



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel. 061-854-6675
fax 061-854-6680
e-mail: mbernard@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny R. Stasińskiej

z tytułowanej

“Cystamine-modified RNA Oligonucleotides: Synthesis and Application in Cross-linking and Conjugation via Disulfide Bond”

wykonanej w **Zakładzie Chemii Biopolimerów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu**

pod kierunkiem **dr hab. Marcina K. Chmielewskiego, prof. IChB**

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Stasińskiej opracowana została w języku angielskim na 137 stronach. Przedmiotem dysertacji jest synteza modyfikowanych oligonukleotydów RNA i ich wykorzystanie w otrzymywaniu koniugatów połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. W części wstępnej autorka rozprawy wyczerpująco omówiła metody otrzymywania oligonukleotydów poczynając od historycznej syntezy zaprojektowanej przez pioniera badań nad tą grupą związków, H. R. Khoranę, a zasadzającą się na użyciu jako substratów fosfodiesterowych pochodnych nukleotydów. W kolejnym rozdziale tej części doktorantka przedstawiła wykorzystanie metody fosfortriesterowej w syntezie oligonukleotydów, która to metoda również straciła na znaczeniu w ostatnim dwudziestoleciu. Rozdziały 1.3 i 1.4 zawierają omówienie bardziej współczesnych technik syntezy oligonukleotydów, a mianowicie metodę fosfonianową, oksydatywne sprzężanie Athertona-Todda, metodę wspomaganą jodem jako utleniaczem oraz procedurę amidofosforanową. W rozdziałach 2-5 doktorantka opisała możliwości łączenia cząsteczek oligonukleotydów, sieciowanie w obrębie DNA i RNA oraz koniugaty oligonukleotydów z peptydami i białkami. Jak wspomniałem wyżej, opracowanie wstępnej części rozprawy jest wyczerpujące i poparte bogatą literaturą, która łącznie z pozostałymi częściami dysertacji obejmuje 230 pozycji. Pani mgr Stasińska wykazała się dużą znajomością tematu, a rozdziały wstępne dowodzą ważkości podjętych przez nią badań. Nadmienić należy, że powyższe opracowanie było przedmiotem dwóch publikacji w *Bioorg. Chem.*, w których doktorantka jest pierwszym autorem.

Kolejny fragment rozprawy stanowi dyskusja wyników badań własnych. Doktorantka obrała sobie za cel opracowanie metodyki otrzymywania oligonukleotydów RNA skoniugowanych przez wiązanie fosodiesterowe łącznikiem cystaminowym. Do tego celu zastosowała metodę amidofosforanową oraz H-fosfonianową. Po początkowym niepowodzeniu związanym z nietrwałością otrzymanych oligonukleotydów, autorce rozprawy udało się uzyskać stabilne cząsteczki modyfikowanego RNA. Doktorantka podała wyjaśnienie niepowodzenia przedstawiając prawdopodobny mechanizm rozpadu oligonukleotydu RNA podczas deprotekcji grupy hydroksylowej.

W kolejnym etapie badań Pani mgr Stasińska użyła uproszczonych modeli dinukleotydowych w celu określenia stereochemii reakcji i produktu. W konkluzji stwierdziła, iż reakcja oksydacyjnego sprzęgania jest stereoselektywna i zachodzi z inwersją konfiguracji niezależnie od warunków syntezy.

Następny etap prac eksperymentalnych obejmował próby międzycząsteczkowego usieciowania RNA modyfikowanego cystaminą oraz wewnątrzcząsteczkowego z wykorzystaniem łączników maleimidowych. Jedno z doświadczeń przebiegało z niską wydajnością produktu łączenia. I tutaj autorka jako prawdopodobną przyczynę tej mało skutecznej syntezy wybrała zatłoczenie stereoelektronowe w fragmencie oligonukleotydu na którym zachodzi reakcja.

W końcowym etapie pracy doktorantka otrzymała trwałe koniugaty niektórych oligonukleotydów z RNAzą H1, które w przyszłości mogą posłużyć do badań strukturalnych oraz studiów nad oddziaływaniami RNA-białko.

Praca napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem angielskim z nielicznymi źle sformułowanymi zdaniami i czasami nieprawidłowym użyciem rodzajników określonych i nieokreślonych.

W tym miejscu jako recenzent muszę zwrócić uwagę na drobne błędy i braki, które pojawiły się w trakcie opracowywania dysertacji:

1. Mam pewien niedosyt związany ze skrótowym opisem wykorzystania oligonukleotydów w terapii. W literaturze można znaleźć całkiem obszerne opracowania dotyczące aktywności biologicznej oligonukleotydów, np. *Therapeutic Oligonucleotides*, Goodchild, J. (red.) w *Methods in Molecular Biology* **764** (2011) czy Roberts, T. M.; Langer, R.; Wood, M. J. A. *Nature Reviews-Drug Discovery* **2020**, *19*, 673.

2. Na str. 44 (ld 6)¹ autorka stwierdza, iż pierścień aromatyczny jest dobrą grupą odchodzącą. Jest to stwierdzenie niepoprawne, ponieważ cechą charakterystyczną dobrej grupy odchodzącej jest jej niska zasadowość. W opisywanym przypadku rolę grup odchodzących pełnią pochodne fenolowe tworzone po wymianie protonu.
3. W niektórych fragmentach tekstu autorka określa związki opisowo zamiast podać ich numery, co ułatwiłoby czytelnikowi szybką orientację co do konkretnego połączenia (np. str. 70 ld 4 lub str. 73 ld 8).
4. Przydałoby się wyjaśnienie, dlaczego, zdaniem autorki, jod hamuje przebieg reakcji (str. 76, ld 2).
5. Brakuje mi poglądowego rysunku przedstawiającego koniugat przykładowego oligonukleotydu z RNAzą (rozd. 7).
6. W jakich warunkach próbowano uzyskać kryształy kompleksu RNAza-H1-RNA/DNA?
7. Streszczenie opisuje zakres prac eksperymentalnych. W mojej opinii powinno również zawierać wnioski z przeprowadzonych doświadczeń.
8. W części doświadczalnej autorka często nie podaje stanu skupienia otrzymanych połączeń. Może to być zrozumiałe w przypadku makrocząsteczek, które zwykle są bezpostaciowymi utworami, ale taki opis powinien mieć miejsce dla związków o stosunkowo małej cząsteczce.
9. Cystamina jest znanym związkiem, a jej chlorowodorek jest dostępny komercyjnie. Mimo to doktorantka podała dla tego połączenia dane spektralne, które, niestety, są niepoprawne w przypadku widma ¹H NMR. W zakresie alifatycznym widma protonowego tego związku powinny pojawiać się dwa osobne tryplety dla sprzężonych protonów grupy metylenowej, a nie podwójny tryplet (dt). W związku z tym należało podać dwie wartości przesunięć chemicznych (a nie zakres) oraz wartość stałej sprzężenia *J*.
10. W tekście autorka rozprawy umieszcza numery dotyczące referencji przed znakiem przestankowym, gdy tymczasem ogólnie przyjętą zasadą jest podanie odnośnika do literatury po znaku przestankowym (por. *The ACS Style Guide*, str. 287).
11. Cytowanie pozycji książkowej wymaga wymienienia nie tylko autora konkretnego rozdziału, ale również głównego redaktora(ów) publikacji (poz. 44 w Bibliografii).

¹ ld = linijka od dołu strony, lg = linijka od góry strony.

12. Powinno się konsekwentnie podawać doi dla wszystkich pozycji literaturowych lub nie podawać ich wcale. Dlaczego autorka wpisała doi tylko dla niektórych referencji?

Powyższe krytyczne uwagi nie mają znaczącego wpływu na poziom naukowy dysertacji, który oceniam jako wysoki. W mojej ocenie wyniki badań prowadzonych przez Panią mgr Annę Stasińską stanowią istotny wkład do dziedziny chemizmu i struktury oligonukleotydów RNA. Aczkolwiek obecnie mamy do dyspozycji metody automatycznej syntezy oligonukleotydów, to konieczność pracy z wręcz mikroskopijnymi ilościami substratów i produktów wymaga ogromnej precyzji i zaangażowania. Prowadząc badania nad tą grupą związków doktorantka dowiodła, iż posiada odpowiednie umiejętności w pracy eksperymentalnej, a w czasie badań potrafi korygować początkowe niepowodzenia i wybrać właściwą ścieżkę realizacji doświadczenia.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 roku i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Anny Stasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze wysoki poziom naukowy dysertacji, przedstawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Poznań, dn. 12.05.2022

dr hab. Marek K. Bernard, prof. UMP

