



Wrocław, 29 października 2015

Politechnika Wrocławska

dr hab. Marcin Drąg
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Strenkowskiej

pt. „Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do otrzymywania terapeutycznych mRNA: synteza, właściwości oraz przykładowe zastosowania”

Badania nad zastosowaniem pochodnych kwasów nukleinowych, a w szczególności mRNA w leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych należą do jednych z najintensywniej rozwijanych dziedzin chemii biologicznej. Szczególnym wyrazem tego jest bardzo duży przyrost w ostatnich latach publikacji naukowych traktujących o tego typu badaniach, a także coraz większe zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego poszukiwaniem kandydatów na terapię oparte w strukturze o RNA. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Malwiny Strenkowskiej bardzo dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy. Praca została wykonana pod opieką dr hab. Jacka Jemielitego, prof. U.W. na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, którego laboratorium posiada dużą renomę w prowadzeniu badań nad modyfikacjami chemicznymi kwasów nukleinowych oraz powiązanych z nimi badań biologicznych.

Dorobek badawczy Doktorantki stanowią cztery prace w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W dwóch z nich (Organic Letters, IF=6.3; New Journal of Chemistry, IF=3.2) Doktorantka jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania. Szczególnie wartym podkreślenia jest także fakt, iż prace te stanowią większość badań opisanych w przedstawionej dysertacji. Ranga czasopism jest także dowodem, iż wyniki te zostały już wnikliwie zanalizowane oraz zrecenzowane przez ekspertów powołanych przez czasopisma. Analiza bazy Scopus wskazuje, iż prace naukowe mgr. Strenkowskiej były już cytowane ponad 20 razy (po odjęciu wszystkich autocytowań), co wskazuje na zainteresowanie innych badaczy realizowaną przez Doktorantkę tematyką. Doktorantka jest także autorem kilku wystąpień ustnych oraz posterowych na konferencjach

Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 (71) 320 4526
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym. Odbyla także staże badawcze w laboratoriach za granicą.

Praca doktorska ma klasyczny układ i liczy 238 stron, a więc jest obszernym materiałem naukowym. Przedstawione wyniki z zakresu syntetycznej chemii organicznej oraz biologii molekularnej wskazują na jej interdyscyplinarny charakter. Wstęp teoretyczny do pracy stanowi około 25% jej objętości i opisuje wszystkie najważniejsze zagadnienia teoretyczne poczynając od podstawowych wiadomości o strukturze i funkcjach kwasów nukleinowych, ich potencjalnej funkcji jako terapeutyków, a także modyfikacji chemicznych oraz metod ich syntezy. Wstęp napisany jest w bardzo klarowny sposób i wydaje się świetnym materiałem na pracę przeglądową w tej tematyce. Jedyne mankament jaki zauważyłem jako chemik to zbyt mała ilość schematów ze strukturami opisywanych związków. Taka prezentacja zdecydowanie poprawiłaby czytelność opisów cech charakterystycznych w poszczególnych molekułach. Niemniej, usprawiedliwieniem wydaje się być tutaj i tak już dość obszerna ilość zamieszczonego materiału. Cała praca liczy 178 odnośników literaturowych, co świadczy o dogłębnej analizie tematyki badawczej. Na podkreślenie zasługuje tutaj unikanie cytowania dużej ilości prac przeglądowych, a cytowanie prac źródłowych opisujących oryginalne odkrycia badawcze.

Cel pracy został opisany jasno i precyzyjnie na jednej stronie. Wynika z niego, iż Doktorantka przedstawił przed sobą ambitne wyzwania badawcze w zakresie syntezy oraz wykorzystania niehydrolizowalnych pochodnych nukleotydów do stabilizacji cząsteczki mRNA, a także zwiększenia jej potencjału translacyjnego w badaniach biologicznych. W rozdziale Część Eksperymentalna Doktorantka w sposób dokładny i wyczerpujący opisuje wszystkie procedury eksperymentalne oraz detale dotyczące charakterystyki spektralnej oraz strukturalnej nowo otrzymanych pochodnych. Co zasługuje na uwagę to to, iż wszystkie eksperymenty są opisane w taki sposób, że możliwe jest ich powtórzenie bazując jedynie na detalach zawartych w opisie. Na uwagę zasługują również dokładne interpretacje widm NMR, które ze względu na skomplikowaną strukturę związków z pewnością do łatwych nie należały. Pewną niekonsystencją jest używanie naprzemienne P_2O_5 oraz P_4O_{10} , kiedy mówimy przecież o tych samych związkach. Do rozdziału wkradł się także w bardzo wielu miejscach błąd w słowie „sól”, który jest zapisywany jako „sól”, a wynikający z klasycznej „kalki”. Podsumowując wybór metod eksperymentalnych zauważyć należy, iż Doktorantka w czasie wszystkich lat studiów doktoranckich opanowała bardzo szeroki wachlarz metod eksperymentalnych z zakresu syntezy organicznej, analizy spektroskopowej, biochemii oraz

biologii molekularnej. Potrafi także trafnie wybrać optymalne metody do planowanych zadań badawczych.

W rozdziale Wyniki i Dyskusja Doktorantka w sposób wyważony oraz bardzo dojrzały opisuje wyniki swoich badań. Komentarze do eksperymentów są na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, co świadczy o umiejętności samodzielnej analizy wyników oraz o umiejętności wykorzystania posiadanej wiedzy, a także kojarzenia faktów. Doktorantka świetnie zaplanowała i wykonała eksperymenty podpierając się wcześniej opisanymi wynikami, co jest dowodem na duże doświadczenie naukowe zdobyte w czasie wykonywania zadań badawczych. Jak już to opisałem wcześniej, opisane wyniki w zdecydowanej większości zostały już zrecenzowane i docenione przez innych badaczy, czego wynikiem są bardzo dobre publikacje. Moja pierwsza uwaga dotyczy tutaj nie do końca poprawnego umiejscowienia dotyczącego wstępnego opisu charakterystyki ^{31}P NMR, który jest wmieszany w opis widm ^1H NMR, a sam opis widm ^{31}P NMR jest później. Wprowadza to pewien nieład w spójną analizę wyników. Kolejna uwaga dotyczy przytaczanej w kilku miejscach (na przykład na stronie 138, górny akapit) stabilności związków w dłuższym okresie czasu. Doktorantka pisze, iż dany związek był stabilny/niestabilny przy przechowywaniu w określonej jednostce czasu, nie pisze natomiast w jaki sposób eksperymentalnie udowodniono stabilność związków. Przydałoby się bardziej szczegółowe wyjaśnienie w tej kwestii. Proszę tutaj o komentarz.

Podsumowując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Malwiny Strenkowskiej uważam:

1. Opracowanie nowej metody syntezy oraz otrzymanie tetrafosforanowych analogów kapu modyfikowanych pojedynczą grupą tiofosforanową, ich rozdział na czyste P-distereoizomery, a także wykazanie w badaniach biologicznych ich zwiększonego powinowactwa do białka eIF4E oraz że modyfikowane nimi mRNA ulega wydajniejszej translacji w systemie bezkomórkowym
2. Syntezę oraz badania krystalograficzne wybranych tri- oraz tetrafosforanowych analogów kapu modyfikowanych grupą bis(tiofosforanową), udowodnienie iż wykazują one wyższe powinowactwo do eIF4E niż naturalna struktura kapu, przeprowadzenie serii badań biologicznych (badanie translacji w wybranych układach)
3. Opracowanie metody syntezy trinukleotydowych analogów kapu 0 oraz kapu I posiadających modyfikację grupą tiofosforanową w pozycji β łańcucha

trifosforanowego, wykazanie iż ulegają inkorporacji do mRNA oraz przeprowadzenie badań translacji, które wskazują iż dodatkowa metylacja (kap I) stabilizuje translację mRNA

4. Opracowanie metody syntezy dwóch modyfikowanych analogów ATP: ATP α S oraz ATP α BH₃, wykazanie iż jedynie analogi o odpowiedniej konfiguracji absolutnej ulegają inkorporacji do mRNA, które w wyniku tego jest funkcjonalne ulegając translacji w komórkach

Rozprawa doktorska przedstawiona do oceny przez magister Malwinę Strenkowską jest napisana poprawną polszczyzną i łatwo się ją czyta, co zasadniczo ułatwia analizę danych eksperymentalnych oraz też i wyników zamieszczonych w pracy. Treść pracy jest dodatkowo zobrazowana 81 rysunkami oraz 23 tabelami, których jakość edytorską oraz merytoryczną oceniam wysoko. Praca zasadniczo napisana jest poprawnie, choć Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów interpunkcyjnych, spacji, zlepków wyrazów, żargonowych skrótów czy literówek. Wydaje się także, iż przy druku treść pracy uległa przesunięciu, gdyż bardzo duża ilość rozdziałów rozpoczyna się tytułem na dole poprzedniej strony. Podobnie w przypadku Tabeli 6, której ostatni wyraz jest przesunięty na kolejną stronę. Doktorantka kilkakrotnie używa także sformułowania „W wypadku...”, na przykład w zdaniu „W wypadku analogów modyfikowanych...” na stronie 76. Właściwym sformułowaniem byłoby tutaj „W przypadku...”, gdyż trudno przypuszczać, iż modyfikowane analogi mogą ulegać wypadkom. Niemniej, błędy te zaliczyć należy do chochlików edytorskich i w żaden sposób nie obniżają one mojej, bardzo wysokiej merytorycznej oceny pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Malwiny Strenkowskiej pod tytułem „Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do otrzymywania terapeutycznych mRNA: synteza, właściwości oraz przykładowe zastosowania” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań, a otrzymane przez nią wyniki zostały w znaczącej części opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, co dodatkowo potwierdza wysoką jakość przedstawionej pracy. Otrzymane wyniki z pewnością są doskonałym materiałem wyjściowym do dalszych badań. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając bardzo dobry dorobek naukowy, wysoki poziom

merytoryczny pracy, nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Dr hab. Marcin Drąg, prof. PWr