosforanami wykorzystując selektywną sondę fluorogeniczną, która pod wpływem uwalnianych w reakcji anionów fluorkowych zmieniała swoje właściwości spektralne. Po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej potencjalnego inhibitora, mierzono jego wpływ na intensywność

fluorescencji i na tej podstawie oznaczano efektywność inhibicji. W ten sposób Doktorant przebadał 4 enzymy: fosfodiesterazę z jadu węża (PDE-I) jako enzym modelowy do walidacji protokołu HTS oraz ludzki enzym dekapujący (hDcpS), ludzki enzym hFhit i roślinny enzym AtFhit. Używając biblioteki związków BZ-1 (76 związków) Doktorant znalazł 6 silnych inhibitorów enzymu PDE-I, dla których oznaczył IC_{50}. Na pozostałych enzymach, Doktorant przetestował bibliotekę związków BZ-2 (146 związków) i znalazł szereg efektywnych inhibitorów, które poddał dokładniejszej analizie. Na podstawie wyników HTS dla ludzkiego enzymu hFhit, Doktorant zaprojektował, otrzymał i przebadał 9 nowych potencjalnych inhibitorów tego enzymu.

Drugi, główny wątek badawczy prac Doktoranta dotyczył badań nad 5'-fluorofosforylowanmi oligodezoksyrybonukleotydami jako sondami molekularnymi do monitorowania oddziaływania fragmentów DNA z innymi biomolekulami, wykorzystując w tym celu spektroskopię 19F NMR. Część syntetyczna tego projektu wymagała opracowania wydajnej metody otrzymywania odpowiednich oligonukleotydów posiadających w pozycji 5' grupę fluorofosforanową lub fluorodifosforanową. Doktorant wykonał z powodzeniem to nietrywialne zadanie otrzymując 3 analogi oligonukleotydów znakowane grupą 5'-fluorofosforanawą i 15 oligonukleotydów ze znacznikiem w formie grupy 5'-fluordifosforanowej. Tak przygotowane sondy molekularne posłużyły Doktorantowi do monitorowania, m.in. tworzenia się dupleksów DNA, wykrywania pojedynczych niekomplementarności nukleotydowych, do monitorowania tworzenia się struktur typu G-kwadrupleksów i ich zmian pod wpływem temperatury i zmian pH, jak również do badania oddziaływań małocząsteczkowych ligandów ze strukturami typu *i*-motywów.

Należy wspomnieć również o badaniach Doktoranta nad wykorzystaniem grupy trifluorometylowej (CF_3) jako znacznika w sondach molekularnych do badania aktywności katalitycznej i specyficzności substratowej ludzkiego białka hFhit. Podejście to pozwoliło Doktorantowi na monitorowanie badanej reakcji enzymatycznej w czasie rzeczywistym i opracowanie tzw. testu kinetycznego (ang. *kinetic assay*) w odróżnieniu od tzw. testu w punkcie końcowym (ang. *end-point assay*) stosowanego w opracowanym uprzednio przez Doktoranta protokole eksperymentów wysokoprzepustowych (HTS). Zaletą testu kinetycznego jest zwykle znacznie krótszy

czas eksperymentu oraz możliwość monitorowania kinetyki reakcji enzymatycznej w szerokim zakresie stężeń i w dłuższych interwałach czasowych.

Podsumowując tę część rozprawy (Rozdziały 2, 3 i 4) stwierdzam, że badania przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej cechuje bardzo wysoka wartość merytoryczna, przeprowadzone zostały bardzo wnikliwie, z dużą dbałością o szczegóły, a otrzymane wyniki i ich interpretacja nie budzą wątpliwości. Wartością dodaną pracy jest zaproponowanie przez Doktoranta, na podstawie wyników badań HTS, nowych struktur chemicznych dla potencjalnych inhibitorów oraz opracowanie alternatywnego do *end-point assay* testu kinetycznego dającego dodatkowy wgląd w aktywność katalityczną i specyficzność substratową niektórych z badanych enzymów.

Część Eksperymentalna (Rozdział 5) jest jasna i informatywna, a dzięki zamieszczonym wzorom strukturalnym czytelnik nie ma wątpliwości jakich związków dotyczą poszczególne przepisy preparatywne. Procedury są szczegółowo opisane, a otrzymane związki dobrze scharakteryzowane.

Praca jest bardzo staranie opracowana pod względem edytorskim: czyta się ją łatwo dzięki jasnej i logicznej prezentacji materiału oraz przyjemnej szacie graficznej, ilustrowanej licznym kolorowym schematami, rysunkami i planszami. Ze względu na obszerność omawianego materiału, pewne powtórzenia mające na celu przypomnienie czytelnikowi niektórych ważnych wniosków są w pełni uzasadnione.

Wszystkie opisane wyżej badania mają dużą wartość naukową i zostały w większości opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych (The Journal of Organic Chemistry - 2015 i 2020, Nucleic Acids Research - 2020, i Organic & Biomolecular Chemistry – 2016), a jedna praca jest w przygotowaniu do druku.

Uwagi polemiczne/komentarze

1. Recenzowana praca zawiera w sumie 281 stron i zdaniem recenzenta, bez uszczerbku dla jasności prezentowanego materiału, mogłaby być znacznie skrócona. Ze względu na duży dorobek naukowy Doktoranta, bardziej odpowiednią formą mogłaby być kolekcja publikacji z komentarzem autora.
2. Mimo że badania prezentowane w pracy są multidyscyplinarne, a publikacje z natury wieloautorskie, Doktorant wyraźnie zaznaczał w odpowiednich miejscach udział

innych badaczy w realizacji poszczególnych projektów, oraz zakres wykonanych przez nich prac.

3. Całą pracę cechuje bardzo staranna edycja i przyjemna szata graficzna. Zauważyłem jedynie kilka literówek i zwrotów, które brzmią trochę dziwnie (np. *odekranowanie* atomu fluoru, *ciecze deuterowane*, naturalna *abundacja*) lub pochodzą z żargonu laboratoryjnego (np. *eksperyment.... składał się z dwóch płytek*, str. 117).

4. Doktorant stwierdza, że sililowana fluoresceina jest wysoce selektywną sondą do wykrywania jonów fluorkowych, a jednocześnie zauważa, ze sonda ta ulegała szybkiemu rozkładowi w DMSO. Pytanie: dlaczego sililowana fluoresceina jest niestabilna w DMSO i jaki jest możliwy mechanizm jej rozkładu? Czy Doktorant rozważał użycie fluoresceiny zablokowanej innymi grupami sililowymi?

5. Czy zaobserwowane nieznaczne obniżenie Tm dupleksów zawierających grupę 5'-fluorofosforanową lub 5'-fluorodifosforanową było spowodowane obecnością atomu fluoru w grupie fosforanowej czy też samą grupą 5'-fosforanową (5'-difosforanową)?

6. Jaki wpływ na przesuniecie chemiczne grupy 5'-fluorofosforanowej w widmach 31P NMR ma niekomplementarność występująca w dupleksie?

7. Jak daleko od grupy 5'-fluorofosforanowej lub 5'-fluorodifosforanową w dupleksie może znajdować się niekomplementarna para zasad, aby można to wykryć metodą 19F NMR?

8. Biblioteki BZ-1 i BZ-2 stanowią kolekcje związków chemicznych kompletowanych prawdopodobnie w ciągu wielu lat i przygotowywanych przez wielu badaczy stosując różne metody preparatywne. Czy i jak sprawdzano czystość tych związków przed ich użyciem w eksperymentach HTS?

9. Jaka jest hipoteza badawcza, że związek 8-CF_3GMG mimo braku ładunku dodatniego na atomie azotu N7 okazał się substratem dla enzymu cNIIIB?

10. Jaka jest postulowana rola $MgCl_2$ (np. Schemat 2-2) *vs* $ZnCl_2$ (np. Schemat2-6)?

Wnioski końcowe

Jako recenzent pracy doktorskiej mgr. Marka Baranowskiego stwierdzam, że temat podjęty przez Doktoranta jest zagadnieniem o dużym znaczeniu z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego. Opracowanie nowych sond molekularnych, w których

kluczową rolę odgrywa atom fluoru, oraz pokazanie ich użyteczności w badaniach oddziaływań kwasów nukleinowych z innymi biomolekulami znacząco poszerzają gamę narzędzi molekularnych stosowanych w biologii molekularnej i diagnostyce medycznej. Ważnym osiągnięciem jest również opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej (HTS) z wykorzystaniem nukleozydo 5'-fluorofosforanów lub 5'-fluorodifosforanów do selekcji potencjalnych inhibitorów badanych enzymów.

Jasny sposób prezentacji materiału, poprawna interpretacja wyników eksperymentalnych, trafny dobór metod badawczych w zależności od rozwiązywanego problemu, wskazują na dużą wiedzę Doktoranta w dziedzinie chemii kwasów nukleinowych oraz biochemii DNA i RNA.

W świetle powyższego, nie mam żadnych wątpliwości, że recenzowana rozprawa spełnia z dużym marginesem wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim i wnioskuję do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o podjęcie kolejnych kroków uprawniających mgr. Marka Baranowskiego do dalszych etapów promocji doktorskiej.

Wniosek o wyróżnienie

Pracę doktorską mgr. Marka Baranowskiego oceniam bardzo wysoko pod względem poziomu merytorycznego przeprowadzonych badań oraz dużej oryginalności i nowatorstwa w rozwiazywaniu problemów naukowych. Uważam, że osiągnięte wyniki i sposób ich prezentacji znacznie przewyższają wymagania stawiane pracom doktorskim. Wartością dodaną są również ważność podjętej tematyki badawczej oraz multidyscyplinarne podejście w jej realizacji.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz znakomity dorobek naukowy Doktoranta, z pełnym przekonaniem wnioskuję o przyjęcie recenzowanej pracy doktorskiej z wyróżnieniem.