



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfeldta
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
DR HAB. TOMASZ GOSZCZYŃSKI
LABORATORIUM CHEMII BIOMEDYCZNEJ
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel.: +48 713371172; fax.: +48 713372171

Wrocław, 25 czerwca 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Damiana Kaniowskiego
„Oligonukleotydy antysensowe i ich nanostruktury skoniugowane z klastrami boru;
charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna”

Rozprawę doktorską stanowi zbiór pięciu oryginalnych, powiązanych tematycznie, eksperymentalnych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 – 2021. W skład wchodzi następujące publikacje:

1. Ebenryter-Olbinska, K., Kaniowski, D., Sobczak, M., Wojtczak, B. A., Janczak, S., Wielgus, E., Nawrot, B., and Lesnikowski, Z. J. (2017) *Versatile Method for the Site-Specific Modification of DNA with Boron Clusters: Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Antisense Oligonucleotide Case*, Chem. Eur. J. 23, 16535-16546.
2. Kaniowski, D., Ebenryter-Olbinska, K., Sobczak, M., Wojtczak, B., Janczak, S., Lesnikowski, Z. J., and Nawrot, B. (2017) *High Boron-loaded DNA-Oligomers as Potential Boron Neutron Capture Therapy and Antisense Oligonucleotide Dual-Action Anticancer Agents*, Molecules 22(9), 1393.
3. Kaniowski, D., Kulik, K., Ebenryter-Olbinska, K., Wielgus, E., Lesnikowski, Z., and Nawrot, B. (2020) *Metallacarborane Complex Boosts the Rate of DNA Oligonucleotide Hydrolysis in the Reaction Catalyzed by Snake Venom Phosphodiesterase*, Biomolecules 5; 10(5), 718.
4. Kaniowski, D., Ebenryter-Olbinska, K., Kulik, K., Janczak, S., Maciaszek, A., Bednarska-Szczepaniak, K., Nawrot, B., and Lesnikowski, Z. (2020) *Boron clusters as a platform for new materials: composites of nucleic acids and oligofunctionalized carboranes (C₂B₁₀H₁₂) and their assembly into functional nanoparticles*, Nanoscale 12, 103-114.
5. Kaniowski, D., Ebenryter-Olbinska, K., Kulik, K., Suwara, J., Cypryk, W., Jakobik-Kolon, A., Lesnikowski, Z., and Nawrot, B. (2021) *Composites of Nucleic Acids*

Prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W czterech pracach mgr Kaniowski jest pierwszym autorem.

Rozprawa doktorska poprzedzona jest obszernym wstępem, w którym Autor omówił główne zagadnienia tematyczne istotne z punktu widzenia prowadzonych w ramach doktoratu badań oraz zobrazowania perspektyw zastosowań B-ASO w przyszłości. Doktorant wymienia szczegółowe cele badawcze, uzasadnia wybór modelu badawczego oraz analizuje znaczenie uzyskanych wyników. Autor omawia kolejno terapeutyczne kwasy nukleinowe analizując ich strukturę, mechanizmy działania oraz perspektywy zastosowań terapeutycznych. Skrupulatnie analizuje ich wady i zalety zarówno na poziomie molekularnym jak i systemowym. Na uwagę zasługuje szczegółowa analiza modyfikacji chemicznych wpływających na kluczowe parametry determinujące skuteczność terapeutyczną ASO skupiając się na (1) transporcie błonowym, (2) ukierunkowanej dystrybucji względem komórek docelowych oraz (3) podatności na degradację enzymatyczną.

Następnie scharakteryzowany został cel molekularny - naskórkowy receptor wzrostu (EGFR). Autor zwraca uwagę na aspekt ilościowy – nadekspresja EGFR ma kluczowe znaczenie w rozwoju wielu nowotworów, a w dalszych etapach może przyczyniać się do oporności komórek nowotworowych na chemio- i radioterapię.

Następnie krótko scharakteryzowane zostały trzy klasy klasterów boru jako struktur które mogą służyć do korzystnych modulacji aktywności biocząsteczek. Ostatni punkt wstępu dotyczy terapii borowo-neutronowej nowotworów. Po krótkim rysie historycznym Autor opisał podstawy fizyczne BNCT oraz szczegółowo omówił związki wykorzystywane lub badane pod kątem potencjalnych zastosowań – selektywnych nośników boru. Wstęp ten bardzo udanie wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Doktorant bardzo konkretnie sprecyzował założenia i cel pracy, dzieląc badania na trzy części, których wspólnym elementem była ocena właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych dla (1) B-ASO w formie liniowej, skierowanych na fragment genu EGFR,

(2) B-ASO wielokrotnie podstawionych resztami FESANu oraz (3) B-oligopodów i tworzących się z nich uporządkowanych nanostruktur.

Należy podkreślić interdyscyplinarny charakter przedstawionych badań: synteza nowych koniugatów B-ASO, ich szeroka charakterystyka fizykochemiczna, a także zaawansowane badania biologiczne. Materiał ten jest niezwykle obszerny.

Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób profesjonalny i ciekawy, w oparciu o prawidłowo dobrane źródła literaturowe.

Doktorant wspomniał o globalnym problemie związanym z narastającą liczbą pacjentów z chorobami nowotworowymi co powoduje pilną potrzebę poszukiwania skutecznych terapii. W tym kontekście wszelkie badania pogłębiające wiedzę o molekularnych mechanizmach pozwalających zapanować na sytuacjami patologicznymi są uzasadnione i pożądane - nie tylko pogłębiają wiedzę podstawową, ale mogą potencjalnie mieć wartość aplikacyjną. Do takiego właśnie obszaru zaliczam badania mgra Kaniowskiego. Za jeden z najciekawszych aspektów prezentowanych badań uważam opisanie interakcji powodowanych obecnością klasterów boru i ich konkretne skutki biologiczne. Niezwykle ważnym osiągnięciem jest stworzenie nanostruktur o określonej stechiometrii oraz opisanie pośrednictwa w oddziaływaniach białko – kwas nukleinowy jakie wywierają klaster boru (kinetyka hydrolizy za pomocą 3'-egzonukleazy z jadu węża). Uzyskanie tych wyników wymagało od doktoranta rozsądnego i kreatywnego podejścia do planowania i wykonania dużej liczby eksperymentów.

W kwestii BNCT podzielam zdanie mgra Kaniowskiego, że nośniki boru o podwójnym działaniu - antyproliferacyjnym i dającym możliwości zastosowania radioterapii są dobrym pomysłem i mogą przynieść długo wyczekiwany sukces tej metody leczenia.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa stanowi ważny element poznania mechanizmów interakcji klasterów boru z biocząsteczkami. Oprócz głównego tematu – koniugatów klasterów boru z ASO, dotyka szerszych aspektów oddziaływań klasterów boru ze środowiskiem biologicznym. Badania tego typu są niezwykle intrygujące, ponieważ natury ani zakresu tych oddziaływań w pełni nie znamy, a dane literaturowe z ostatniej dekady sugerują - w tym doskonale wpisujące się publikacje będące podstawą recenzowanej rozprawy - że badania w tym obszarze mogą

przyczynić się do stworzenia zupełnie nowej klasy związków o potencjale terapeutycznym.

Zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójny tematycznie, Doktorant bardzo szczegółowo opisuje swój udział w powstaniu każdej z prac. Zestawiając te informacje z oświadczeniami współautorów oraz analizując informacje o udziale poszczególnych autorów zawarte w publikacjach (Author Contributions) stwierdzam, że deklarowany wkład oraz zakres zrealizowanych przez mgra Kaniowskiego zadań badawczych, przyczyniających się do powstania każdej z publikacji są znaczące i świadczą o posiadaniu dogłębnej wiedzy tematycznej oraz o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego.

W rozdziale VIII Doktorant prezentuje nieopublikowane dane związane z tematem rozprawy oraz przedstawia plany badawcze na przyszłość. Stanowi to materiał dodatkowy względem głównych zagadnień rozprawy. Warto jednak zauważyć, że informacje te wskazują na ponadprzeciętne umiejętności w kreowaniu nowych zagadnień badawczych oraz skuteczność w pozyskiwaniu funduszy na badania.

Cała opisowa część rozprawy napisana jest bardzo porządnie, szczegółowo i została dobrze zredagowana. Niewielkie błędy redakcyjne pojawiają się sporadycznie (np.: str. 15, 47, 48), nazwy dwudziestościennych klasterów boru pisane są po polsku natomiast nazwa metalokarboranu pisana jest po angielsku. Podobnie jest z opisami rysunków. Inne niedociągnięcia jakie pojawiły się w trakcie czytania rozprawy doktorskiej wymieniam poniżej:

- modyfikacje są w liczbie a nie ilości (str. 28, 62) podobnie jak atomy boru (str. 40, 44 48, 73, 75)
- protestuję przeciw sformułowaniu „nanostruktury nie indukowały stanu zapalnego makrofagów pozyskanych od zdrowych dawców”.

Powyższe uwagi nie wazą w żadnej mierze na bardzo wysokiej ocenie pracy doktorskiej mgra Damiana Kaniowskiego, a wymieniam je po to aby pokazać, że pracę przeczytałem starannie.

Reasumując stwierdzam, że przyszło mi recenzować nowatorską i dobrze zrealizowaną pracę doktorską, wpisującą się w niezwykle ciekawy obszar nauki – wykorzystanie klasterów boru/metalokarboranów w biologii. Praca ta spełnia wszystkie warunki, zarówno ustawowe jak i zwyczajowe, jakie stawia się pracom doktorskim i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie Pana mgra Damiana Kaniowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponieważ praca doktorska Pana mgra Damiana Kaniowskiego niewątpliwie jest na poziomie wyższym niż bardzo dobry i zaprezentowano w niej bogaty i nowatorski materiał badawczy opublikowany w prestiżowych międzynarodowych czasopismach naukowych, wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

