



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Łódź, dn. 15.11.2024



Dr hab. inż. Katarzyna Błażewska, prof. uczelni

Instytut Chemii Organicznej

Wydział Chemiczny

Politechnika Łódzka

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR AGNIESZKI MŁYNARSKIEJ-CIEŚLAK PT. „Nowe analogi kofaktorów adeninowych jako narzędzia do badania procesów biologicznych – synteza, badanie właściwości i zastosowania”

Pani mgr Agnieszka Młynarska-Cieślak wykonała pracę doktorską pod opieką dr hab. Joanny Kowalskiej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Zasadność podjętej tematyki

Głównymi bohaterami recenzowanej pracy doktorskiej są cząsteczki oparte na nukleotydach adeninowych, a dokładnie kofaktory adeninowe. Mnogość funkcji tych analogów, w tym duży obszar niezbadanych jeszcze zastosowań sprawia, że poszukiwane są narzędzia do badań strukturalnych i funkcjonalnych enzymów rozpoznających analogi adeniny. W przedstawionej mi do recenzji pracy, Autorka skupiła się na zaprojektowaniu, syntezie i biologicznej ewaluacji analogów kofaktora dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD) i kofaktora 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny (PAPS). O znaczeniu podjętych badań świadczy pięć publikacji, w bardzo dobrych czasopismach, które poprzedziły napisanie tej rozprawy. W trzech z nich Doktorantka jest pierwszą Autorką.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Praca liczy 142 strony, zawiera 127 odnośników literaturowych i składa się z siedmiu rozdziałów, przy czym Przegląd literaturowy, Metodyka Badań, Badania własne, Część Eksperymentalna stanowią główne elementy rozprawy.

W przeglądzie literaturowym Autorka wylicza szereg funkcji/procesów w jakie zaangażowane są cząsteczki wybranych kofaktorów adeninowych, w tym zaznacza ich rolę i znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Doktorantka krótko charakteryzuje wybrane metody badania ST, takie jak znakowanie radioizotopowe, fluorescencyjne, spektrometria mas.

ul. Żeromskiego 116, 90-543 Łódź, budynek A27

tel. +48 42 631-31-40, w3i32@adm.p.lodz.pl

Adres do korespondencji:

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

Rozdział *Metodyka badań* jest dla mnie nieco zagadkowy. Cenię sobie informacje na temat wybranych aspektów syntezy (rozdział 4.1. Synteza chemiczna), lecz moim zdaniem bardziej pasują one do rozdziału *Badania własne*. Zabrakło mi tu schematu obrazującego metody otrzymywania PAPS. Drugą część tego rozdziału stanowi opis podstaw teoretycznych techniki NMR. Uważam, że z korzyścią dla pracy byłoby zastąpienie tego opisu aspektami NMR bezpośrednio związanymi z pracą syntetyka, np. zastosowaniem techniki NMR w celu oceny postępu reakcji i identyfikacji produktów reakcji. Przesunięcia chemiczne w ^{31}P NMR związków fosforu, tak różnie modyfikowanych, stanowią niesamowicie bogate źródło informacji. Z pracy można wnioskować, że Autorka swobodnie z tej wiedzy korzysta, o czym świadczyć może klarowna tabela przesunięć chemicznych ^{31}P NMR zawarta w jednej z publikacji Autorki. Chciałabym jednocześnie zaznaczyć, że choć odnoszenie się do podstaw techniki NMR uważam za zbędne, z drugiej strony trzecia część tego podrozdziału, wprowadzająca informacje nt. termoforezy mikroskalowej jest dla mnie cenna, bo nie jest to rutynowa technika chemika syntetyka.

Przechodząc do *Badan własnych*: na początku chcę podkreślić, że Autorka bardzo pieczołowicie informuje czytelnika, która część badań została wykonana przez Nią, a która przez współpracowników, co sobie bardzo cenię.

Pierwsza część badań własnych dotyczyła analogów kofaktora dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD), które byłyby odporne na enzymy odpowiedzialne za odcięcie NAD. W związku z powyższym w dalszej części badań określano stabilność tych związków wobec egzonukleazy DXO i pirofosfataz, Nudt12 i NudC, które rozpoznają ten motyw strukturalny na końcu 5'-RNA.

Autorka zsyntezowała sześć analogów, w tym dwa w postaci pary diastereoizomerów. Opierając się na wcześniejszych badaniach, Autorka zamierzała zwiększyć stabilność analogów NAD przez zastąpienie atomu tlenu w mostkach fosforanowych atomem siarki. Dodatkowo, dwa analogi zostały sfunkcjonalizowane w pozycji 2' grupą metylową, co zwiększyło ich odporność na działanie fosfodiesterazy DXO. Podjęto też próbę wbudowania otrzymanych analogów NAD na końcu 5' RNA (we współpracy z Panią Ewą Grudzień-Nogalską) metodą transkrypcji in vitro (IVT), przy czym okazało się, że trinukleotydowe analogi NAD dawały produkty kapingu z wyższymi wydajnościami. Kolejno, związki NAD-RNA badano pod kątem stabilności względem wybranych enzymów. Rysunek 21, który wydaje się być kopią rysunku z oryginalnej publikacji (*Org. Lett.* **2018**, 7650, Fig. 4) i powiela znajdujący się tam błąd, tj. opisy żeli w części A rysunku 4 zostały błędnie podpisane skrótami analogów trinukleotydowych, zamiast dinukleotydowych, co nieco utrudnia analizę tych danych. Na podstawie badań, Autorka wytypowała analogi NAD, które zmieniają stabilność pochodnych NAD-RNA na działanie DXO, na działanie pirofosfataz lub na działanie obu typów enzymów.

Druga część pracy dotyczyła syntezy analogów kofaktora 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny (PAPS) i ewaluacji ich jako narzędzi molekularnych do badania sulfotransferaz (ST). Ponadto, otrzymano analogi PAPS o potencjalnym działaniu inhibitorowym względem ST. Jako modelowych sulfotransferaz użyto roślinnej AtSOT18 i ludzkiej SULT1A3, a ich dobór został jasno uzasadniony. Autorka w sposób systematyczny badała wpływ modyfikacji PAPS/PAP w trzech głównych elementach strukturalnych na ich aktywność, proponując modyfikacje na podstawie struktur krystalograficznych i analizy możliwości syntetycznych

W pierwszej kolejności (str. 57-69) Autorka zsyntezowała 18 analogów PAPS/PAP (zgodnie z rys. 25; Autorka pisze na str. 69, że było ich 19?) spośród planowanych 21

związków. Autorka otrzymała związki modyfikowane w części zasady heterocyklicznej w pozycjach C2, C8, N6, na rybozie (2') i w części fosfosiarczanowej. Poszczególne pozycje modyfikowano grupami zawierającymi atom fluoru (by umożliwić ich detekcję za pomocą NMR) lub grupami bioortogonalnymi (by umożliwić późniejsze znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym lub biotyną), lub wprowadzając takie zmiany strukturalne, które miały zmieniać trwałość i rozmiar reszty fosfosiarczanowej. Część syntetyczna jest napisana zwięźle i ciekawie. Zestawienie widm związków i diagnostycznych sygnałów w widmach ^1H NMR (rys. 28 i 29, str. 61) jest bardzo czytelne, natomiast widmo ^{31}P NMR (rys. 29) zyskałoby na czytelności, gdyby sygnały zostały przypisane do atomów fosforu (patrz uwaga wyżej).

Autorka poszukiwała metod na wyznaczenie powinowactwa, właściwości substratowych bądź inhibitorowych otrzymywanych związków. W pierwszej kolejności Autorka użyła uzupełniających się metod, HPLC i ^{19}F NMR, do śledzenia postępu reakcji z modelowymi ST. Autorka mogła obserwować zarówno zanik substratu jak i pojawianie się produktu reakcji (zależnie od użytego enzymu była to albo sinigrina albo siarczan dopaminy) jak również ubytek analogu PAPS i tworzenie się analogu PAP. W ramach optymalizacji metody z użyciem ^{19}F NMR, Autorka badała, czy sygnały pochodzące od fluorowanych analogów PAPS i PAP umożliwią detekcję ich zmian za pomocą widm ^{19}F NMR. Autorka wykazała, że separację pików można poprawić zmieniając pH roztworu i/lub denaturując białko. Autorka wykazała, że trzy fluorowane analogi mogą być narzędziami do badania ST, choć wykazują różną selektywność względem badanych enzymów oraz różną „wrażliwość” sygnałów w ^{19}F NMR na warunki pomiaru.

Warto zaznaczyć, że opracowaną metodę Autorka wykorzystała do wykonania testów przesiewowych aktywności względem SULT1A3. Do tego celu wykorzystała zsyntezowany analog 8- CF_3 -PAPS i komercyjnie dostępną bibliotekę LOPAC®1280, selekcionując do samego eksperymentu 59 związków o podobieństwie strukturalnym do adenozyiny i dopaminy. Autorka zidentyfikowała 3 inhibitory, przy czym jeden potwierdzony już wcześniej w literaturze, co dodatkowo waliduje opracowaną metodę. Narzuca się pytanie, z mojej ciekawości, na które Doktorantka z racji ukończenia już badań nie musi znać odpowiedzi: czy dwa nowe potencjalne inhibitory stanowiły zaczątek do dalszych prac w zespole Pani Promotor?

Podsumowując tę część badań, Autorka opracowała pierwszą metodę opartą na wykorzystaniu ^{19}F NMR do określania aktywności enzymów z grupy ST. Tabela 4 stanowi bardzo pomocne kompendium nt. możliwości wykorzystania trzech fluorowanych analogów do tego celu. W pracy zabrakło mi analogicznego porównania z konkurencyjnymi metodami, np. radioizotopową, z uwzględnieniem stężeń białek. Proszę Autorkę o pokazanie tego w trakcie obrony.

W kolejnej części Autorka wykorzystała metodę termoforezy mikroskalowej (MST) do określenia powinowactwa małowymagających ligandów do ST, próbując określić jaki wkład do powinowactwa do ST mają poszczególne elementy strukturalne PAPS. Autorka w pierwszej części skupiła się na optymalizacji warunków pomiarowych. Następnie badała powinowactwo 29 lub 21 związków (w zależności od enzymu) techniką MST, określając wartość K_D . Autorka zauważyła, że wartość K_D zmienia się w zależności od tego, czy w eksperymencie użyto substratu enzymu, co uzasadniła możliwą zmianą konformacji enzymu.

Na podstawie badań techniką MST dla enzymu AtSOT18, z wykorzystaniem analogów posiadających różne ilości grup fosforanowych w pozycjach 5' i 3', Autorka postawiła

hipotezę, że grupa fosforanowa w pozycji 3' jest niezbędna w strukturze kofaktora, zwiększając konkurencyjność tego substratu względem ADP, cząsteczki występującej w komórce w dość wysokim stężeniu. Natomiast sama grupa siarczanowa ma niewielki wkład w stabilizację kompleksu, a jej zastąpienie grupą fosforanową lub pirofosforanową daje analogi o zbliżonej wartości K_D względem AtSOT18. Natomiast wprowadzenie stabilnego ugrupowania metylenobisfosfonianu w pozycję 5' skutkowało znaczącym obniżeniem powinowactwa. Dalsze modyfikacje ugrupowania w pozycji 5' (włączenie atomu F lub wprowadzenie grup bioortogonalnych) skutkowało obniżeniem powinowactwa w porównaniu z PAPS. Autorka zsyntezowała również analogi innych zasad, guaniny i cytozyny, stwierdzając, że optymalnym substratem dla AtSOT18 jest adenina. Najmniej korzystną pozycją do wprowadzenia modyfikacji była pozycja C2 i okazała się też taką dla ludzkiej ST, SULT1A3.

Następnie Autorka zajęła się badaniem powinowactwa otrzymanych analogów do ludzkiej sulfotransferazy, SULT1A3. Modyfikacje w obrębie reszty fosfosiarczanowej miały podobny efekt jak dla AtSOT18. Analog 2'-F-PAP wykazywał znaczne obniżenie powinowactwa względem SULT1A3 w porównaniu z dość wysokim powinowactwem do AtSOT18. Natomiast wprowadzenie w tej pozycji pięciowęglowej, liniowej grupy bioortogonalnej dawało podobne wartości K_D względem obydwu badanych ST.

Przyznam, że ostatnią część pracy odbieram jako najmniej uporządkowaną. Nie mam jasności, ile związków Autorka zsyntezowała, jak te związki zostały podzielone na różne grupy i na ile się te grupy na siebie nakładają (na stronie 69 czytam o 19 związków, na stronie 98 Autorka wspomina o 28 związkach). Zabrakło mi tutaj przedstawienia wyników w sposób bardziej systematyczny, czasem z wykorzystaniem tak prostego narzędzia jak podsumowanie rysunkowe, np. w celu pokazania swego rodzaju SAR względem każdego z enzymów. Chcę zaznaczyć, że prezentacja wyników w publikacjach Autorki jest bardzo czytelna i szkoda, że Autorka zastosowanej tam strategii i włożonej pracy nie wykorzystwała w pełni w doktoracie.

W trakcie obrony, poza uwagami, które zawarłam w powyższym tekście, chciałam prosić Doktorantkę o skomentowanie następujących punktów:

- 1) Autorka wprowadza reakcję Yoshikawy jako metodę fosforylacji nukleozydu. Nasuwa się pytanie: czemu służy selektywna fosforylacja najpierw pozycji 5'-O-nukleozydu, a potem dopiero 3'/2'?
- 2) Str. 58: 8-fluoroadenozyna jest podatna na depurynację. Ciekawi mnie opinia Doktorantki, dlaczego do depurynacji dochodzi i który etap syntezy (a może biologicznej ewaluacji?) najbardziej na ten proces naraża.
- 3) Str. 49: jaką rolę pełni NaClO_4 przy strącaniu soli sodowej?
- 4) Odnosząc się do podsumowań ze str. 55 i 99 dotyczących potencjalnych zastosowań opracowanych narzędzi: czy Doktorantka mogłaby nieco bardziej szczegółowo odnieść się do wybranych punktów? Przykładowo, jak można zastosować otrzymane analogi NAD do identyfikacji białek efektorowych, które rozpoznają 5'-koniec NAD-RNA.
- 5) Czy wyniki K_D , dla których nie ma wskazanej wartości błędu lub gdy błąd dorównuje wartości K_D są materiałem publikacyjnym? Tutaj rodzi się też pytanie: jakiego rzędu wartości K_D Autorka uznałaby za satysfakcjonujące do zakwalifikowania związku jako narzędzia do dalszych badań ST?

Z powinności recenzenta poniżej przytaczam kilka uwag ogólnych i edytorskich:

- 1) Zabrakło mi numerycznego opisu związków. Np. w części eksperymentalnej łatwiej byłoby się odnosić do substratów reakcji po numerze, a nie po nazwie, nawet jeśli w wielu przypadkach (ale nie wszystkich, patrz str. 120) dotyczy to nazwy związku syntezowanego w poprzednim etapie reakcji. Sposób przedstawienia związków w jednej z publikacji (numer plus skrót) byłby najoptymalniejszy moim zdaniem.
- 2) W skrótowym zapisie pojawiły się drobne błędy, np. NppApG (w skrócie brak S, na rysunku jest S), NppsAmpG (rys. 19B, str. 51 w skrócie jest S przy Npp, podczas gdy na rysunku jest to przy fosforanie 3'); rys. 37, skrót 2-O-pen-PsAPs.
- 3) Str. 43: sformułowania „16 niezależnych roztworów będących seryjnymi rozcieńczeniami liganda (stężenie wzrasta logarytmicznie)” czy też na str. 72: wyrażenie „reakcja nie biegnie” są zbyt dużym skrótem myślowym.
- 4) Str. 53: Intryguje mnie, co Autorka rozumie przez zdanie „Analog posiadający atom siarki w pozycji 5' (Npp-5'S-A) również był podatny na działanie DXO i wykazywał właściwości zbliżone do naturalnego NAD-RNA pomimo zauważalnej niejednorodności RNA w punkcie czasowym 0.”
- 5) Str. 68: użyto 0.6 M roztworu. Czego? TEAB? Na rys. 41 jest 50% TEAB.
- 6) Str. 75, rys. 46: sposób nałożenia widm utrudnia stwierdzenie zmian intensywności pików (rys. 1, 2-F-PAPS).
- 7) Str. 84: numer podrozdziału 5.4.3 jest błędny.
- 8) Str. 90: w tekście napisano, że powinowactwo większe dla ATP względem AMP 3.5 razy, podczas gdy porównując wartości z rys 55: ta różnica jest znacznie większa, 28 razy.

Chcę podkreślić, że moje uwagi i komentarze nie podważają wysokiej oceny wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy.

Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca jest projektem interdyscyplinarnym, zawierającym niezwykle bogaty materiał eksperymentalny, w którym Autorka zajmowała się nie tylko syntezą odpowiednio zaprojektowanych analogów NAD, PAP, PAPS, ale również ich charakterystyką z wykorzystaniem testów biofizyczno-biochemicznych i biologicznych. Wyniki tych badań są bardzo wartościowe. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki zostały opublikowane w pięciu wysoko punktowanych w rankingach międzynarodowych czasopismach, a Autorka w trzech z tych publikacji pełni rolę wiodącą. Stwierdzam, że Doktorantka trafnie wybrała tematykę badań, jasno sformułowała cel pracy, dobrze zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością interpretacji i dyskusji wyników, a także umiejętnie sformułowała podsumowanie pracy, które wzbogaciła pytaniami, na które chciałaby jeszcze odpowiedzieć. Bardzo sobie cenię tę część pracy, bo pokazuje nie tylko wagę podjętych badań, ale również zaangażowanie i pasję Doktorantki do nauki.

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy.

K. Białoch

