

Olsztyn, 12 listopada 2015 r.

Prof. dr hab. Zbigniew Wieczorek
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 4
10-917 Olsztyn

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Strenkowskiej zatytułowanej „Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do otrzymywania terapeutycznych mRNA: synteza, właściwości oraz przykładowe zastosowania”.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia wyniki kompleksowych badań nad możliwością wykorzystania modyfikacji 5'-końca oraz 3'-końca mRNA do celów terapeutycznych. Nie bez powodów użyłem określenia „kompleksowych”, ponieważ praca obejmuje zarówno syntezę, jak i wyniki badań właściwości biofizycznych i biochemicznych uzyskanych analogów oraz możliwości ich zastosowania do konstruowania mRNA, które można potencjalnie zastosować w celach leczniczych. Obecność specyficznej struktury kap na 5'-końcu jest cechą charakterystyczną eukariotycznego mRNA. Struktura ta składa się z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym nukleozydem łańcucha mRNA. Odgrywa ona bardzo ważną rolę w procesach dojrzewania i wewnątrzkomórkowego transportu mRNA, w procesie inicjacji translacji, represji translacji oraz istotnie wpływa na stabilność mRNA. Podobnie sekwencja poli(A) obecna na końcu 3' dojrzałego mRNA złożona z powtarzających się nukleotydów adenozytowych chroni mRNA przed degradacją w jądrze komórkowym, jest niezbędna do inicjacji biosyntezy białka, wpływa na wydajność translacji oraz spowalnia degradację mRNA w cytoplazmie. Podjęte przez Autorkę badania bazują na pomysłach wykorzystania poprawy stabilności i właściwości translacyjnych mRNA poprzez zastąpienie klasycznych: 5'-końca mRNA i 3'-końca, analogami przedłużającym trwałość cząsteczki w cytoplazmie, a co za tym idzie dającymi możliwości zwielokrotnienia ilości białka syntetyzowanego na bazie takich matryc.

Tytuł pracy dobrze określa zawartość rozprawy. Rozprawa doktorska jest obszernym, oryginalnym opracowaniem o klasycznym układzie treści podzielonym na trzy główne części: „Wstęp literaturowy”, „Wyniki i dyskusja” oraz „Część eksperymentalna”. Każda z części została podzielona na szereg rozdziałów. Całość opatrzona jest streszczeniem w języku

polskim i angielskim, wykazem cytowanej literatury, wykazem stosowanych skrótów oraz wykazem publikacji i doniesień, których współautorką jest Autorka rozprawy. Nie mam zastrzeżeń do formalnego układu pracy. Natomiast, moim zdaniem, rozdziały pracy zostały nazbyt szczegółowo pofragmentowane na mniejsze podrozdziały, co spowodowało, że sam spis treści zajmuje osiem stron druku. Wprawdzie daje to dość klarowny obraz treści, ale powoduje ciągle powtarzanie niektórych tytułów mniejszych podrozdziałów. Dziwnie brzmi tytuł podrozdziału „Właściwości NMR” (str. 96 i 141), ponieważ Autorka nie przedstawia właściwości magnetycznego rezonansu jądrowego, lecz wyniki badań struktury związków uzyskanych metodą NMR lub co najmniej analizuje widma NMR syntetyzowanych związków.

Rozdział „Wstęp literaturowy” stanowi wyczerpujące przedstawienie tła dla badań podjętych przez Autorkę. Omawia Ona dość szczegółowo dostępną literaturę dotyczącą zarówno syntezy modyfikowanych nukleotydów, możliwości ich wykorzystania do modyfikacji mRNA i zastosowania zmienionego mRNA w celach terapeutycznych. W tym miejscu nie mogę przejść obojętnie nad stwierdzeniem, które znajduje się na str. 44 w podrozdziale „Oddziaływanie kap - eIF4E” i brzmi następująco, cyt. „Specyficzność wiązania kapu względem eIF4E polega na interkalacji N7-metyloguanozyny pomiędzy dwoma resztami tryptofanu (Trp56 i Trp102) poprzez oddziaływania kation- π (tzw. stacking)...”. Wygląda to tak, jakby Autorka utożsamiała oddziaływanie kation- π ze stackingiem. Proszę zatem Doktorantkę o wyjaśnienie tego stwierdzenia w czasie publicznej obrony doktoratu.

Po przeglądzie literatury i krótkim wprowadzeniu do rozdziału „Wyniki i dyskusja” Autorka wskazuje w oddzielnym podrozdziale główne cele badań, do osiągnięcia których niezbędna jest realizacja kilku etapów. Począwszy od dokonania wyboru modyfikacji kapu i ogona poli(A) sprzyjających stabilizacji cząsteczki mRNA, przez opracowanie nowych metod syntezy modyfikowanych nukleotydów i przeprowadzenie syntez nowych analogów kapu i prekursorów poli(A), następnie ocenę właściwości analogów kapu i syntezę mRNA zakończonego nowymi analogami oraz ocenę wpływu modyfikacji na stabilność i poziom translacji w systemie bezkomórkowym i komórkowym, skończywszy na opracowaniu metody włączenia modyfikowanych nukleotydów w obrębie poli(A) i sprawdzeniu wpływu tych modyfikacji na stabilność i poziom translacji mRNA.

W następnych podrozdziałach Autorka przedstawia wyniki badań realizowanych w każdym z etapów dyskutując uzyskane dane. Każdy etap zakończony jest podsumowaniem. Całość tej części zakończona jest kolejnym podsumowaniem, w którym Autorka wskazuje

ponownie skonstruowane przez Nią narzędzia molekularne o potencjalnej skuteczności jako substraty do syntezy mRNA o zwiększonym potencjale translacyjnym, których właściwości potwierdzono w odpowiednich badaniach biologicznych wybierając związki o najlepszych właściwościach.

Jestem pod wrażeniem wielkości ładunku naukowego zaprezentowanych w pracy badań, logiki kolejnych kroków badawczych, systematyczności w dążeniu do zrealizowania celu. Po raz pierwszy spotkałem się z tak całościowym charakterem badań. W mojej ocenie praca znacznie przekracza zawartością wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Trzecia część rozprawy stanowi staranną prezentację wykorzystanych materiałów i zastosowanych metod. Jedyne czego zabrakło w tej części, to informacja o białku eIF4E użytym w badaniach. Z jakiego organizmu pochodziło to białko, na jakim zakresie stężeń wykonywano pomiary wygaszania jego fluorescencji oraz jakiego przyrządu użyto w tych badaniach? Jest to szczególnie ważne ze względu na bardzo duże wartości stałych oddziaływania niektórych ze zsyntetyzowanych przez Autorkę analogów kapu sięgających w kilku przypadkach wartości rzędu prawie 10^9 M^{-1} , co wymagało prowadzenia eksperymentów przy bardzo małych stężeniach zarówno białka jak i kapu. Trudno też zaakceptować enigmatyczny tytuł podrozdziału III.6.14. (str. 215) – „Inne”, czy też tytuł podrozdziału III.7.11. (str. 223) – „Elektroporacja RNA”, bo przecież elektroporacja jest wykorzystaniem pola elektrycznego do tworzenia kanałów w strukturze błony komórkowej, natomiast RNA mogło dzięki tym kanałom przedostać się do wnętrza komórki.

Z obowiązku Recenzenta muszę stwierdzić, że pewną słabością recenzowanej rozprawy jest strona edycyjna. Autorka nie ustrzegła się błędów edytorskich, takich jak sporadyczne błędy ortograficzne, gramatyczne, braku znaków przestankowych, tzw. literówek, czyli brakujących lub niewłaściwych pojedynczych liter w kilkudziesięciu słowach, czy użycia niewłaściwego nazewnictwa lub słownictwa. Kilka z nich wskazuję poniżej, a pozostałe mniej istotne przekażę bezpośrednio Autorce.

Na rysunku 7 (str. 35) w kodonie startowym i kodonach stop umieszczono tyminę (T) zamiast uracylu (U). Na rysunku 12 (str. 42) zostały zamienione miejscami oznaczenia regionów 3' UTR z 5' UTR. W tabeli 8 (str. 102) i tabeli 9 (str.105) w dwóch ostatnich wierszach Autorka umieściła niewłaściwe skróty nazw związków. W przedostatnim wierszu jest $m_2^{7,2'-O}GppsppG \text{ D2}$, a powinno być $m_2^{7,2'-O}GpspppG \text{ D2}$. W wierszu ostatnim jest $m_2^{7,2'-O}GppsppG \text{ D1D2mix}$, a powinno być $m_2^{7,2'-O}GpspppG \text{ D1D2mix}$. Na stronie 124 Autorka użyła określenia „ekspotencjalnie”, a powinno być „eksponencjalnie”. Na stronie 98

(podobnie na str. 110) Autorka używa określenia „analogi ... poddano charakteryzacji”, a przecież chodzi o ich charakterystykę, a nie przygotowanie artysty do występu.

Chciałbym stwierdzić, że wskazane drobne braki i niedociągnięcia nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Bezsporne są osiągnięcia Autorki ocenianej rozprawy, do których przede wszystkim zaliczam: opracowanie innowacyjnych metod syntez nukleotydów modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym grupą tiofosforanową i bis(tiofosforanową), opracowanie metody syntezy trinukleotydowych analogów kapu 0 i kapu 1, opracowanie syntezy modyfikowanych analogów ATP, potwierdzenie, że zsyntetyzowane związki można włączyć do mRNA, które następnie ulega wydajnej translacji *in vitro* znacznie wydajniejszej niż w przypadku niemodyfikowanego kapu oraz zwięźczenie wszystkich wskazanych osiągnięć poprzez wykonanie badań translacji w niedojrzałych ludzkich komórkach dendrytycznych.

W celu realizacji tak szerokiego zakresu badań Autorka musiała opanować bogaty warsztat badawczy, umiejętnie łącząc możliwości chemii organicznej, biologii molekularnej, metod biofizycznych, biochemicznych i biotechnologicznych. W tym miejscu pragnę zauważyć, jak istotna dla Doktorantki była możliwość prowadzenia badań w dużym, interdyscyplinarnym zespole naukowym, bez którego realizacja tak ambitnego celu pracy byłaby niemożliwa. Doktorantka mogła skorzystać z wypracowanych w zespole metod badawczych, świetnego zaplecza aparaturowego, a przede wszystkim, dzięki zrealizowanym przez nią syntezom chemicznym, miała do dyspozycji absolutnie unikalne na świecie analogi 5'-końca oraz 3'-końca mRNA. Co ważne, Autorka pracy potrafiła, w mojej ocenie, właściwie skorzystać z potencjału zespołu, w którym prowadziła badania. Na podkreślenie zasługuje również wykorzystanie przez Doktorantkę świetnie funkcjonującej współpracy międzynarodowej zespołu, co umożliwiło wykonanie badań dotyczących sprawdzenia wpływu nowych analogów kapu na właściwości translacyjne mRNA w warunkach komórkowych. Jako model do badań wybrano ludzkie niedojrzałe komórki dendrytyczne, stanowiące miejsce docelowe dostarczania mRNA w immunoterapiach przeciwnowotworowych.

Publikowanie wyników badań w trakcie realizacji ocenianej rozprawy przyniosło Autorce znakomity dorobek naukowy w postaci czterech publikacji (sumaryczny IF wynosi 22,291) i dwóch publikacji konferencyjnych oraz siedmiu doniesień na konferencjach zagranicznych i krajowych, który prawdopodobnie zostanie jeszcze powiększony, ponieważ jeszcze nie wszystkie wyniki zostały opublikowane.

Sumując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką dr. hab. Jacka Jemielitego, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka rozprawy spełnia zatem z dużą nadwyżką wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, z późn. zm.). Wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność tematyki badań oraz osiągnięcia naukowe Autorki zawarte w ocenianej pracy, które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w terapiach nowotworowych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy mgr Malwiny Strenkowskiej.

Zbigniew Wieczorek