



Poznań, dn. 26.10.2024

Prof. dr hab. Piotr Przybylski
Zakład Chemii Produktów Naturalnych

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Agnieszki Młynarskiej-Cieślak

pt. *„Nowe analogi kofaktorów adeninowych jako narzędzia do badania procesów biologicznych – synteza, badanie właściwości i zastosowania”*

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego (prof. dr hab. Wojciecha Satuły) z dnia 17.09.2024. Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką naukową dr hab. Joanny Kowalskiej i w ramach kierowanego przez nią projektu NCN Sonata Bis pt. *„Synteza i ewaluacja nowego zestawu narzędzi dla biologii i biotechnologii opartego na analogach nukleotydów adeninowych”* (nr. 2015/18/E/ST5/00555). Przedstawiona rozprawa, oprócz współpracy z Promotorką, posiadającą szerokie kompetencje i duże doświadczenie w zakresie badań biofizycznych, chemicznych i biologicznych nukleozydów, nukleotydów oraz przede wszystkim nowych połączeń RNA, została także wsparta niezwykle doświadczeniem prof. Jacka Jemielitego – uznanego eksperta międzynarodowego na polu badań zastosowań RNA i jego modyfikowanych składników w terapiach przeciwnowotworowych. Rozprawa doktorska powstała formalnie w obszarze dyscypliny - nauki fizyczne (biofizyka) ale ze względu na to, że niezbędna do jej realizacji była: synteza chemiczna, analiza biofizyczna (spektroskopowa i MST - chemia/fizyka), oraz biologiczna to posiada ona charakter interdyscyplinarny. W recenzji zostały zaznaczone **pytania kolorem czarnym i pogrubioną czcionką**.

Ogólny dorobek doktorantki i ocena organizacji rozprawy doktorskiej

Jako dokumentacja niezbędna do przygotowania recenzji dostarczona została dysertacja przygotowana w formie klasycznej, z wyszczególnieniem publikacji i aktywności konferencyjnej doktorantki na pierwszych stronach. Na wstępie należy zaznaczyć, że doktorantka jest współautorką 5-ciu publikacji wydanych w prestiżowych i rozpoznawanych czasopismach

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 1693, e-mail: piotrp@amu.edu.pl

www.chemia.amu.edu.pl

międzynarodowych z listy JCR takich jak: *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 661-669; *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 12190-12197; *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *147*, 125-132, *Nucleic Acid Res.* **2020**, *48*, 6136-6148; *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7650-7655. Mgr. A. Młynarska-Cieślak w pierwszej (*Org. Lett.*) i w ostatniej (*ACS Chem. Biol.*) swojej pracy jest eksperymentalnie wiodącą Autorką (pierwszą autorką), podczas gdy w pozostałych znajduje się na drugim, trzecim lub dalszym miejscu w składzie współautorów. **Zatem tym samym doktorantka spełniła wymogi współautorstwa przynajmniej jednego artykułu z listy czasopism punktowanych przez MNiSW.** Doktorantka przedstawiła także 7 posterów i 2 wystąpienia ustne na krajowych i międzynarodowych konferencjach w latach 2017-2021 a więc brała czynny udział w rozpowszechnianiu wyników prac badawczych, które między innymi prowadziła. Dysertacja rozpoczyna się Spisem skrótów a dalej zawarte w niej są: Wprowadzenie; Przegląd literaturowy (razem ok. 25 stron) - obejmujący omówienie roli nukleotydów NAD⁺ i PAPS w komórce z uwzględnieniem enzymów dla których wspomniane nukleotydy są koenzymami lub grupami prostetycznymi, omówienie teoretyczne metodyki badań z podziałem na wykorzystane metody syntetyczne i te dotyczące charakterystyki otrzymanych związków (HPLC, NMR, MST); Cel projektu doktorskiego; dyskusję wyników (około 50 stron) obejmującą: Syntezę analogów nukleotydów z podziałem na typ przeprowadzonej modyfikacji; Badanie właściwości analogów PAP i PAPS z udziałem HPLC, ¹⁹F NMR oraz MST (mikroskalowej termoforezy) z podsumowaniem (razem 8 stron); oraz bogatą część Eksperymentalną (około 30 stron) i Literaturę (127 pozycji). **Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń - wyraźnie dominuje część eksperymentalna i dyskusja otrzymanych wyników nad częścią literaturową w pracy.** Rysunki i tabele są generalnie czytelne i bardzo dobrze przygotowane w atrakcyjnej, kolorowej formie, chociaż niektóre z nich, kluczowe dla rozprawy, takie jak np. Rys. 17 czy Rys 25 mogłyby być znacznie powiększone... **Inną uwagą ogólną jest widoczny brak klarownej numeracji związków (w zamian długie nazwy pochodnych) co nieco utrudnia analizę bogatego materiału doświadczalnego.**

Ocena znaczenia podjętej tematyki i celu badań

Tematem podjętych badań są nukleotydy adeninowe, które spełniają istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych na Ziemi w kontekście nie tylko przepływu informacji genetycznej, przekazywania sygnałów w komórce, dostarczenia energii czy wpływaniu na

stabilność struktury biomolekuł ale także z perspektywy przekształceń metabolicznych. Dzięki koenzymom/grupom prostetycznym zbudowanym na bazie nukleotydów adeninowych przebiega wiele procesów metabolicznych fazy I i II zachodzących z transferem fragmentów strukturalnych/grup funkcyjnych (np. PAPS współpracujący z sulfotransferazami w reakcjach np. *O*- czy *N*-siarczanowania) lub też z wykorzystaniem procesów oksydo-redukcyjnych (np. NADPH współpracujące z cytochromami w reakcjach red-oks). Zatem pojedyncze cząsteczki nukleotydów adeninowych, zmodyfikowane w racjonalny sposób, mogą stać się doskonałym narzędziem do monitorowania reakcji katalizowanych przez enzymy (sondy molekularne – cele bioanalityczne), mogą być rozważane jako inhibitory kluczowych enzymów a zatem też jako potencjalne cząsteczki leków (chemia medyczna i farmacja) oraz mogą pełnić rolę stabilizacyjną w odniesieniu do struktury biomolekuł takich jak np. RNA czy innych kwasów nukleinowych. Wybranymi przez doktorantkę obiektami modyfikacji były nukleotydy adeninowe: NAD^+ (dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy) i **FAD** (dinukleotyd flawinowo-adeninowy) oraz **PAPS** (5'-fosfosiarczan 3'-fosfoadenozyny), które dalej miały być połączone z RNA w celu zwiększenia odporności na degradację wobec enzymów NudC /*Nudix hydrolase homolog C*) i pirofosfatazy Nudt12 (NAD^+ -RNA) oraz DXO /*Decapping and exoribonuclease protein*/ (NAD^+ -RNA i FAD-RNA) albo miały stać się „sondami” aktywności lub inhibitorami sulfotransferaz (modyfikowane analogi PAPS). **Temat rozprawy jest więc bardzo ważny w kontekście wyzwań takich jak ochrona czy monitorowanie zdrowia naszego społeczeństwa i lepszego zrozumienia reakcji katalizowanych enzymatycznie (np. procesów detoksykacji) oraz funkcji modyfikowanych RNA w układach żywych.** Przedmiot modyfikacji – nukleotydy to tylko pozornie „proste” cząsteczki (jeżeli chodzi o np. wielkość molekuł) bowiem ze względu na ich właściwości fizyczne i chemiczne oraz problemy ze stabilnością chemiczną są one bardzo wymagającym obiektem badań - chemia przekształceń nukleozydów i nukleotydów jest specyficzna i „rządzi się swoimi prawami...” **A zatem rozprawa miała bardzo ambitnie zarysowane i uzasadnione cele badawcze przy jednocześnie dużej wadze naukowej podjętego tematu.**

Ocena rozprawy w odniesieniu do przedstawionego tła literaturowego

Zgodnie z § 21 pkt. 2-4 Załącznika nr. 1 do Uchwały nr. 157 Senatu UW z dnia 29 czerwca 2022 w myśl wymogów formalnych stawianych rozprawom doktorskim cyt. „*Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej*”. Autorka pracy w ramach tła literaturowego ciekawie wprowadza w zagadnienia odnośnie roli nukleotydów w komórce wymieniając kilka z nich: ATP, NAD, SAM, PAPS i FAD i podając wzory na Rys. 1. **Niestety na tym rysunku wzór FAD jest nieprawidłowy (fosforan w pozycji 3'), natomiast o ile w ogólnym odniesieniu do dinukleotydu nitotynoamidoadeninowego skrót NAD jest akceptowalny o tyle połączenie tego skrótu z wzorem pokazanym na Rys. 1 i 2 jest nieprawidłowe (na Rys. 1 i 2 pokazana jest zredukowana forma tego koenzymu - NADH a w formie utlenionej zapisujemy skrót jako NAD⁺)**. Autorka wprawdzie wspomina na Rys. 3 o dwóch formach tego koenzymu ale nie używa opisu NAD⁺/NADH dla podkreślenia z którą formą mamy do czynienia. W pracy kompetentnie zostały opisane znakowania NAD⁺ i jego strukturalnych analogów w celach przeprowadzenia badań fluorescencyjnych (Rys. 5). Doktorantka poprawnie opisuje różne typy enzymów dla których wybrane nukleotydy stanowią kofaktory niezbędne dla katalizowanej reakcji – tj. dla oksydoreduktaz, deacetylaz, ADP-rybozylotransferaz etc. **W teoretycznym wstępie ciekawie została zarysowana różnica w roli stabilizującej/destabilizującej 5'-NAD kapu dla RNA w kontekście organizmów prokariotycznych i eukariotycznych**. W odniesieniu do PAPS wprowadzone zostają informacje dotyczące jego biosyntezy z udziałem sulfurylasy i kinazy oraz ciekawie został przedstawiony podział sulfotransferaz z uwzględnieniem pochodzenia (organizmy zwierzęce /SULT/ czy roślinne /SOT/), podobieństwa w sekwencji aminokwasów i specyficzności substratowej oraz mechanizm działania /fenolowe SULT1/steroidowe SULT2/. Pojawia się też zdanie odnośnie „niestabilności” PAPS ze względu na wysokoenergetyczne wiązanie fosfosiarczanowe o charakterze mieszanego bezwodnika, gdzie Autorka wspomina, że energia uwalniana podczas hydrolizy jest tego samego „rzędu wielkości” co dla ATP (str. 24) – **czy Autorka może podać wartość energii [kJ/mol] uwalnianej przy hydrolizie PAPS w zestawieniu z ATP?** Autorka słusznie zwróciła również uwagę na miejsce operowania sulfotransferaz (cytozol, błony aparatu Golgiego) i podkreśliła, że te cytozolowe są jej głównym obiektem zainteresowania. Dalej została przedstawiona i omówiona przykładowa struktura centrum aktywnego sulfotransferazy

AtSOT18 ze związaną cząsteczką PAP (oddziaływania międzycząsteczkowe) – **tutaj mam uwagę, że poza cytowaniem przydałby się numer PDB dla tej struktury z Rys. 9. W mechanizmie działania sulfotransferazy (Rys. 10) brakuje natomiast ładunku cząstkowego na atomie siarki.** Ciekawym spostrzeżeniem jest, że przesunięcie gr. fosforanowej z pozycji 3' do 2' w PAPS powoduje obniżenie powinowactwa SULT1A1 do nukleotydu ($\uparrow K_M$) – **z przedstawionego modelu (projekcji) wiązania liganda trudno wywnioskować dlaczego taka zależność występuje?** Na bazie danych literaturowych Doktorantka słusznie zauważyła, że PAPS może pełnić rolę regulatora allosterycznego kontrolującego formowanie się centrum aktywnego ST na potrzeby wiązania małych biomolekuł. Dyskusja przeprowadzona przez doktorantkę odnośnie rozpowszechnienia ST w różnych organach a w szczególności w nerkach i wątrobie prowadzi do znanego wniosku odnośnie kluczowej roli tych enzymów w procesach neutralizacji ksenobiotyków (procesach detoksykacji organizmu). **Dalej autorka trafnie konkluduje, że poziom aktywności ST w organizmie (zaburzenie aktywności enzymatycznej) jest skorelowany z występowaniem różnych chorób począwszy od nowotworowych, neurodegeneracyjnych, ginekologicznych i hemofilii co w połączeniu z informacjami przedstawionymi w innym miejscu, że sulfuryzacja z udziałem PAPS jest także istotna w procesach wnikania wirusów do komórek gospodarza, podkreśla wagę podjętego problemu naukowego w pracy doktorantki.** We wstępie literaturowym doktorantka krytycznie i właściwie opisuje także podstawy metodyczne i problemy związane z analizą poziomu stężenia nukleotydów lub struktur hybrydowych z ich udziałem (aktywności ST) z uwzględnieniem znakowania fluorescencyjnego, radioizotopowego w odniesieniu do metod spektrometrii mas, testów *Western Blot*, *PCR* czy też gotowych „kitów” typu „*Universal Sulfotransferase Activity*”. Przeprowadzona została także ciekawa dyskusja odnośnie wykorzystywania modyfikacji PAPS do inhibicji SULT i SOT (Rys. 11) zakończona informacjami dotyczącymi tych konkretnie badanych w rozprawie, tj. SULT1A3 i AtSOT18 gdzie substratami są odpowiednio dopamina i desulfosinigrina. **Dobrym tłem do części eksperymentalnej i dyskusji w ramach rozprawy są także informacje przedstawione w podrozdziałach 4.1 (problemy syntetyczne) i 4.2 (wprowadzenie do metod biofizycznych NMR i MST), które ukazują szeroką wiedzę doktorantki w zakresie operowania właściwymi metodami analitycznymi w stosunku do podjętego problemu badawczego. Mam tylko uwagę w tym miejscu, w podrozdziale 4.1 na Rys. 14 w reakcji nr. 3**

struktura imidazolu jest niepoprawna a w podrozdziale 4.1.3 przydałyby się schematy reakcji chemicznych ułatwiających podążanie za tokiem rozumowania doktorantki... Podsumowując, przeprowadzona krytyczna dyskusja w ramach tła literaturowego i wykorzystywanych metod biofizycznych dowodzi dobrego przygotowania metodologicznego doktorantki i jej dobrej orientacji na niełatwym polu badawczym.

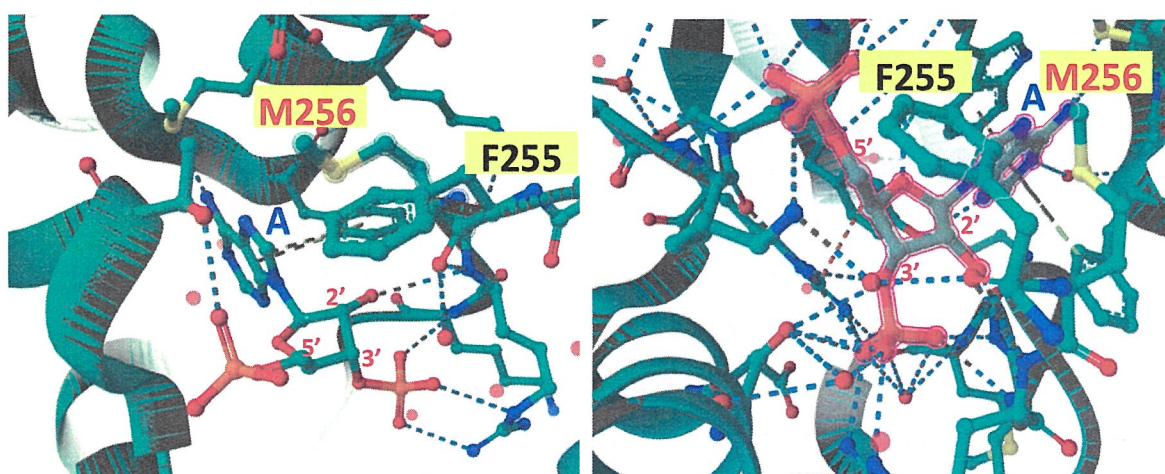
Ocena rozprawy – części eksperymentalnej i dyskusji wyników

Podstawowym celem rozprawy była ocena wpływu modyfikacji chemicznych wybranych nukleotydów na stabilność strukturalną końca 5'-RNA (m^7GpppN -RNA i $GpppN$ -RNA). W tym celu doktorantka podjęła się nietrywialnych modyfikacji chemicznych trzech nukleotydów adeninowych: NAD^+ , FAD i PAPS. Badania odnośnie nowych modyfikacji NAD^+ zostały zrealizowane przez trzyetapowe podejście syntetyczne rozpoczynające się od hydrolizy handlowo dostępnego NAD^+ z udziałem $ZrCl_4$ do 5'-monofosforanu nikotynoamidu (NMP), monitorowanego z udziałem HPLC, gdzie mieszanina AMP z NMP była dalej rozdzielana na kolumnie jonowymiennej. Otrzymany NMP był aktywowany imidazolem (Im) w obecności PPh_3 w DMSO, wytrącony z $NaClO_4$ i użyty dalej jako NMP-Im do sprzęgania w dinukleotydy z 5'-tiofosforanem adenozyiny (AMPS). W wyniku tego typu reakcji musiały zostać otrzymane diastereomery (odnotowane w stosunku $\sim 1:1$). Analogiczne reakcje sprzęgania z NMN-Im do trinukleotydów również zostały przeprowadzone ale czas reakcji był wyraźnie dłuższy. Doktorantka zatem opracowała całkiem wydajną jak na ten typ związków metodę syntezy (wydajności sięgające 30 %). Podobną strategią syntetyczną zostało otrzymanych w sumie 8 związków (modyfikowanych nukleotydów adeninowych) spośród których trzy z nich, zawierające atom siarki, zostały otrzymane w postaci P-diastereomerów i rozdzielone do formy bardziej optycznie czynnej z udziałem RP-HPLC. Analiza spektroskopowa ^{31}P i 1H NMR ukazała ich czystość na poziomie $>90\%$. **Zastanawia mnie jedynie Rys. 17, gdzie doktorantka przedstawiła syntezowane nukleotydy adeninowe i ich diastereomery w formie zredukowanej a w opisie dalej pojawia się informacja, że były one izolowane głównie w formie utlenionej ($>95\%$, str. 50)...** Dalej otrzymane nukleotydy zostały wbudowane na końcu 5'-RNA (kaping został przeprowadzony z 60% wydajnością) gdzie do procesu transkrypcji wykorzystano polimerazę T7 RNA. Ciekawym było, że umiejscowienie atomu siarki w

ugrupowaniu tiofosforanowym (albo przy wiązaniu podwójnym albo jako atom mostkujący z częścią nukleozydową A) miało wpływ na wydajność tego procesu – **czy można to wytłumaczyć dokładniej dlaczego?** Zastosowane trinukleotydowych analogów NAD-kapu odznaczały się wyższą wydajnością podczas kapingu niż odpowiednie dinukleotydy – a zatem doktorantka wskazała doskonały wariant otrzymywania hybryd NAD-RNA, co ma istotne znaczenie w szerszym kontekście badań biochemicznych modyfikowanych RNA. Dalej otrzymane połączenia analog NAD-RNA zostały przetestowane pod kątem stabilności wobec pirofosfataz NUDIX (mysiej-Nudt12 i bakteryjnej - NudC) oraz egzonukleazy DXO, gdzie rekombinowane białka inkubowano ze znakowanym ^{32}P RNA a powstałe produkty rozdzielano z udziałem chromatografii żelowej w celu ilościowej ewaluacji pozostałości hybryd NAD-kapowanego RNA. RNA zawierające od końca 5' nukleotydy na bazie NAD z tiofosforanem (NppsA D1 i D2) ulegały hydrolizie prowadzonej przez DXO ale nie z utworzeniem 5'-monofosforanu RNA. Trinukleotydy również były podatne na proces „deNADingu” zarówno niemodyfikowany NADpG-RNA jak i NAD-RNA. Z kolei RNA z inkorporowanymi diastereomerycznymi D1 i D2 NppAspG, RNA z nukleotydem zmodyfikowanym w części cukrowej (2'-OMe) i fosforanowej (αPs) (NppsA_{mp}G) czy też wreszcie wiodąca struktura - NppA_{mp}G były już znacznie bardziej odporne na „deNADing” prowadzony przez egzonukleazę DXO i degradację (nawet przy $c = 50$ nM). Podobne badania stabilności NAD-RNA z udziałem pirofosfataz Nudt12 i NudC pozwoliły wyłonić jedną modyfikację RNA (NppsA) odporną na działanie wymienionych enzymów– co jest sukcesem doktorantki.

W drugiej części pracy doktorantka zajęła się analogami fluorowanymi PAPS w celu wykorzystania ich jako narzędzie do monitorowania aktywności sulfotransferaz cytozolowych roślinnej (AtSOT18) i ludzkiej (SULT1A3). W tym celu doktorantka założyła otrzymanie szeregu pochodnych zarówno w obrębie zasady purynowej, części cukrowej czy grupy siarczanowej. Wprowadzone atomy fluoru, w pozycjach C2 adeniny, z grupy $-\text{CF}_3$ w C2 lub C8 adeniny oraz w C2' rybozy miały „włączyć” ^{19}F NMR jako narzędzie analityczne do głównego nurtu badań i to jest zrozumiałe. Z założonych pochodnych nie udało się otrzymać pochodnej fluorowej w części cukrowej (rozpad podczas oczyszczania z udziałem chromatografii jonowymiennej) i fluorowanej w pozycji C8 adeniny (większa podatność na depurynację). Autorka pracy wspomniała, że przy projektowaniu struktury fluorowanych analogów PAPS

wykorzystała analizę centrów sulfotransferaz w kompleksie z PAP (AtSOT18 - PDB 5MEK) i w kompleksie z dopaminą i PAP (SULT1A3 - PDB 2A3R). W strukturach tych kompleksów grupa 2'-OH rybozy uczestniczy w stabilizacji kofaktora w miejscu wiązania przez tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z R313 (mało widoczne na Rys. 9 dla AtSOT18) lub z M256 (i nie pokazano dla SULT1A3, tutaj dochodzi rola wewnątrzcząsteczkowej stabilizacji fosforanu w pozycji 3').



Dopamina-PAP-SULT1A3 (PDB 2A3R); *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 335, 417-423.

Czy w założeniach atom fluoru w miejscu 2'-rybozy nukleotydu miał zastąpić grupę hydroksylową (pochodna 2'-F-PAPS nie została ostatecznie otrzymana) w oddziaływaniach z SULT1A3? Z kolei grupa $-CF_3$ nadaje hydrofobowość purynie co jest pożądane w pozycji C8-adeniny (zawada czy międzycząsteczkowa stabilizacja z M256 i F255 - SULT1A3?) ale już niekoniecznie w pozycji C2 puryny...? Na wstępie należy zaznaczyć, że doktorantka stanęła przed niemałym wyzwaniem syntetycznym, któremu sprostała poprzez wytworzenie na etapie przejściowym 2',3'-cyklofosforanu, gdzie dalej ta cykliczna struktura została „rozcięta” przez zastosowanie enzymu - RNAzy T2 (ta strategia ułatwiła proces syntetyczny ze względu na nieseparowalność odpowiednich fosforanów w pozycjach 2' lub 3'). W syntezie analogów PAPS doktorantka wykorzystała reaktywność grup 5'-OH i 3'- lub 2'-OH rybozy z $POCl_3$ /imidazol, siarczanowanie w obecności $MgCl_2$ /DMF i rozcięcie enzymatyczne cyklicznego fosforanu. Otrzymane F-analogi PAPS, otrzymane m.in. metodą fosforylacji Yoshikawy, były oczyszczane na złożu DEAE-Sephadex, gdzie wydajności mieściły się w zakresie 42-73% i dalej RP HPLC

(wyd. 27-52%). Struktury F-analogów PAPS były dowiedzione za pomocą analizy widm ^1H , ^{31}P i ^{19}F NMR. Analiza spektroskopowa pochodnych była przeprowadzona prawidłowo ale mam w tym miejscu pytanie – **dlaczego w widmie ^1H NMR związku $8\text{CF}_3\text{-cPAPS}/8\text{CF}_3\text{-PAPS}$ sygnał od protonu w pozycji $\text{H}2'$ jest, po rozcięciu RNAzą T2, definiowany jako „tryplet” z $^3J = 6,1$ Hz – uproszczenie sygnału $\text{H}2'$ jest zrozumiałe natomiast dyskusyjny jest opis multipletowości? Która z 3J w ddd dla $\text{H}2'$ odpowiada sprzężeniu jąder $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ (Rys. 28)?** W podobny sposób otrzymano też inne analogi PAPS w pozycjach C8, N6 zawierające grupy azydkowe. W ramach analogów PAPS w obrębie grupy siarczanowej doktorantka otrzymała poprzez zmodyfikowane procedury 6 kolejnych związków: PAPP, PAPPP, PAPPF, PAPPCCH, PAPPPprop i niehydrolizowalny PAPCH₂P. Na podkreślenie zasługuje, że wykorzystane modyfikowane nukleozydy zostały otrzymane samodzielnie przez autorkę pracy. W dalszym etapie przygotowano 6 pochodnych PAP w celu analizy właściwości substratowych wobec badanych sulfotransferaz ($2'\text{-F-PAP}$; P_sAP_s , $2\text{-O-pen-P}_s\text{AP}_s$ – **powinno chyba być $2'\text{-O-pen-P}_s\text{AP}_s$...**; C2-PEG-PAP; PCP, PGP). Przy syntezie tych związków kluczowym było dobranie zasady sprzyjającej cyklizacji do $2',3'$ cyklofosforanu i odczynnika hydrolizującego wiązania P-N. Doktorantka wykazała swoje umiejętności eksperymentalne i zoptymalizowała te etapy syntezy poprzez wybranie 1,2,4-triazolu, który umożliwił otrzymanie 5'-fosforanu $2',3'$ -cyklofosforanu z wydajnością 20%. Mam natomiast pytanie odnośnie syntezy pochodnej $2'\text{-O-pentynowej}$ A (Rys. 40) – **jak doktorantka po aktywacji z NaH wprowadziła regioselektywnie łańcuch z funkcją alkinową w pozycję $2'$ nie dotykając pozycji $5'$ – mamy w tym miejscu konkurencję alkohol 1° vs alkohol 2° ?**

Po analizie struktury wprowadzonych powyższych podstawników (niewątpliwie przydatnych w chemii *click*) nasuwa się pytanie czy dobór tych podstawników w analogach PAPS i PAP miał rzeczywiście na celu poprawienie rozpoznania molekularnego z sulfotransferazami? Jeżeli tak to w jaki sposób?

Analogi PAP i PAPS (19 związków) przebadano pod kątem określenia cech substratowych wobec sulfotransferaz SULT1A3 (ludzkiej) i AtSOT18 (roślinnej). W tym miejscu doktorantka zaproponowała metodę RP HPLC do oszacowania zdolności substratowych wobec sulfotransferaz. ST AtSOT18 wykazała aktywność wobec dwóch fluorowych analogów PAPS –

2-F-PAPS i 2-CF₃-PAPS natomiast SULT1A3 wykazała zdolność do rozpoznania molekularnego z wszystkimi fluorowanymi analogami PAPS (niestety dla analogów 2- i 8-CF₃-PAPS sygnały substratu i produktu posiadały identyczne czasy retencji). Mając wstępne informacje odnośnie zdolności substratowych dalej doktorantka opracowała metodę określania aktywności ST bez znakowania izotopowego z udziałem ¹⁹F NMR (w zależności od pH). Uważam to za istotne osiągnięcie w ramach pracy – opracowanie całej metody. Wyniki otrzymane metodą RP HPLC i ¹⁹F NMR były zbieżne szczególnie dla: 2-F-PAPS i 2-CF₃-PAPS - najciekawszych analogów z perspektywy biologicznej w kontekście użycia ich jako sondy aktywności ST.

W trzeciej części pracy doktorantka otrzymała 28 analogów PAPS, posiadających zmodyfikowane reszty fosforanowe, cukrowe i adeninę. W tej części analizowała Ona (wspólnie ze studentem Ryszardem Kobierą) pochodne pod kątem inhibicji działania ST za pomocą metody MST (wyznaczenie K_D). Istotnym tutaj było ustalenie przez doktorantkę warunków przy których ST operująca jako homodimer będzie wiązała jedną cząsteczkę liganda w jednej podjednostce, eksperymenty z odpowiednio znakowanym białkiem (RED-tris-NTA Dye – metoda skaningowej fluorometrii różnicowej DSF) i w różnych buforach (różne pH i siła jonowa roztworu). Dla układów odniesienia (modelowych) otrzymano podobne wartości K_D jak w literaturze z metody miareczkowania dwuwymiarowego czy metody fluorescencji (odchylenie K_D rzędu kilku μM) stąd uznano, że opracowana metoda może być użyta w kontekście badanych nukleotydów i ST. Mam pytanie czy istnieją odpowiednie dane literaturowe odnośnie wartości K_D układu odniesienia wyznaczone z metody mikrokalorymetrii różnicowej (DSC)? Związki PAPP (bioizosteryczna zmiana - K_D(AtSOT18)= 12±2 μM; K_D(SULT1A3)= 3±3 μM) oraz PAPPP (K_D(AtSOT18) = 7,8±1,2 μM; K_D(SULT1A3)= 28±12 μM) wykazały silne wiązanie względem dwóch typów ST, przy czym względem ST roślinnej oba były raczej bardziej aktywne od PAP i PAPS. Trochę w tym miejscu zastanawia wartość K_D 3±3 μM... Ciekawym również było, że niehydrolizowalny PAPCH₂P posiadał podobny potencjał wiązania jak referencyjny PAPS (K_D (SULT1A3-PAPCH₂P) = 40±30 μM vs. K_D (SULT1A3-PAPS) = 30±16 μM). Wyraźnie widocznym również było, że wprowadzenie w obręb reszt fosforanowych w pozycji 5' większych podstawników (PAPPCCH i PAPPPprop) skutkowało znaczącym wzrostem stałej K_D – czyli obniżeniem powinowactwa liganda do analizowanej ST. Zatem raczej pożądanymi modyfikacjami nukleotydów było wstawianie mniejszych lub izosterycznych podstawników lepiej tolerowanych

przez centra wiązania ST. Innym istotnym w mojej opinii istotnym wnioskiem doktorantki było ustalenie pewnej selektywności związku PAPPF, zawierającego ugrupowanie F-PP(5'), wobec SULT1A3 ($K_{D(SULT1A3)} = 14 \pm 11 \mu M$) kosztem powinowactwa do AtSOT18 ($K_{D(AtSOT18)} = 46 \pm 2 \mu M$). Czy analizując oczekiwany model wiązania z centrami obu ST (które są znane z literatury) można uzasadnić te różnice w K_D na poziomie molekularnym dla PAPPF?

Konkluzja

Podsumowując, w świetle stawianego formalnie wymogu (§ 21 pkt. 2-4 Załącznika nr. 1 do Uchwały nr. 157 Senatu UW z dnia 29 czerwca 2022) „*Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej*” stwierdzić można, że doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury i umiejętnościami planowania i samodzielnej pracy eksperymentalnej oraz formułowania wniosków, posiada dorobek naukowy opublikowany w czasopiśmie z listy JCR (5 w/w publikacji) stąd w mojej opinii dysertacja w zupełności spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Młynarskiej-Cieślak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych w dyscyplinie nauki fizyczne (biofizyka).

Biorąc pod uwagę poniższe punkty:

- 1) wyniki opisane w pracy doktorskiej były bezpośrednio związane z opublikowanymi pracami: „*Nicotinamide-Containing Di- and Trinucleotides as Chemical Tools for Studies of NAD-Capped RNAs*” *Org. Lett.* **2018**, 20, 7650-7655 i „*Fluorinated Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Analogues for Continuous Sulfotransferase Activity Monitoring and Inhibitor Screening by 19F NMR Spectroscopy*” *ACS Chem. Biol.* **2022**, 17, 661-669, gdzie doktorantka była pierwszą autorką (wiodącą eksperymentalnie);
- 2) stopień trudności wykonania pracy doktorskiej (eksperymentalnie) był bardzo wysoki ze względu na obiekt badań czyli specyficzną chemię nukleozydów i nukleotydów,

3) wartościowe wnioski odnośnie badanych nowych ligandów sulfotransferaz i modyfikowanych nukleotydami RNA dające nowe spojrzenie odnośnie stabilności takich połączeń lub konstruowania nowych narzędzi bioanalitycznych do monitorowania aktywności analizowanych w pracy układów enzymatycznych;

4) opracowaną nową metodykę mającą na celu ustalenie powinowactwa enzymów do modyfikowanych nukleotydów,

i po odpowiednim ustosunkowaniu się przez doktorantkę do podniesionych kwestii dyskusyjnych w recenzji, **wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr. Agnieszki Młynarskiej-Cieślak.**

