



RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Anny Radomiły Stasińskiej

zatytułowanej

” CYSTAMINE MODIFIED RNA OLIGONUCLEOTIDES: SYNTHESIS AND APPLICATION IN CROSS-LINKING AND CONJUGATION VIA DISULFITE BOND”

(Oligonukleotydy RNA modyfikowane cystaminą: synteza i wykorzystanie w sieciowaniu i koniugacji przez wiązania disiarczkowe)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Radomiły Stasińskiej, została przygotowana w Zakładzie Chemii Biopolimerów, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Promotorem rozprawy jest Pan dr hab. Marcin Chmielewski, profesor Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

W części wstępnej Doktorantka pisze, że *” Opracowanie chemicznej metody syntezy oligonukleotydów serii DNA i RNA zrewolucjonizowało świat badań biologii, biochemii i pokrewnych dziedzin. Cząsteczki te oraz ich funkcjonalne modyfikacje pozwoliły na scharakteryzowanie szeregu oddziaływań i mechanizmów funkcjonowania organizmów żywych, których badanie wcześniej nie było możliwe”* Zgadzam się z tym w całej rozciągłości, a dowodów nie trzeba szukać daleko. Warto dodać, że niekiedy badania takie są poddawane swoistej krytyce z powodów – trudno sobie to wyobrazić – etycznych. Chociażby niedawne dyskusje, czasami graniczące ze śmiesznością czy szczepionka MODERNY, gdzie wykorzystano chemię RNA nie zakłóci „prawdziwego porządku Świata”. Nie jest moim celem uczestniczenie w tej dyskusji, a jedynie ocena doktoratu Pani mgr Anny Stasińskiej zatytułowanego OLIGONUKLEOTYDY RNA MODYFIKOWANE CYSTAMINĄ: SYNTEZA I WYKORZYSTANIE W SIECIOWANIU I KONIUGACJI PRZEZ WIĄZANIA DISIARCZKOWE

Tematyka pracy doktorskiej osadzona jest w zagadnieniach związanych z modyfikacją oligonukleotydów poprzez precyzyjne (w sensie lokalizacji) wbudowywanie do łańcucha



oligonukleotydu łącznika disiarczowego. Stwarza to możliwość odwracalności takiego sieciowania. Utlenianie dwóch grup tiolowych prowadzące do powstania mostka disiarczowego, albo odwrotnie: uwodornienie takiego mostka prowadzi do powstania dwóch grup tiolowych. Ten pomysł syntetyczny jest główną idea badawczą Doktorantki i stanowi podstawowy nurt pracy. Innymi słowy praca ma charakter metodyczny - poszerzania możliwości syntetycznego „toolbox” dla badań wzajemnych oddziaływań oligonukleotydów, a dalej ich oddziaływań z RNA, z peptydami etc.

Istotą projektu był wybór odpowiedniego łącznika, którego wbudowanie zaplanowano do grupy fosforoestrowej. Stąd wybór cystaminy, a przede wszystkim dłuższego homologu - homocystaminy (3,3'-ditiobis-propyloaminy) jako bardziej skutecznej w sieciowaniu struktur oligonukleotydowych. Doktorantka słusznie zauważa, że długość mostka (linkera) ma ogromne znaczenie dla sieciowania i oddziaływań ogólnie znanych jako cross-linking, i stąd właśnie taki wybór łączników sieciujących.

Warto zauważyć, że najczęściej łączniki umieszczane są w pozycjach terminalnych oligonukleotydów, gdzie przyłączane są np. znaczniki fluorescencyjne lub dokonywane inne modyfikacje. Jednak w przypadku pracy Pani Anny Stasińskiej potrafiła ona wbudować swój łącznik disiarczowy do grupy fosfoestrowej w precyzyjnie wybranej pozycji. Do tego celu wykorzystwała znane metody syntezy oligonukleotydów, gdzie w odpowiednim miejscu (zaplanowanym wcześniej) wbudowywała zmodyfikowany przez siebie nukleotyd. Modyfikacja fragmentu nukleotydowego, czyli utworzenie wiązania P-łącznik cystaminowy wykonała wg znanych procedur syntetycznych: metody amidofosforynowej oraz metody H-fosfonianowej. Problemy z otrzymaniem, a właściwie z trwałością połączeń atom P-cystamina, Autorka pokonała zastępując oryginalny nukleotyd H-fosfonianem 2'-deoksyrybonukleotydów lub 2'-deoksy-2'-fluororybonukleotydów, co znacząco poprawiało trwałość związków. Tak otrzymane oligonukleotydy stanowiły materiał do dalszych badań oddziaływań z innymi układami. Omówiony dotychczas ten fragment pracy dowodzi znajomości pracy badawczej chemika – syntetyka; Doktorantka uporała się z typowymi problemami zaawansowanej syntezy organicznej.



Już na obecnym etapie oceny stwierdzam, że dokonania w tym zakresie Pani Anny Stasińskiej dowodzą iż jest Ona już doświadczonym eksperymentatorem, potrafiącym zaplanować eksperyment, wykonać go, a następnie zrozumieć i zinterpretować uzyskane wyniki. To jednoznacznie upoważnia mnie do sformułowania wniosku o przyjęcie pracy doktorskiej i będę wnioskował o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Druga część pracy dotyczy badań oddziaływań otrzymanych, zmodyfikowanych i wyposażonych w linker cystaminowy oligonukleotydów z innymi układami. Nie czuję się specjalistą w tym zakresie, a szczegółową ocenę tego fragmentu pracy pozostawiam innym Recenzentom. Warto także zauważyć, że dalsze prace, bazujące na materiale uzyskanym w doktoracie będą kontynuowane w współpracującym Laboratorium Struktury Białek z macierzystego Instytutu Doktorantki.

Praca jest napisana w języku angielskim. Napisana jest bardzo precyzyjnie i zrozumiale; szata graficzna jest elegancka. Prócz tego chciałbym dodać, że praca, co dla mnie bardzo ważne, jest napisana z wyczuwalnym ogromnym entuzjazmem. To bardzo ważna cecha, bo czytający wspólnie z Autorką dostrzega blaski i cienie pracy chemika syntetyka.

Część literaturowa to moim zdaniem bardzo kompetentny przegląd literatury dotyczącej zagadnień szczególnie interesujących Doktorantkę. Z kolei w części doświadczalnej opis przeprowadzonych procedur, jak i analiz otrzymanych wyników wzbogacają schematy, tabele z wynikami etc. Nie zauważyłem błędów ani uchybień w opisach przeprowadzonych procedur. Nie budzi to wątpliwości, że opisane procedury są powtarzalne.

Doktorantka jest współautorką trzech publikacji, o czym wspomniano w pracy. To także dowodzi, że tematyka jest interesująca; jednocześnie została poddana weryfikacji przez zewnętrznych recenzentów.

Praca jest dość zwięzła, obejmuje 136 stron (w tym cytowana literatura to 230 odnośników literaturowych, co już zajmuje około kilkunastu stron pracy). Po krótkim *STRESZCZENIU*, a następnie *ABSTRACT*ie pojawiają się indeks wykorzystanych skrótów a następnie cel pracy (*THE AIM OF THE THESIS*). Następnie wstęp (*INTRODUCTION*) to *de facto* część literaturowa omawiająca zagadnienia syntezy oligonukleotydów, problemy sieciowania (cross-linking) ze szczególnym uwzględnieniem mostków disiarczkowych, co



zajmuje około 25 stron dysertacji. Omówienie badań własnych (*RESULTS AND DISCUSSION*) to kolejne około 40 stron, a merytoryczną zawartość tego rozdziału oceniam bardzo wysoko. Następnie pojawia się podsumowanie (*SUMMARY*). Całość kończy dość obszerna część doświadczalna (*MATERIALS AND METHODS*) i cytowana literatura (*BIBLIOGRAPHY*).

W pracy zamieszczono spis dokonań publikacyjnych Doktorantki, chociaż szkoda że nie dołączono Jej naukowego CV. Mimo iż to nie jest formalnie wymagane, ułatwia czytającemu Recenzentowi lepiej poznać Doktoranta.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Stasińskiej spełnia wymogi ustawy Ustawy z dn. 20 lipca 2019 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dziennik Ustaw 2020r. poz.85 z późniejszymi zmianami) oraz zasługuje na moją pozytywną ocenę. Upoważnia mnie to do sformułowania wniosku o nadanie Kandydatce stopnia doktora w zakresie chemii i wnioskuję do Rady Naukowej IChB PAN w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 20 maja 2022 roku