



UNIVERSITY  
OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

Warszawa, 23.05.2022

Dr hab. Joanna Kowalska  
Uniwersytet Warszawski  
Wydział Fizyki  
Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki  
Ul. Pasteura 5, 02-093 Warszawa  
Tel.: +48 22 55 43 774  
e-mail: jkowalska@fuw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. ANNY RADOMIŁY STASIŃSKIEJ PT.  
„CYSTAMINE-MODIFIED RNA OLIGONUCLEOTIDES: SYNTHESIS AND APPLICATION IN CROSS-  
LINKING AND CONJUGATION VIA DISULFIDE BOND”

Sfunkcjonalizowane lub chemicznie modyfikowane rybooligonukleotydy to niezwykle ważna i intensywnie rozwijana klasa związków o licznych zastosowaniach w badaniach poznawczych, medycynie i diagnostyce. Odpowiednio sfunkcjonalizowane oligonukleotydy mogą służyć jako sondy (próbki) i innego rodzaju narzędzia molekularne do badania procesów biologicznych. Mimo, iż metody syntezy analogów oligonukleotydów rozwijane są od dekad, ich skuteczne zastosowanie wymaga często bardzo indywidualnego podejścia, dlatego też istnieje potrzeba ciągłego udoskonalania metod syntezy i tworzenia nowych narzędzi tego typu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Anny Radomiły Stasińskiej, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marcina K. Chemielewskeigo, prof. IBCH, było opracowanie syntezy oligorybonukleotydów sfunkcjonalizowanych za pomocą reszty cysteaminy, umożliwiających sieciowanie (inaczej cross-linkowanie, czyli kowalencyjne wiązanie) z celami molekularnymi posiadającymi grupę tiolową. Jako punkt wyjścia do opracowywania syntezy tych związków Autorka rozprawy przyjęła metodologię modyfikacji oligodeoksyrybonukleotydów opracowaną przez Jacqueline Fidanę and Larry'ego McLaughlina a opierającą się na funkcjonalizacji ugrupowania 5',3'-fosfodiesterowego prowadzącą do utworzenia sfunkcjonalizowanego internukleotydowego wiązania amidofosforanowego. Głównym celem otrzymywania zaprojektowanych w ramach rozprawy związków było dostarczenie narzędzi molekularnych do badania ludzkiej RNAzy H.

Praca doktorska liczy 138 stron i napisana jest w języku angielskim. Układ rozdziałów jest typowy dla prac eksperymentalnych i obejmuje wprowadzenie oparte o stan wiedzy opisany w literaturze (Introduction), wyniki i ich dyskusję (Results and Discussion) oraz część eksperymentalną



# UNIVERSITY OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

(Materials and Methods). Dodatkowo w pracy wyodrębniono cel (Aim) oraz podsumowanie (Summary), spis literatury oraz dorobek naukowy Autorki. W pracy znalazło się ponad 50 rysunków oraz kilka tabel, starannie wykonanych pod względem edytorskim i pomocnych w zrozumieniu przedstawianych zagadnień. W pracy zacytowano 230 pozycji literaturowych, zarówno klasycznych, przełomowych prac z dziedziny syntezy kwasów nukleinowych i ich analogów jak i bardziej aktualnych prac odnoszących się do tematu rozprawy. Podsumowując, praca jest odpowiednio skonstruowana i dopracowana pod względem edytorskim.

W dalszej części recenzji przedmiotem szczegółowej oceny będą następujące elementy Rozprawy: ogólna wiedza Autorki w uprawianej dziedzinie naukowej, umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

W pierwszej części rozprawy (Introduction) Autorka dokonuje przeglądu literatury dotyczącej chemii oligonukleotydów i metod ich koniugacji oraz sieciowania z innymi cząsteczkami. Część ta zawiera krótkie historyczne podsumowanie najważniejszych strategii syntetycznych, ze szczególnym uwzględnieniem chemii H-fosfonianów, którą autorka wykorzystywała w badaniach własnych. Ponadto, w części tej Autorka opisuje skrótowo zagadnienia związane z modyfikacją, sieciowaniem i koniugacją oligonukleotydów, ze szczególnym uwzględnieniem oligonukleotydów modyfikowanych grupami disiarczkowymi, co również jest uzasadnione z punktu widzenia opisanych dalej badań własnych. Ta część rozprawy napisana jest w sposób bardzo przystępny i daje czytelnikowi bardzo dobre podstawy do zrozumienia różnych aspektów eksperymentów realizowanych w ramach badań własnych.

W kolejnym rozdziale (Results and Discussion) Autorka opisała eksperymenty zrealizowane w ramach własnej pracy badawczej. W pierwszej kolejności Autorka prezentuje głównie badania syntetyczne, których celem było otrzymanie oligonukleotydów RNA sfunkcjonalizowanych za pomocą łącznika disiarczkowego, obecnego w cząsteczce cystaminy lub jej analogu, homocytaminy. Cel ten Autorka postanowiła osiągnąć wykorzystując chemię H-fosfonianów. W szczególności Autorka postanowiła zaadaptować na potrzeby funkcjonalizacji RNA metodę Fidanzy i McLaughlina modyfikacji DNA, która umożliwia wprowadzenie grupy disiarczkowej w obrębie dowolnego wiązania fosfodiesterowego w oligonukleotydzie. Wstępne badania szybko wykazały jednak, że powstające w wyniku modyfikacji sfunkcjonalizowane, internukleotydowe wiązanie amidofosforanowe jest niestabilne w stopniu uniemożliwiającym izolację i zastosowania proponowanych związków. Obserwowaną niestabilność Autorka wytłumaczyła efektem grupy sąsiadującej w pozycji 2'-OH modyfikowanego nukleotydu, która katalizuje hydrolizę cząsteczki w miejscu modyfikacji. Jako rozwiązanie tego problemu Autorka zaproponowała i zrealizowała syntezę hybrydowych oligonukleotydów, które pozbawione były grupy 2'-OH sąsiadującej z



# UNIVERSITY OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

modyfikowaną resztą amidofosforanową. Zostało to zrealizowane na dwa sposoby, poprzez zastąpienie wybranej reszty rybonukleozydu 2'-deoksyrybonukleozydem lub 2'-deoksy-2'-fluororybonukleozydem. Autorka przeprowadziła syntezę zaplanowanych związków z sukcesem, zbadała wpływ wybranych warunków reakcji na ich wydajność, oraz podjęła się określenia stereochemii produktów, przygotowując w tym celu również modelowe dinukleotydy. Badania zrealizowane w tej części opisane są z należytą starannością i nie wzbudziły moich większych zastrzeżeń. Niewielki niedosyt pozostawiło u mnie natomiast dość lakoniczne uzasadnienie wyboru miejsca i sposobu modyfikacji, do czego odnoszę się w dalszej części recenzji (pytania do Autorki).

W drugiej części pracy Autorka skupiła się na zbadaniu reaktywności i wstępnej weryfikacji użyteczności modyfikowanych łącznikami disiarczkowymi oligonukleotydów RNA. W tym celu, Autorka przeprowadziła serię reakcji sieciowania, którym celem była zbadanie możliwości sieciowania sekwencji komplementarnych, częściowo komplementarnych i struktur typu spinek do włosów. Badania Autorka przeprowadziła w dwóch wariantach – tworzenia cross-linków bezpośrednio pomiędzy dwiema resztami cysteaminy (zredukowana cystamina), jak i tworzenia cross-linków z zastosowaniem dodatkowych homofunkcyjnych linkerów maleimidowych w celu wyeliminowania potencjalnego wpływu tworzonego wiązania na strukturę RNA. Zastosowanie maleimidowych linkerów zawierających grupę disiarczkową dało dodatkową możliwość odwracalności procesu sieciowania. Przeprowadzenie tych badań uważam za wysoce potrzebne i uzasadnione, mam jednak pewne zastrzeżenia związane z zasadnością dobranych modeli eksperymentalnych i interpretacją wyników, które również podnoszę w dalszej części recenzji.

Wreszcie, Autorka przedstawia wyniki badań nad zastosowaniem otrzymanych analogów oligonukleotydów RNA modyfikowanych cystaminą w badaniach strukturalnych i mechanistycznych mutantów RNAzy H1. Badania te potwierdziły możliwość utworzenia międzycząsteczkowego wiązania z (odpowiednio rozmieszczonymi) resztami cysteiny w białku co stabilizuje, z natury przejściowy, kompleks pomiędzy hybrydą DNA:RNA a enzymem. Mimo, iż nie są to badania przeprowadzone samodzielnie przez Autorkę, uważam, że doskonale obrazują one użyteczność opracowanych przez Autorkę narzędzi molekularnych i podwyższają znaczenie opisanych w rozprawie badań.

W ostatnim rozdziale Autorka opisała szczegółowo stosowane w badaniach materiały i metody. W części tej wyczerpująco i z należytą starannością opisano procedury reakcji, charakterystykę otrzymanych produktów oraz inne procedury eksperymentalne.

W ogólności badania przedstawione w rozprawie zostały zrealizowane i opisane w sposób merytorycznie poprawny, przejrzysty, zrozumiały dla czytelnika, a ogromna większość wysnutych



# UNIVERSITY OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

wniosków nie budzi żadnych moich zastrzeżeń. Z obowiązku recenzenta muszę jednak również zauważyć, że przedstawiony w rozprawie materiał nie jest zbyt obszerny, co jest również odzwierciedlone w dorobku publikacyjnym Autorki. Pani Mgr Stasińska jest (drugą) współautorką tylko jednej pracy oryginalnej opublikowanej w *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Niedosyt ten jest jednak częściowo zrekompensowany poprzez pierwsze autorstwo w dwóch pracach przeglądowych (*Bioorganic Chemistry*) dotyczących chemii i zastosowań kwasów nukleinowych modyfikowanych grupami disiarczowymi. Niektóre zagadnienia przedstawione w rozprawie wzbudziły moje wątpliwości lub ciekawość i dlatego chciałabym poprosić Autorkę o bardziej szczegółowe przedyskutowanie ich w ramach publicznej obrony.

- 1) W części otwierającej badania własne zabrakło w mojej ocenie uzasadnienia odnośnie wybranego sposobu modyfikacji oligonukleotydu RNA. W czym wybrana metoda/miejsce modyfikacji przewyższa zdaniem Autorki podejścia opierające się na funkcjonalizacji zasady azotowej lub pozycji 2' rybozy? Czy wybrana pozycja modyfikacji ma jakieś szczególne uzasadnienie w kontekście badań nad RNAzą H?
- 2) Jednym z problemów związanych z wykorzystaniem amidofosforanowych analogów nukleinowych jest niestabilność chemiczna N-funkcjonalizowanych amidofosforanów związana z hydrolizą wiązania P-N (w szczególności w warunkach kwaśnych, ale również obojętnych). Aspekt ten nie został zbadany w rozprawie, ale wydaje mi się, że może to być duży problem w przypadku prób długotrwałego przechowywania tego typu sond w roztworze (RNA jest niestabilne w warunkach zasadowych, więc musi być przechowywane w roztworach obojętnych lub lekko kwaśnych), jak i podczas eksperymentów sieciowania, które prowadzi się w roztworach wodnych (może to mieć również wpływ na stabilność uzyskiwanych cross-linków). Proszę o rozważenie, czy rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zastąpienie sfunkcjonalizowanego ugrupowania amidofosforanowego analogicznie sfunkcjonalizowanym ugrupowaniem fosfortriestrowym lub C-fosfonianowym i czy zastosowane przez Autorkę podejście syntetyczne mogłoby (po pewnej modyfikacji) zostać zastosowane również do syntezy tego typu połączeń?
- 3) Niektóre stwierdzenia dotyczące interpretacji wyników wydają się być nieco na wyrost. Np. we wstępnej części pracy Autorka podkreśla, że badała mechanizm hydrolizy RNA modyfikowanych cysteaminą. Po lekturze pracy trudno jednak oprzeć się wrażeniu, że badania te ograniczyły się jedynie do identyfikacji powstających produktów degradacji, natomiast sam mechanizm został zaproponowany w oparciu o wcześniejsze doniesienia literaturowe. Proszę o wyjaśnienie czy Autorka prowadziła jakieś inne badania związane z analizą mechanizmu (być może coś przeoczyłam).



# UNIVERSITY OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

- 4) Moje największe zastrzeżenia budzą niektóre wyniki przedstawione w rozdziałach 4, 5, 6, w których Autorka skupiła się na optymalizacji warunków sprzyjających tworzenia cross-linków pomiędzy dwiema niciami RNA lub pomiędzy dwoma fragmentami autokomplementarnej nici (szpilka do włosów). W mojej ocenie eksperymenty te nie zostały optymalnie zaplanowane, a wnioski z nich wyciągane są często zbyt daleko idące. Kryteria doboru „dobrych warunków” sieciowania, doprowadziły do tego, że Autorce (najprawdopodobniej) udało się zoptymalizować warunki niespecyficznego sieciowania oligonukleotydów, podczas gdy najbardziej pożądanym jest tworzenie cross-linków w sposób wysoce specyficzny, tj. tylko w pomiędzy cząsteczkami/fragmentami cząsteczek, które oddziałują ze sobą z dużym powinowactwem. Stąd moje pytanie, dlaczego w eksperymentach wstępnych Autorka zdecydowała się na badanie powstawania cross-linków pomiędzy dwiema identycznymi (i niekomplementarnymi) sekwencjami, zamiast pomiędzy dwiema komplementarnymi do siebie niciami? W mojej ocenie główną siłą napędową do tworzenia cross-linku w rzeczywistych eksperymentach jest przestrzenna bliskość dwóch oddziałujących ze sobą molekuł, więc takie eksperymenty wstępne bardzo mało wnoszą do późniejszej optymalizacji. Można by wręcz uznać, że warunki, w których dochodzi do tworzenia cross-linków dla niekomplementarnych nici, są niekorzystne dla eksperymentów, w których cross-link ma powstać wyłącznie w wyniku specyficznych oddziaływań. Ta sama uwaga dotyczy eksperymentu z cross-linkowaniem niekomplementarnych sekwencji z linkerami maleimidowymi. Fakt uzyskania cross-linków w badanych warunkach świadczy o tym, że będą one sprzyjały sieciowaniu niespecyficznemu. Kolejnym eksperymentem optymalizacyjnym było badanie tworzenia cross-linku pomiędzy niciami częściowo komplementarnymi, ale nie przeprowadzono eksperymentu dla dwóch różnych nici całkowicie komplementarnych. Dlaczego? Proszę o krytyczną dyskusję tych zagadnień podczas publicznej obrony.
- 5) W eksperymentach struktury typu szpilki do włosów (*hairpin*) O8 brakuje wyjaśnienia dlaczego modyfikację cross-linkującą z C3 wybrano G23, która nie wydaje się być w najbliższym możliwym sąsiedztwie C3, przynajmniej w przedstawionych modelach struktury 2-go rzędowej. Czym był podyktowany wybór akurat tej pozycji? Nie do końca zgadzam się również ze stwierdzeniem, że obserwacja dimeru w eksperymencie z sieciowaniem O8C świadczy o wysokim auto-powinowactwie (*self affinity*) tej sekwencji. Jakie mogą być inne przyczyny takiej obserwacji? Proszę o wyjaśnienie. W przypadku szpilki do włosów O9 modyfikowane nukleotydy umieszczono w innej relacji do siebie niż w przypadku O8, więc proszę również dyskusję porównawczą wyboru rozmieszczenia modyfikacji w tych dwóch niciach. Mój niepokój budzi też fakt, że wszystkie eksperymenty optymalizacyjne zostały przeprowadzone jednokrotnie (tak przynajmniej wynika z opisu



# UNIVERSITY OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

pracy), co zwiększa ryzyko wyciągnięcia wniosków na podstawie wyników będących przypadkowymi artefaktami.

- 6) Opis eksperymentów z RNAzą H w części badań własnych, jest napisany w taki sposób, że trudno na pierwszy rzut oka powiedzieć, które badania Autorka przeprowadziła samodzielnie, a które zostały przeprowadzone w laboratorium prof. Nowotnego. Dopiero lektura części eksperymentalnej pozwoliła mi na zrozumienie, że wszystkie te eksperymenty zostały przeprowadzone w zespole prof. Nowotnego. Nie ma nic złego w prezentowaniu w rozprawie wyników uzyskanych w ramach współpracy naukowej, ale idealnie byłoby, gdyby wkład innych osób w ich uzyskanie został wyraźnie zaznaczony, również, a może w szczególności, w części pracy nazwanej „Results and discussion”. (Ta ostatnia uwaga nie wymaga zaadresowania podczas obrony, chyba, że Autorka uzna to za stosowne).

Praca jest staranie przygotowana pod względem językowym i edytorskim, jednak Autorka nie ustrzegła się pewnych drobnych usterek, które z obowiązku recenzenta chciałabym tutaj wymienić:

- 1) Strona 90, eksperymenty z RNAzą H - w tekście brakuje odniesienia do Fig. 54.
- 2) Strona 45, wkradła się tutaj pewna nieścisłość – to prawda, że Cys i Met to aminokwasy białkowe, ale tylko Cys może tworzyć wiązania disulfidowe.
- 3) Niewielkie problemy z formatowaniem (puste fragmenty stron) np. Na str 80 i w innych miejscach.
- 4) Prawidłowy termin to “mass spectrometry” (spektrometria mas), nie „mass spectroscopy”.

Pomimo wymienionych powyżej niedoskonałości, nie mam wątpliwości, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest dziełem o dużej wartości merytorycznej. Praca dotyczy bardzo ważnej tematyki modyfikacji oligonukleotydów RNA i ich zastosowania w sieciowaniu z innymi biomolekułami. W ramach rozprawy Autorka dokonała interesującego przeglądu literatury, a następnie opracowała procedury wydajnego otrzymywania i izolacji analogów RNA miejscowo-specyficznie modyfikowanych w obrębie wiązań fosfodiesterowych resztą cysteaminową. Autorka zbadała również wstępnie reaktywność tego typu połączeń. Co bardzo ważne, otrzymane przez Autorkę oligonukleotydy zostały znalazły już zastosowanie jako narzędzia molekularne do badania RNAzy H, co świadczy o dużej przydatności tego typu połączeń. Z pełnym przekonaniem stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie Dz. U. 2018 poz. 1668. USTAWA z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i





UNIVERSITY  
OF WARSAW

Faculty of Physics  
Institute of Experimental Physics

nauce z późniejszymi zmianami i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Anny Stasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

*Joanna Kowalska*