

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Lublin, 16 listopada 2024 r.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Młynarskiej-Cieślak pt. „Nowe analogi kofaktorów adeninowych jako narzędzia do badania procesów biologicznych – synteza, badanie właściwości i zastosowania”

Dynamiczny rozwój badań w dziedzinach chemii biologicznej i bioinżynierii molekularnej stawia przed naukowcami wyzwania związane z coraz głębszym poznawaniem procesów biochemicznych na poziomie molekularnym. Aby sprostać tym wyzwaniom, kluczowe staje się projektowanie nowych narzędzi molekularnych oraz opracowywanie innowacyjnych technik syntezy związków, które umożliwiają badanie funkcji enzymów, kofaktorów oraz ich analogów. W biologii i medycynie szczególne znaczenie mają badania nad precyzyjnym śledzeniem interakcji między białkami, kwasami nukleinowymi i innymi cząsteczkami biologicznymi. Zaawansowane techniki biochemiczne, do których należy spektroskopia NMR, czy też inna, a również wykorzystana w rozprawie - metoda fluorescencji, nie tylko umożliwiają badanie aktywności enzymów w warunkach *in vitro*, ale także pozwalają na analizę ich dynamiki oraz oddziaływań z substratami, co ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów regulujących funkcjonowanie komórek.

W tę perspektywę badań doskonale wpisują się eksperymenty opisane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Agnieszki Młynarskiej-Cieślak. Głównym celem jej pracy było

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



opracowanie nowych metod syntezy, które umożliwiają wprowadzanie specyficznych modyfikacji w strukturze kofaktorów adeninowych, takich jak dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD) i 5'-fosfosiarczan 3'-fosfoadenozyny (PAPS). Otrzymane związki mogą być dalej wykorzystywane jako narzędzia do badania aktywności enzymatycznej, na przykład w kontekście interakcji z sulfotransferazami oraz enzymami rozpoznającymi końce RNA. Takie podejście pozwala na dokładniejszą molekularną charakterystykę kofaktorów, co z kolei umożliwia formułowanie nowych hipotez badawczych, które można testować na wybranych układach enzymatycznych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej jest niezwykle interesująca i ma duże znaczenie dla dalszego rozwoju badań nad procesami biochemicznymi na poziomie molekularnym, co stanowi istotny wkład w naukę.

Rozprawa doktorska powstała pod opieką dr hab. Joanny Kowalskiej, cenionej specjalistki w badaniach nad biologicznymi właściwościami modyfikowanych nukleotydów, w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Część badań eksperymentalnych została przeprowadzona we współpracy z Laboratorium Chemii Biologicznej Centrum Nowych Technologii, w ramach partnerskiej kooperacji.

Doktorantka rozwijała swoje umiejętności badawcze, uczestnicząc w projekcie Sonata Bis (UMO-2015/18/E/ST5/00555), finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w licznych prestiżowych czasopismach międzynarodowych. Prace te wyróżniają się zróżnicowanymi wartościami współczynnika wpływu (tzw. *impact factor*), m.in.: czasopismo *Plant Physiology and Biochemistry* (IF 2,686), gdzie Doktorantka jest czwartym w kolejności autorem; *Chemistry - A European Journal* (IF 5,020) oraz *Nucleic Acid Research* (IF 16,971), gdzie pełni odpowiednio rolę drugiego i trzeciego w kolejności autora. Ponadto, dwie publikacje ukazały się w *Organic Letters* (IF 6,555) oraz *ACS Chemical Biology* (IF 4,0), w których Doktorantka figuruje jako pierwszy autor. Analiza rozprawy oraz kolejność autorów w publikacjach źródłowych wskazuje na kluczową rolę Doktorantki w powstanie tych prac.



Praca doktorska ma formę klasyczną, z podziałem na typowe dla prac eksperymentalnych rozdziały i liczy 142 strony. Rozprawę rozpoczyna *Spis publikacji*, następnie *Podziękowania*, *Spis treści*, *Wykaz skrótów*, *Wprowadzenie* oraz *Metodyka badań*. Rozdziały wstępne opisane zostały w sposób zwięzły i klarowny zaś opisy metodyczne, na tyle szczegółowo (dodatkowo, uzupełnione o szczegóły przeprowadzonych syntez w rozdziale 6, w *Części eksperymentalnej*), iż umożliwiają odtworzenie analogicznych eksperymentów, pomijając fakt, iż obszerne opisy procedur eksperymentalnych dostępne są również w odpowiednich sekcjach oryginalnych prac źródłowych. Rozdział 5, zatytułowany „*Badania własne*” zawiera jasno zdefiniowany cel badań oraz bezpośrednie odniesienia do szczegółowych ich wyników. Uważam, że ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana, a jej największą zaletą są niezwykle interesujące i wartościowe wyniki eksperymentalne. Można je podzielić na trzy główne grupy, z których każda dotyczy syntezy i oceny nowych analogów kofaktorów.

W pierwszej części skupiono się na badaniach nad analogami kofaktora NAD oraz ich interakcjach z wybranymi enzymami, takimi jak DXO i Nudt12, które rozpoznają struktury na końcu 5'-RNA. W ramach tych badań opracowano trzyetapowy proces syntezy, który obejmował chemiczną hydrolizę dostępnego komercyjnie NAD, aktywację nukleotydu nikotynamidowego oraz reakcję sprzęgania dwóch jednostek fosforanowych. Dzięki temu podejściu udało się uzyskać szereg różnych analogów NAD, z których część powstało we współpracy z dr Anaïs Depaix. Ta, i inne nawiązane współprace m.in. Ewą Grudzień-Nogalską, świadczą o otwartości Doktorantki na zawieranie kooperacji naukowych, mających na celu realizację postawionych sobie celów badawczych. W toku badań pani Młynarska-Cieślak określiła, że analogi NAD można skutecznie wbudować na końcu 5'-RNA przy użyciu procesu transkrypcji *in vitro*, a co więcej, trinukleotydowe analogi NAD były bardziej efektywnie włączane, niż ich dinukleotydowe odpowiedniki. Ponadto, w trakcie badań zidentyfikowano kilka związków o szczególnych właściwościach, w tym jeden, który był oporny na działanie enzymów pirofosfataz Nudt12 i NudC (NppSA), oraz inny (NppAmpG), który wykazywał oporność na aktywność egzonukleazy DXO. Ostatecznie odkryto cztery związki o zwiększonej odporności na działanie trzech różnych enzymów.



Druga grupa dotyczyła syntezy analogów kofaktora PAPS oraz ich oceny jako potencjalnych narzędzi molekularnych do badań nad sulfotransferazami. W ramach tej części badań opracowano i zoptymalizowano proces syntezy analogów PAPS z modyfikacjami w zakresie zasady azotowej, a następnie z wykorzystaniem metody HPLC, oceniono aktywność tych analogów wobec dwóch modelowych sulfotransferaz: roślinnej AtSOT18 oraz ludzkiej SULT1A3. Badania wykazały, że roślinna sulfotransferaza była aktywna wobec dwóch analogów, natomiast trzeci nie wykazywał żadnych właściwości substratowych. Ludzka sulfotransferaza była aktywna wobec wszystkich badanych związków, choć w niektórych przypadkach analiza kinetyki była utrudniona ze względu na nakładanie się sygnałów substratu i produktu. Najważniejszym osiągnięciem w tej grupie badań było opracowanie metody służącej do bezpośredniego pomiaru aktywności sulfotransferaz przy użyciu techniki NMR. Dodatkowe testy potwierdziły stabilność badanych analogów przez co najmniej 19 godzin.

W trzeciej grupie badań podjętych przez Doktorantkę skupiono się na opracowaniu metody wyznaczania stałej dysocjacji dla analogów PAPS oraz modelowych sulfotransferaz, wykorzystując technikę termoforezy mikroskalowej. Udało się określić powinowactwo zsyntetyzowanych analogów do modelowych enzymów AtSOT18 i SULT1A3. Spośród zsyntetyzowanych 28 związków, kilka wykazało szczególnie silne wiązanie do sulfotransferazy roślinnej, jak i ludzkiej. Inne związki, jak opatrzone w pracy skrótem PAPPF, wykazały selektywność wobec ludzkiej sulfotransferazy, co sugeruje ich potencjalne zastosowanie jako narzędzi do badania specyficznych enzymów.

Przedłożone opracowanie, jakim jest rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki Młynarskiej-Cieślak wzbudza zainteresowanie badawcze, czego dowodem są pytania sformułowane poniżej:

1. Zauważyłem, że w tabelach zebrano wartości K_d dla badanych związków, jednak brakuje wykresów przedstawiających krzywe wiązania lub wykresów termoforezy mikroskalowej. Niektóre zbadane związki były analizowane tylko w jednym powtórzeniu – czy mogłaby Pani wyjaśnić, dlaczego podjęto taką decyzję?



2. Gdyby miała pani możliwość powtórzenia badań, jakie inne techniki lub podejścia uwzględniłaby Pani w badaniu wpływu modyfikacji na właściwości funkcjonalne analogów?
2. Jakie zmiany w strukturze fluoroforów mogłyby potencjalnie zwiększyć ich biogodność lub specyficzność w stosunku do wybranych enzymów?
3. Czy widzi pani możliwość zastosowania swoich analogów w badaniach nad innymi, mniej zbadanymi enzymami niż te, które zostały uwzględnione w rozprawie?
4. Jakie są możliwości zastosowania pani analogów w diagnostyce lub terapii, np. jako sond terapeutycznych dla wybranych enzymów?

Chciałbym podkreślić, że rozprawa jest opracowaniem bardzo starannym zarówno pod względem redakcyjnym jak i graficznym, co sprawia, że pracę czyta się przyjemnie. W tekście dostrzegłem jedynie kilka drobnych niedociągnięć redakcyjnych, nie wpływających na czytelność pracy.

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Agnieszka Młynarska-Cieślak przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużych umiejętności praktycznych z zakresu preparatyki chemicznej, ale również wiedzy z zakresu spektroskopii. Rozprawa doktorska przedłożona przez panią Młynarską-Cieślak świadczy o zaawansowanej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zawarte w pracy doktorskiej wyniki oraz inne aktywności badawcze Doktorantki stały się już podstawą pięciu oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie specjalistycznych (z czego trzy są ściśle związane z tematyką doktoratu). W moim odczuciu, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania. Co więcej, zarówno wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań jak i waga uzyskanych wyników, które stanowią podstawę rozprawy, czyni ją, w moim odczuciu, godną wyróżnienia. Za oryginalne i najważniejsze w mojej opinii rozwiązanie problemu naukowego uważam stworzenie



uniwersalnych narzędzi molekularnych w postaci analogów NAD i PAPS, które nie tylko umożliwiają badania enzymatyczne, ale również otwierają nowe kierunki w badaniach biologicznych i chemicznych związanych z modyfikacjami RNA i aktywnością sulfotransferaz.

Uprzejmie proszę o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Młynarskiej-Cieślak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Gratuluję Doktorantce oraz Pani Promotor uzyskania tak cennych rezultatów.