



Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Seksja ds. pracowniczych
Wpłynęło dn. 10.02.16
podpis *Chy*
Prof. dr hab. Barbara Nawrot
Kierownik Zakładu Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Tel. +48-42-6803248, 604-783945
www.cbmm.lodz.pl

Łódź, 8 lutego 2016 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marcina Ziemniaka
p.t. „Nowe syntetyczne analogi kapu mRNA i ich zastosowania w badaniach
biochemicznych i strukturalnych nad kompleksem enzymatycznym degradującym kap
Dcp1/Dcp2 i innymi białkami oddziałującymi z kapem”**

Rozprawa doktorska mgr Marcina Ziemniaka została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w latach 2010-2016, pod kierunkiem dr hab. Jacka Jemielitego, prof. UW.

Przedmiotem rozprawy są zagadnienia związane z syntezą i charakterystyką biofizyczną i biologiczną nowych analogów kapu - dinukleozydopolifosforanowej „czapeczki” znajdującej się na 5'-końcu informacyjnego RNA (mRNA) i odgrywającej zasadniczą rolę w funkcjonalności tego biopolimeru i jego stabilności endonukleolitycznej. Badania związane z pozyskiwaniem związków modelowych, służących do analizy aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm cząsteczki mRNA i narzędzi wykorzystywanych do szerokiego wachlarza badań biochemicznych i strukturalnych stanowią od około 30 lat obszar zainteresowań profesora Edwarda Darżynkiewicza i członków jego Zespołu. Dr hab. Jacek Jemielity, profesor Uniwersytetu Warszawskiego i kierownik Laboratorium Chemii Bioorganicznej w istniejącym przy UW Centrum Nowych Technologii jest uczniem prof. Darżynkiewicza i godnym kontynuatorem jego badań. Z powodzeniem rozwija tematykę „kapu” wprowadzając coraz to nowe modyfikacje chemiczne do struktury tej cząsteczki w celu pozyskania coraz bardziej interesujących obiektów do badań procesów metabolicznych i funkcjonalności enzymów zaangażowanych w oddziaływanie z kapem i z cząsteczką mRNA. Niniejsza rozprawa wykonana pod kierunkiem prof. Jacka Jemielitego stanowi oryginalny wkład do tematyki kapu. Badane zagadnienia nabierają szczególnego znaczenia w świetle odkrycia kolejnych modyfikowanych nukleozydów w cząsteczce mRNA, takich jak m1A czy pseudourydyna, zmieniających, odpowiednio, własności kodujące i termodynamiczne mRNA, a także wykazania, że zmodyfikowane mRNA (zawierające S2U, D, m5C) zabezpieczone opracowanymi w Zespole UW analogami kapu prowadzą do wytworzenia ustabilizowanych cząsteczek mRNA dla zastosowań medycznych.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy:

- A. Ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej
- B. Umiejętność prowadzenia badań naukowych
- C. Oryginalność rozwiązanego problemu naukowego

Swoją ocenę rozpoczynam od, poniekąd krytycznego stwierdzenia, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska jest bardzo obszerna zarówno pod względem zakresu merytorycznego jak i samej edycji. Rozprawa składa się bowiem aż ze 108-stronicowego opracowania literaturowego, a ponadto 67-stronicowego opisu wyników badań własnych połączonych z dyskusją, 2-stronicowego podsumowania oraz 42-stronicowej części eksperymentalnej. Uzupełnieniem opisu jest spis dorobku naukowego Doktoranta oraz spis literatury liczący aż 692 pozycje. Muszę przyznać, że lektura Rozprawy nie była łatwa, bo poza dużą objętością merytoryczną, tekst napisany został czcionką 10 punktów (spis literatury czcionką 8 punktów), a całość pisana z pojedynczą interlinią.

W Części literaturowej Doktorant omawia szeroki zakres zagadnień, od podstaw teoretycznych powszechnie znanych metod spektralnych po głęboką biologię mRNA. Po kolei omawia zagadnienia podstawowe z zakresu struktury, chemii i funkcji biologicznej nukleotydów (rozdział 1.2), podstaw fizykochemicznych technik fluorescencji i fluorescencyjnego znakowania komponentów kwasów nukleinowych (rozdział 1.3). Następnie, opisuje strukturę i dynamikę konformacyjną białek, użyteczne w tych badaniach metody spektroskopowe, wiązanie ligandów do białek oraz metody wyznaczania kinetyki enzymów (rozdział 1.4). Pomimo, że jest to zasadniczo wiedza książkowa, warto tu podkreślić, że Doktorant wzbogacił te informacje o najnowsze doniesienia z literatury przedmiotu, czego potwierdzeniem jest fakt, że z 297 cytowanych w tej części prac aż jedna czwarta to cytowania z lat 2010-2015.

Najciekawsze z punktu widzenia recenzenta są kolejne fragmenty Części literaturowej, które przybliżają tematykę Rozprawy, tj. dotyczą funkcji kapu w komórce (rozdział 1.5) i metod otrzymywania i zastosowania analogów kapu w badaniach biomedycznych (rozdział 1.6). Doktorant szczegółowo omawia biosyntezę kapu i enzymy zaangażowane w jego rozpoznanie, a także dyskutuje mechanizm wiązania reszty 7-metyloguaniny do komponentów białkowych. Poznanie tego mechanizmu po części możliwe było dzięki modelom uzyskanym wcześniej w Zespole UW, za pomocą których wykazano m.in. że obecność grupy metylowej w pozycji 7 pierścienia guaniny zwiększa 100-krotnie powinowactwo m7G do komponenta białkowego w porównaniu z G. Kolejno omawia też mechanizm regulacji stabilności mRNA w komórkach eukariotycznych wskazując na szczególną rolę w tym procesie fragmentu kapu i enzymów dekapujących mRNA. Wskazuje przy tym, że w ostatnich latach w organizmach eukariotycznych odkryto kolejne enzymy uczestniczące w tym procesie. Szczegółowo omawia strukturę białek hydrolizujących kap, takich jak Dcp2, kompleks Dcp1/Dcp2 i DcpS. Następnie prezentuje przykładowe analogi kapu zawierające modyfikacje w łańcuchu fosforanowym, w pozycjach mostkowych jak i niemostkowych (w sumie 33 różne związki), omawia metody syntezy oligofosforanów poprzez pochodne imidazolowe oraz metody ich oczyszczania i charakterystyki spektralnej. Podsumowuje zastosowania analogów kapu do badań biochemicznych i medycznych, podkreślając dla tych ostatnich niezwykłą użyteczność analogów ARCA oraz beta-S-ARCA, opracowanych wcześniej w Zespole prof. Darżynkiewicza. Finalnie, Część literaturową kończy rozdział (1.7) omawiający podstawy technik eksperymentalnych stosowanych w pracy doktorskiej. *De facto*, Część literaturowa mogłaby być, z korzyścią, ograniczona do rozdziałów 1.5-1.7.

Głównym celem badań wchodzących w skład Rozprawy doktorskiej była synteza modyfikowanych w obrębie łańcucha fosforanowego analogów nukleotydów m7G, tj. m7GDP i m7GTP, oraz analogów kapu m7Gpppm7G, także znakowanych fluorescencyjnie w

reszcie cukrowej. Związki te miały być zastosowane jako narzędzia do badań biologicznych, jako analogi substratów lub inhibitory enzymów dekapujących Dcp1/2 oraz DcpS. Celem było także zbadanie procesów degradacji mRNA.

Zadania syntetyczne zostały przez Doktoranta zrealizowane w sposób profesjonalny, z wykorzystaniem znanych metod aktywacji wiązania fosforanowego i wydłużania łańcucha fosforanowego. Najbardziej ciekawe z syntetycznego punktu widzenia było opracowanie / udoskonalenie metody syntezy zaktywowanych imidazolem syntonów grupy fosforanowej (związek **36**) lub pirofosforanowej, także modyfikowanej grupą metylenową lub amidową w pozycji mostkowej (związki, odpowiednio, **52**, **53** i **54**). Związki te wykorzystano do reakcji sprzęgania z monofosforanem guanozyny, często najpierw metylowanej w pozycji N7. Niestety, niepowodzeniem zakończyły się próby wykorzystania w tej reakcji związku **55** (z mostkiem dichlorometylenowym), który okazał się całkowicie niereaktywny w zastosowanych warunkach. Czy można racjonalnie wytłumaczyć obserwowany efekt? Proszę o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w trakcie publicznej obrony. Kolejno, Doktorant inteligentnie wyselekcjonował, odpowiedni do zaplanowanych badań biologicznych, niewielkich rozmiarów znacznik fluorescencyjny (grupę antranoilową lub N-metylo-antranoilową), który wprowadził do pięciu mononukleotydowych analogów kapu i do pięciu analogów cząsteczki m7GpppG. Otrzymane związki w każdym przypadku były oczyszczane i, jeśli były to mieszaniny diastereomeryczne (jak w przypadku pochodnych tio- i boranofosforanowych), rozdzielane na diastereochemicznie czyste indywidua chemiczne za pomocą semipreparatywnej techniki HPLC w odwrotnej fazie. Struktury związków zostały potwierdzone za pomocą metod analizy spektralnej (^1H i ^{31}P NMR, UV-VIS, spektroskopii fluorescencyjnej, spektrometrii mas). Analiza porównawcza przesunięć chemicznych H8 i H3' reszty guanozyny, oraz mobilności chromatograficznej była tutaj podstawą przypisania konfiguracji absolutnej na stereogenicznych atomach fosforu w pochodnych alfa-tiofosforanowych **14** i **15** oraz alfa-boranofosforanowych **16** i **17**. Dlaczego nie zbadano specyficzności substratowej badanych związków (przynajmniej analogów siarkowych) w stosunku do stosowanych w takich przypadkach nukleaz: Rp-specyficznej fosfodiesterazy z jadu węża (svPDE) i Sp-specyficznej nukleazy P1 (nP1)? Absolutnym dowodem byłoby oczywiście zbadanie struktury przestrzennej poszczególnych diastereomerów za pomocą metod NMR lub krystalograficznych, ale wiadomo, że chemia kwasów nukleinowych ma tutaj ograniczenia co do możliwości pozyskania wymaganej ilości materiału. Autor wykonał kilka innych badań biochemicznych, takich jak stabilność niektórych pochodnych w obecności FBS czy enzymu dekapującego DcpS. Wyniki tych badań dostarczyły wskazówek co do absolutnej konfiguracji stereogenicznych atomów fosforu w związkach **16** i **17**.

Końcowy fragment Badań Własnych to omówienie właściwości biofizycznych, biochemicznych i biologicznych niektórych uzyskanych związków. Ewaluacja ta była wykonana zarówno przez Doktoranta, jak i przez inne osoby z Zespołu i z Laboratoriów współpracujących. Uzyskano szereg interesujących wyników, potwierdzających wyniki otrzymane uprzednio, ale także dostarczając nowych danych, wnoszących wkład do wiedzy podstawowej zarówno w zakresie chemii jak i biologii kwasów nukleinowych.

Najbardziej cenne wyniki oryginalne, uzyskane przez Doktoranta to wykazanie m.in., że analogi Mant-dinukleozydotrifosforanów (w tym przypadku Mant-m7GpppG, zw. **19**) stanowią użyteczne sondy molekularne do badań przesiewowych w poszukiwaniu inhibitorów białka DcpS. Kilka nowych analogów m7GDP i m7GTP okazało się być silnymi inhibitorami tego enzymu. Wykazano też, że związki **14-17** silniej wiążą się co czynnika

inicjacji translacji eIF4E niż pozbawione modyfikacji w mostku fosforanowym (Tabela 2.10), zwłaszcza, jeśli tylko jedna reszta guanozyny jest zmetylowana. W teście stabilności kapowanych transkryptów mRNA wobec kompleksu SpDcp1/2 i w obecności serii 29 nukleotydów, w większości zsyntetyzowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wyselekcjonowano kilka silnych inhibitorów białka Dcp2, a związek **14b** użyto do zaawansowanych badań kinetycznych. Sukcesem zakończyło się też badanie, za pomocą metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS), zmiany konformacji kompleksu enzymu dekapującego Dcp1/2 w obecności diastereoizomeru D3 związku **14b** oraz jego 2'-OMe pochodnej. Doktorant wykorzystał metodę NMR do zbadania oddziaływań białka Dcp2 z inhibitorem **14b**, a uzyskane wyniki zostały po części zweryfikowane metodą krystalografii. Wykorzystanie odpornych na degradację nukleolityczną analogów kapu zaprezentowano na przykładzie badania metabolizmu mRNA kodującego białko/białka histonowe w warunkach komórkowych. Uzyskano szereg cennych informacji poszerzających wiedzę w zakresie degradacji i metabolizmu mRNA. Szczególnie cenne jest odkrycie niskocząsteczkowego inhibitora białka Dcp2 w kontekście zrozumienia procesu dekapowania mRNA i, ewentualnie, przyszłych badań nad opracowaniem analogów kapu o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym.

Rozdział Materiały i Metody jest napisany zwięźle, opisom syntez i podstawowych danych fizykochemicznych towarzyszą wzory strukturalne związków, co znakomicie ułatwia analizę tej części Rozprawy.

Na podstawie przedstawionych powyżej osiągnięć stwierdzam, że Doktorant wykazał się ogólną wiedzą w uprawianej dziedzinie naukowej, umiejętnością prowadzenia badań naukowych i oryginalnością rozwiązania problemu naukowego.

Uwagi merytoryczne: Podpisy pod schematami 1.8 i 1.9 zostały zamienione; w opisie pracy powinna być zamieszczona uwaga dotycząca nazwy eksosom (naprzemiennie pisanej również jako egzosom, lub exosom), że chodzi tutaj o kompleks białkowy degradujący RNA, w przeciwieństwie do „eksosomu/egzosomu” oznaczającego pęcherzyki wydzielane z komórek; niepoprawnie zdefiniowano analogi metyleno-bis-fosfonianowe czy imido-bis-fosforanowe jako analogi kapu, do których wprowadzono grupy funkcyjne w „mostkowe atomy tlenu” (97); niepoprawnie podano nr. Rysunku na str. 106, zamiast 1.54 jest 1.53; na stronie 112 napisano, że ^{31}P jest radioaktywny, a chodzi tutaj o izotopy ^{32}P lub ^{33}P ; podobnie - nie ^{15}S a ^{35}S czy ^{125}I zamiast ^{125}I . Błędnie podany jest nr. Rysunku na stronie 116 - 1.56 zamiast poprawnie 1.57. Dla związku m7GGpNHp prawdopodobnie niepoprawnie podano zarówno obliczoną jak i wyznaczoną wartość ESI MS (206); Proszę o wytłumaczenie, jak wyprowadzono wzory do wyznaczania populacji konformerów N i S dla pierścienia D-rybozy, cytowane na stronie 226. Z mojego doświadczenia wynika, że najlepszym sposobem dla wyliczenia frakcji S jest tutaj zastosowanie równania $X_S = J_{H1'H2'}/(J_{H3'H4'} + J_{H1'H2'})$, oczywiście frakcja N stanowi uzupełnienie do 100%.

Mam też uwagi krytyczne dotyczące samej edycji Rozprawy, do której wkradło się sporo błędów gramatycznych, stylistycznych, literówek i niezręczności. Np. „obieg mRNA” jako *turnover* (strona 13), „poczwórna pętla” dla *tetra loop* zamiast czteronukleotydowa pętla (13), „szkielet fosforowy” zamiast fosforanowy (18), „intermediat” zamiast w tym przypadku „stan przejściowy” (23), „przy pomocy grupy metylenowej” (25), czy „przy pomocy dwuwymiarowych eksperymentów” zamiast „za pomocą...” (53), boronacja czy

borowodorowanie (32)?, środek „boranujący”? (33), „grupa antranilowa” zamiast antranoilowa (45, 109), „kompakcja struktury” - co oznacza to wyrażenie?? (90), czy powinno się mówić „charakteryzacja nukleotydów” (102) czy też „charakterystyka nukleotydów?”, „estymowane czasy półtrwania”? (156), „kartridż”? (229). Niedociągnięcia te wymagają poprawy, ale nie umniejszają wartości merytorycznej samej Rozprawy.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy badań interdyscyplinarnych, bowiem z jednej strony stanowi cenny wkład do rozwoju metod syntezy i charakterystyki analogów naturalnych kwasów nukleinowych, a z drugiej strony pokazuje użyteczność wytworzonych związków do badań z zakresu biologii komórkowej i strukturalnej.

Doktorant jest współautorem siedmiu publikacji opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej o znaczącym IF (>35), w tym w czterech jako pierwszy autor, oraz 3 publikacji w materiałach konferencyjnych (we wszystkich jako pierwszy autor). Jest to dorobek świadczący o dużym zaangażowaniu Doktoranta w prowadzone badania naukowe, jednocześnie wskazujący na dużą nośność uprawianej tematyki badawczej.

Z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Marcina Ziemniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań oraz wagę uzyskanych rezultatów naukowych, wnioskuję o wyróżnienie Rozprawy. Szczególnie, na wyróżnienie zasługuje opracowanie syntezy tetrafosforanowych analogów kapu (związki **14-17**), ich rozdział na czyste diastereomery i wykorzystanie tych związków do badań przesiewowych w celu identyfikacji efektywnych inhibitorów białka dekapującego Dcp2. Wyselekcjonowane pochodne tiofosforanowe i boranofosforanowe stanowią atrakcyjne narzędzia molekularne do badań nad procesami degradacji i obrotu mRNA w komórce, a także do badań strukturalnych. Doktorant na podstawie uzyskanych danych kinetycznych i strukturalnych zaproponował ogólny mechanizm działania inhibitorów Dcp2.

W konkluzji stwierdzam, że uzyskane przez Mgr Marcina Ziemniaka wyniki, wchodzące w skład Rozprawy doktorskiej zasługują na wyróżnienie.

Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Łódź, 8 lutego 2016 r.