

Warszawa, dn. 31.07.2018

Prof. dr hab. Ryszard Stolarski
UNIwersytet Warszawski
WYDZIAŁ FIZYKI
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Biofizyki
ul. Pasteura 5
02-093 Warszawa

Tel. 22 55 32 303
E-mail: Ryszard.Stolarski@fuw.edu.pl

Recenzja rozprawy habilitacyjnej p.t.

**”Synteza fragmentów tRNA zawierających modyfikowane urydyny z
pozycji wahadłowej”**

oraz

całości kształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

dr Grażyny Leszczyńskiej

Koncentracja wysiłków badawczych na zagadnieniach sekwencjonowania kwasów deoxyrybonukleinowych DNA i wysokoprzepustowej (*high throughput*) analizie białek uległa w okresie ostatnich kilku lat istotnemu rozszerzeniu na kwasy rybonukleinowe RNA. Szybki rozwój dziedzin badawczych typu "omics": genomiki, proteomiki, metabolomiki i transkryptomiki, związanych z funkcjonowaniem polimerów biologicznych i regulacją ich funkcjonowania na poziomie molekularnym, prowadzi do uzyskiwania niezwykle szerokiego spektrum nowych danych i stawia nowe problemy do rozwiązania w zakresie biofizyki i biologii molekularnej oraz zastosowań uzyskanych wyników w chemioterapii i biotechnologii. Zagadnienia związane ze strukturą i oddziaływaniami cząsteczek RNA okazały się w ostatnim okresie niezwykle istotne dla analizy procesów ekspresji genu w komórce i zastosowań do celów terapeutycznych, czego przykładem mogą być profile ekspresji genów, uzyskiwane przy użyciu sekwencjonowania RNA czy mikromacierzy. „Świat RNA” okazuje się niezwykle bogaty strukturalnie i pod tym względem przypomina białka. Spektakularne osiągnięcia w wyznaczaniu struktur przestrzennych biomolekuł i ich kompleksów z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej (rozwiązanie struktur rybosomu bakteryjnego i rybosomu eukariotycznego), wielowymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego NMR, komputerowego projektowania molekularnego i kriomikroskopii elektronowej o szybko wzrastającej rozdzielczości, wymagają komplementarnych badań z wykorzystaniem technik umożliwiających ilościową analizę oddziaływań międzycząsteczkowych biopolimerów i ich oddziaływań z kluczowymi dla funkcjonowania

ośrodkami, wodnym i hydrofobowym błony, czy też analizę dynamicznych aspektów funkcjonowania kwasów nukleinowych i białek, takich jak przekształcenia konformacyjne i zwijanie do struktur natywnych. Transferowe kwasy rybonukleinowe tRNA, pomimo relatywnie niewielkiej masy cząsteczkowej w porównaniu z innymi biopolimerami, charakteryzują się niezwykle bogatym udziałem chemicznie modyfikowanych nukleozydów, które odgrywają kluczową rolę w stabilizacji ich struktury przestrzennej i regulacji ekspresji genu. Zagadnienia relacji między nietypowymi nukleozydami i różnorodnymi mechanizmami regulacyjnymi, przede wszystkim w procesie translacji mRNA, zostały wyczerpująco scharakteryzowane w przeglądowej pracy w czasopiśmie *Cellular and Molecular Life Sciences*, w której habilitantka jest drugim z czterech współautorów. Wraz z jednym zgłoszeniem patentowym [H10], publikacja przeglądowa "*Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA*" została włączona z oznaczeniem [H11] do cyklu prac [H1] ÷ [H11] stanowiących osiągnięcie naukowe i stanowi bardzo dobre, merytoryczne uzasadnienie naukowego znaczenia tematyki podjętej w rozprawie habilitacyjnej oraz w sposób bardziej ogólny niż w (pozostałych) pracach "regularnych" sygnalizuje nowe możliwości i kierunki badań.

Omówienie zasadniczej części rozprawy czyli cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zacznę typowo od strony ich zawartości merytorycznej, w tym określenia udziału dr Grażyny Leszczyńskiej w uzyskaniu opublikowanych danych. Rozprawa obejmuje wyniki uzyskane i ujęte przez habilitantkę w serii **dziiesięciu oryginalnych publikacji** oznaczonych od [H1] do [H9], które ukazały się w latach 2012 - 2017 w anglojęzycznych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (z tzw. "listy filadelfijskiej"), **jednego polskiego zgłoszenia patentowego** oznaczonego [H10] z 2012 r. i wspomnianej już **pracy przeglądowej** [H11] z 2016 r. w wysoko notowanym czasopiśmie *Cellular and Molecular Life Sciences*. Prace liczą od dwóch do siedmiu współautorów. W publikacjach [H1] ÷ [H9] dr Grażyna Leszczyńska jest pierwszym współautorem i/lub "autorem do korespondencji" (tzw. *corresponding author*), o decydującym wkładzie własnym w ich powstanie, deklarowanym w jej ocenie od 70% do 40%. Swój udział w zgłoszeniu patentowym [H10] habilitantka ocenia na 50%. Ocenę jej wkładu potwierdzają oświadczenia 12 współautorów, którzy stwierdzają, że ich udział w powstawaniu prac miał charakter albo wynikający z kierowania projektami badawczymi (oprócz projektu NCN kierowanego przez habilitantkę), tzn. nadzór merytoryczny nad badaniami, dyskusja wyników, edycja/wspólne pisanie manuskryptów, albo na współpracy doświadczalnej, polegającej na przeprowadzeniu

syntez/oczyszczania niektórych związków, ekspresji białek i wykonywaniu części eksperymentów biofizycznych (spektroskopowych). Wiodący wkład dr Grażyny Leszczyńskiej w planowaniu badań, w przeprowadzeniu syntez nukleozydów i oligomerów RNA oraz w analizie wyników nie budzi wątpliwości.

Zgodnie z założonym celem, rozprawa habilitacyjna dotyczy opracowania nowych metod syntez oligomerów RNA zawierających 5-podstawione urydyny i 2-tiourydyny, zlokalizowane w naturalnych cząsteczkach RNA w pozycji tzw. wahadłowej, odpowiadającej pierwszej literze antykodonu. Modyfikowane nukleozydy w tej pozycji, najczęściej 5-podstawione urydyny, 2-tiourydyny, 2-selenourydyny i S-geranylo-2-tiourydyny, odgrywają istotną rolę w parowaniu antykodonu tRNA z kodonem mRNA, a stąd są czynnikiem warunkującym stabilność kompleksu tRNA-mRNA i tRNA-rybosom oraz czynnikiem regulacyjnym w biosyntezie białek na rybosomie, w tym warunkującym efektywność rozpoznania trzeciej litery kodonu, translokację z miejsca P do A rybosomu i szybkość aminoacylowania. Habilitantka skoncentrowała się na syntezie chemicznej 11 natywnych 5-aminometylourydyn i 5-aminometylo-2-tiourydyn. Następnie, wykonała metodą amidofosforynową na podłożu stałym syntezę pięciu 17-nukleotydowych oligomerów RNA zawierających wymienione pochodne, o sekwencjach fragmentu ramienia i pętli antykodonu drożdżowych, ludzkich i bakteryjnych tRNA (lizyny lub leucyny). Oligomer z *E. coli* zawierający 5-piwaloiloksymetylourydynę posłużył jako związek prekursorowy w post-syntetycznym otrzymaniu oligomerów zawierających 5-metyloaminometylourydynę i 5-taurynometylourydynę. Drogą post-syntetyczną habilitantka przeprowadziła również syntezę oligomerów zawierających S-geranylo-2-tiourydynę ges^2U -RNA i ges^2dU -DNA (na złożu stałym i w roztworze), stosując oligomery z 2-tiourydyną i 2-tio-2'-deoksyurydyną jako związki prekursorowe. Synteza oligomeru DNA została przeprowadzona dla wyjaśnienia rozbieżności w porównaniu z wynikami pracy Wang i wsp. *Chem. Commun.* 51, 16369, 2015 dotyczącymi protokołu deprotekcji w otrzymywaniu ges^2T -DNA (konwersja do N²-metyloizoC). Wykonywane reakcje chemiczne miały z reguły charakter wieloetapowy a przygotowanie modyfikowanych urydyn do włączenia w oligomery wymagały zastosowania odpowiednich grup chroniących, stabilnych w trakcie reakcji, ale możliwych do usunięcia po uzyskaniu oligomerów. Jednym z ważniejszych elementów było opracowanie nowego (niestandardowego) systemu utleniania fosforynu do fosforanu bez ubocznej reakcji utleniania/desulfuracji 2-tiourydyny.

W konkluzji merytorycznej strony wyników badawczych uzyskanych przez dr Grażynę Leszczyńską w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe [H1] ÷ [H11] należy stwierdzić, że:

(a) Za najważniejsze w mojej (subiektywnej) ocenie osiągnięcia rozprawy uważam:

- wprowadzenie 5-piwaloiloksymetylo pochodnych urydyny i 2-tiourydyny do syntez szerokiej klasy (tio)urydyn różnorodnie modyfikowanych w pozycji 5 pierścienia zasady (publikacja H5), oraz wykorzystanie tego nowego syntonu do post-syntetycznego otrzymywania oligorybonukleotydów (sześć pentamerów modelowych oraz dwa 17-mery o sekwencji trzonu i pętli antykodonu bakteryjnego tRNA lizyny) zawierających zmodyfikowane 5-aminometylourydyny (publikacja H8);

- sformułowanie hipotezy o roli S-geranylo-2-tiourydyn w pozycji wahadłowej tRNA w przesunięciu preferencji odczytu trzeciej litery kodonu z A do G, m. in. na podstawie prostych ale adekwatnych pomiarów temperatur topnienia helis RNA (i DNA).

(b) Sposób ujęcia i prezentacji dorobku naukowego jest przejrzysty i logiczny, a jego parametry bibliometryczne (omówione w dalszej części recenzji) w pełni zadawalające. Załączony do rozprawy habilitacyjnej autoreferat stanowi bardzo dobry "przewodnik" po pracach oryginalnych. Jediną uwagę krytyczną jaką mogę zgłosić do autoreferatu, to brak krótkiej chociaż wzmianki o sposobach weryfikacji struktur chemicznych modyfikowanych nukleozydów, które były otrzymywane w syntezach organicznych oraz sposobu potwierdzania sekwencji syntetyzowanych oligomerów. Oczywiście, weryfikacja struktur chemicznych przy wykorzystaniu spektrometrii mas i metod spektroskopowych, głównie magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR i ^{13}C NMR, jest zawarta w częściach eksperymentalnych (*Experimental, Material and Methods*) prac oryginalnych i nie budzi wątpliwości.

Wyniki bibliometryczne dr Grażyny Leszczyńskiej są na dobrym poziomie. *Impact factor* czasopism jest wysoki (średnio 3,6), przy czym warto zwrócić uwagę na publikacje w dwu renomowanych czasopismach: *Nucleic Acids Research* (publikacja H7) i *RNA* (publikacja H4). Liczba cytowań dla całego dorobku habilitantki, który w znaczącej mierze powstał po doktoracie, wynosi 266 bez autocytowań, co w konsekwencji daje jej indeks Hirscha równy 7. Poza pracami ujętymi w cyklu publikacji habilitacyjnej dr Grażyna Leszczyńska jest współautorem dalszych 11 opublikowanych prac "regularnych" z bazy *Journal Citation Reports* (A1 ÷ A11), 6 monografii i prac spoza bazy JCR (B1 ÷ B6 lub C1 ÷ C6; różne oznaczenia w różnych miejscach materiałów habilitacyjnych) oraz 42 doniesień konferencyjnych, w tym trzech w formie referatów ustnych.

Publikacje, które nie wchodzą w skład cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe obejmują zagadnienia tematycznie związane z tym cyklem i (według autoreferatu) dotyczą zastosowania syntetycznych, modyfikowanych oligorybonukleotydów do analizy trzech podstawowych zagadnień: mechanizmu translacji, selekcji inhibitorów namnażania patogenów, HIV-1 i *Staphylococcus aureus* oraz aktywności enzymów modyfikujących tRNA. W zakresie selekcji inhibitorów patogenów należy podkreślić efektywną współpracę z firmą TRANA DISCOVERY, USA. Myślę, że warto było zamieścić w materiałach habilitacyjnych odbitki 2 - 3 reprezentatywnych prac dla tej części dorobku. Dorobek badawczy i praca w charakterze recenzenta w czasopiśmie (w tym 7 recenzji dla *Journal of Organic Chemistry*) bardzo dobrze świadczy o aktywności naukowej dr Grażyny Leszczyńskiej i o jej „rozpoznawalności” w środowisku naukowym.

Zdobywanie środków grantowych jest ważnym czynnikiem na drodze do osiągnięcia samodzielnej pozycji naukowej i organizacji własnej grupy badawczej. Osiągnięcia dr Grażyny Leszczyńskiej w tym zakresie należy ocenić pozytywnie. Habilitantka kierowała projektem NCN w latach 2011 - 2015 oraz brała udział w charakterze wykonawcy w czterech dalszych projektach NCN. W pracy badawczej podejmowała współpracę zarówno z ośrodkami o profilu podstawowym, m. in. z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, z Uniwersytetem w Oslo, jak i z firmą farmaceutyczną TRANA DISCOVERY Inc., Cary, USA.

Działalność dydaktyczna dr Grażyny Leszczyńskiej jest bardzo bogata i różnorodna. Obejmuje opracowanie, przygotowanie i prowadzenie 4 wykładów o profilu (bio)chemicznym dla studentów I i II stopnia w macierzystej jednostce, prowadzenie wykładów popularyzatorskich na Festiwalu Nauki, przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z zakresu chemii, w tym kierowanie pracownią preparatyki organicznej. Działalność dydaktyczną uzupełnia różnorodna opieka nad studentami i doktorantami. Dr Grażyna Leszczyńska wypromowała znaczącą liczbę 10 magistrów i 16 inżynierów, a także opiekowała się 4 doktorantami, w tym dwoma z nich jako promotor pomocniczy.

Podsumowując sylwetkę naukową habilitantki stwierdzam, że jej dorobek naukowy, aktywność w prowadzeniu zajęć dydaktycznych i praca organizacyjna na rzecz środowiska naukowego nie budzą wątpliwości. Dr Grażyna Leszczyńska wykazuje wszystkie niezbędne cechy samodzielnego badacza. Przedstawiony do oceny cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, [H1 do [H11], oraz osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne spełniają w mojej opinii wszystkie niezbędne kryteria stawiane kandydatom do stopnia

doktora habilitowanego, które są zwyczajowo przyjmowane w środowisku naukowym badaczy zajmujących się tego typu tematyką oraz są określone przez stosowne przepisy ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (wraz z późniejszymi zmianami).

Ryszard Stolarski

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping loops and strokes, positioned to the right of the printed name.