

dr hab. Michał Sobkowski, prof. ICHB PAN  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

Poznań, 19.07.2021

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Kaniowskiego

pt. „Oligonukleotydy antysensowe i ich nanostruktury skoniugowane z klastrami boru; charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Damiana Kaniowskiego dotyczy badań syntetycznych oligonukleotydów z przyłączonymi klastrami boru w kontekście ich wykorzystania jako donorów atomów boru do komórek nowotworowych w celu ich zniszczenia za pomocą techniki terapii borowo-neutronowa. Doktorant zajął się więc bardzo ważnym obszarem badawczym związanym z poszukiwaniem nowych podejść w walce z chorobami nowotworowymi. Praca ma charakter interdyscyplinarny, łącząc zaawansowaną syntezę chemiczną z badaniami biomedycznymi nad efektywnością uzyskanych związków.

Rozprawa została napisana w języku polskim pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot. Ma ona dość nietypowy układ, łączący cechy klasycznej rozprawy doktorskiej w formie monografii naukowej z tzw. spiną, czyli zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. W tym przypadku mamy do czynienia raczej z drugą formą, jednak opatrzoną obszernym (34 strony) wstępem literaturowym i wyczerpującym komentarzem. Praca zawiera wszystkie wymagane (i nie tylko) elementy – streszczenia w języku polskim i angielskim, opis założeń i celu badań uwzględniający szczegółowy plan badań, zestawienie wyników w postaci zwięzłych streszczeń publikacji wchodzących w skład rozprawy, dyskusję (17 stron), wnioski, opis perspektyw, obszerny spis wykorzystanej literatury (155 pozycji), oświadczenia współautorów o wkładzie oraz zestawienie 5 publikacji stanowiących podstawę rozprawy uzupełnionych o 2 prace dodatkowe. Do ww. elementów dołączone są kopie wszystkich artykułów stanowiących pracę doktorską. Doktorant podaje też zestawienie 4 projektów badawczych, w których brał udział, w tym w 3 z kierowniczą rolą, tj. w trwającym jeszcze grantie NCN „ETIUDA” oraz wcześniej w 2 projektach MNiSW dla młodych naukowców.

Pewnym mankamentem jest brak spisu zastosowanych skrótów i akronimów, co utrudnia płynne czytanie pracy, tym bardziej, że ma ona charakter interdyscyplinarny i zapewne większości czytelników – w tym recenzentowi – nie jest łatwo zorientować się we wszystkich skrótach stosowanych w różnych obszarach nauki, tym bardziej, że mogą one mieć różne znaczenia w różnych dyscyplinach.

Za szczególnie cenne uważam natomiast wskazanie przez Doktoranta jednoznacznego opisu wkładu własnego w publikacje stanowiące rozprawę, co pozwala ocenić jego rzeczywisty dorobek naukowy. Świadczy to o wysokiej rzetelności Doktoranta i może być wskazywane jako wzór, jak należy uczciwie przedstawiać swoje osiągnięcia.

Część literaturowa dotyczy 3 obszarów – (i) terapeutycznych zastosowań kwasów nukleinowych, (ii) roli naskórkowego receptora wzrostu EGFR w nowotworach oraz terapii ukierunkowanych na EGFR i (iii) terapii borowo-neutronowej (BNCT).

W części pierwszej wstępu literaturowego czytelnik zostaje zaznajomiony z tematyką terapii z zastosowaniem oligonukleotydów, w tym strategii antysensowych i wykorzystaniem mechanizmu interferencji RNA. Z dużym zainteresowaniem czytałem zwłaszcza podrozdział dotyczący niekorzystnych skutków ubocznych terapii

antysensowej. Zapewne mało kto zdaje sobie sprawę, że ta w założeniu niezwykle precyzyjnie ukierunkowana strategia terapeutyczna może prowadzić do wielu, i to znaczących, efektów niepożądanych. Pomimo tych problemów strategia terapeutycznych kwasów nukleinowych nadal jest przedmiotem badań i kilkadziesiąt tego typu związków znajduje się w różnych fazach badań klinicznych (S.T. Crooke i współpr., „Antisense drug discovery and development technology considered in a pharmacological context”, *Biochem.Pharmacol.* 189, art. nr 114196, 2021, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114196>); chętnie wysłucham więc opinii Doktoranta, jakie są w jego ocenie perspektywy tego podejścia terapeutycznego, czy plusy przeważają nad minusami, czy też odwrotnie. W tej części zabrakło mi wzmianki o niedawnych pracach nad terapeutycznym wykorzystaniem antysensowych oligonukleotydów o zdefiniowanej konfiguracji na chiralnych centrach tiofosforanowych. Wprawdzie informacje na ten temat ograniczają się obecnie do kilku doniesień konferencyjnych, jednak biorąc pod uwagę fundamentalne osiągnięcia zespołu prof. Wojciecha Steca w stereokontrolowanej syntezie tiofosforanów oligonukleotydów, można było oczekiwać, że zostaną one wspomniane. Ciekaw jestem, czy Doktorant jest zaznajomiony z tymi komunikatami?

Rozdział dotyczący roli naskórkowego receptora wzrostu (EGFR) w procesie nowotworzenia i strategii terapeutycznych z tym związanych uważam za napisany w pełni poprawnie.

Nieco gorzej oceniam rozdział dotyczący podstaw terapii borowo-neutronowej (BNCT). Odnoszę wrażenie, że Doktorant mniej sprawnie porusza się w obszarze chemii jądrowej, wliczając w to pewne lapsusy językowe („Po raz pierwszy wiązka neutronów została zbadana przez J. Chadwicka w roku 1932” – należałoby raczej podać, że w 1932 r. Chadwick odkrył istnienie neutronów; „cząstkami  $\alpha$  generowanymi z radioaktywnego pierwiastka polonu” – pomijając niepoprawną gramatykę tego zdania, cząstki  $\alpha$  nie są „generowane” z polonu, a są produktem jego rozpadu promieniotwórczego; „...generowało cząsteczki helu ( $^4\text{He}$ ), litu ( $^6\text{Li}$ ) oraz innych pierwiastków” – tu proszę Doktoranta o wyjaśnienie, jakie jest poprawne znaczenie terminu „cząsteczka” i jakiego terminu należało użyć w odniesieniu do  $^4\text{He}$  i  $^6\text{Li}$ ; czy wreszcie nazwanie produktu reakcji jądrowej izotopu  $^{10}\text{B}$  z neutronem jako „przejściowy niestabilny izotop boru  $^{11}\text{B}^*$ ” – tu także proszę o wyjaśnienie, co oznacza gwiazdka przy symbolu i dlaczego takie jądro jest niestabilne, a „zwykły”  $^{11}\text{B}$  jest trwały). W części tej oczekiwałbym również akapitu przedstawiającego wykorzystanie związków boru wzbogaconych w izotop  $^{10}\text{B}$ . Izotop ten stanowi jedynie 20% naturalnego składu tego pierwiastka, a właśnie on charakteryzuje się niezwykle wysokim przekrojem czynnym na pochłonięcie neutronu. Doktorant wspomniał jedynie o leku *Steboronine*, czyli fenyloalaninie niosącej grupę boranową z izotopem  $^{10}\text{B}$ , odczułem jednak pewien niedosyt wiedzy na ten temat. Czy związki  $^{10}\text{B}$  są łatwo czy trudno osiągalne handlowo i syntetycznie? Czy są kosztowne? Czy badania nad ich wykorzystaniem medycznym są częste, czy raczej marginalne? Prosiłbym Doktoranta o komentarz na ten temat podczas obrony swojej rozprawy.

Przedstawione następnie omówienie trzech generacji związków boru wykorzystywanych w terapii BNCT jest zrobione w sposób w pełni satysfakcjonujący czytelnika.

Część literaturową rozprawy traktuję jako wartość dodaną rozprawy, która w formie spinki publikacji mogłaby być jej w ogóle pominięta. Na duże uznanie zasługuje więc wysiłek Doktoranta, aby w ten sposób przybliżyć czytelnikowi tematykę jego dysertacji. Z obowiązku recenzenta wskażę kilka drobnych uchybień, które napotkałem w tej części:

- Przypis 25 na s. 22, który powinien potwierdzać niepowodzenia koncepcji koniugacji ASO z niespecyficznymi ligandami, to w rzeczywistości praca dotycząca nomenklatury związanej ze śmiercią komórek. O którą publikację chodziło w rzeczywistości?
- W przypisie 84 na s. 37 podane jest nieistniejące czasopismo „Clin. Trial” (nie jest to czasopismo, lecz nagłówek w bazie PubMed). Prosiłbym o podanie poprawnego adresu bibliograficznego tej publikacji.
- S. 25: Doktorant podaje, że niezależne od hybrydyzacji skutki uboczne podawania ASO często są myląco określane jako *off target effects*. Nie podważając racji Doktoranta, z ciekawości prosiłbym o wyjaśnienie,

jak prawidłowo nazywać tego rodzaju efekty uboczne i do jakich zjawisk ogranicza się poprawnie użyty termin *off target effects*.

- Drobne nieścisłości (nie wymagające odpowiedzi podczas obrony):
  - koncepcja gapmerów znana jest od kilkunastu lat, więc nazywanie jej „innowacyjną” (s. 21) jest anachronizmem;
  - anglojęzyczny szyk wyrazów („c3'-endo konformacja”);
  - angielskie zamiast polskich pełne nazwy związków;
  - skrót myślowy: albumina [...] zwiększa farmakokinetkę PS-ASO (s. 18);
  - „enzym ulegający ekspresji” (s. 18) – ekspresji ulegają geny, nie białka;
  - s. 35: „Klastry boru cieszą się dużym zainteresowaniem wśród naukowców ze względu na obiecujące narzędzia terapeutyczne [...]”;
  - pewien brak staranności widać w przypisach – czasem podani są wszyscy autorzy publikacji, czasem jedynie pierwszy autor z dopiskiem et al.; nazwy czasopism budzą w niektórych przypadkach zdziwienie (np. *Appl. Radiat. Isot. Incl. data, Instrum. methods use Agric. Ind. Med.* zamiast *Appl. Radiat. Isot.* czy *Gastroenterol. Rev. Gastroenterol.* zamiast *Przegląd Gastroenterologiczny*); w kilku odnośnikach nazwiska zapisane kapitalikami; zmieszanie tytułu książki z tytułem rozdziału w przypisie 82; rozmaite inne drobne błędy.

Zakończywszy przegląd literaturowy Doktorant wprowadza czytelnika w założenia i cel pracy, którą podzielił na trzy części. W pierwszej z nich zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane antysensowe oligonukleotydy niosące przyłączone klastry boru (B-ASO), a także zbadane zostały ich właściwości biologiczne w odniesieniu do komórek zdrowych i nowotworowych. Oligonukleotydy te ukierunkowane były na hybrydyzację z mRNA kodującym naskórkowy receptor wzrostu EGFR, którego nadekspresja i wysoki poziom jest cechą charakterystyczną tkanek nowotworowych, sprzyjając ich wzrostowi, a jednocześnie chroniąc je przed skutkami zastosowanych terapii. Następnie Doktorant przeprowadził syntezę i zbadał właściwości B-ASO zawierających kilka reszt metalakaboranu. Wreszcie Doktorant zajął się nanostrukturami zbudowanymi z oligonukleotydów i klastrów boru i także przebadał ich właściwości.

Uzyskane wyniki opublikowane zostały w pięciu pracach:

1. K. Ebenryter-Olbińska, **D. Kaniowski\***, M. Sobczak, B. A. Wojtczak, S. Janczak, E. Wielgus, B. Nawrot, Z. J. Leśnikowski, „Versatile Method for the Site-Specific Modification of DNA with Boron Clusters: Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Antisense Oligonucleotide Case”, *Chem. Eur. J.* 2017, 23, 16535–16546 (IF= 4,86, punkty MNiSW = 140).  
\* D. Kaniowski – równorzędny pierwszy autor
2. **D. Kaniowski**, K. Ebenryter-Olbińska, M. Sobczak, B. Wojtczak, S. Janczak, Z. J. Leśnikowski, B. Nawrot, „High boron-loaded DNA-oligomers as a potential boron neutron capture therapy and antisense oligonucleotide dual-action anticancer agents”. *Molecules*, 2017, 22, art. nr 1393 (IF=3,31, punkty MNiSW=100).
3. **D. Kaniowski**, K. Kulik, K. Ebenryter-Olbińska, E. Wielgus, Z. Leśnikowski, B. Nawrot, „Metallacarborane Complex Boosts the Rate of DNA Oligonucleotide Hydrolysis in the Reaction Catalyzed by Snake Venom Phosphodiesterase”, *Biomolecules*, 2020, 10, art. nr 718 (IF=4,69, punkty MNiSW=100).
4. **D. Kaniowski**, K. Ebenryter-Olbińska, K. Kulik, S. Janczak, A. Maciaszek, K. Bednarska-Szczepaniak, B. Nawrot, Z. Lesnikowski. „Boron clusters as a platform for new materials: composites of nucleic acids and oligofunctionalized carboranes (C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>12</sub>) and their assembly into functional nanoparticles”, *Nanoscale*, 2020, 12, 103-114. (IF=6,89, punkty MNiSW=140) – artykuł wyróżniony przez redakcję czasopisma.

5. **D. Kaniowski**, K. Ebenryter-Olbinska, K. Kulik, J. Suwara, W. Cypryk, A. Jakóbiak-Kolon, Z. Lesnikowski, B. Nawrot, "Composites of nucleic acids and boron clusters ( $C_2B_{10}H_{12}$ ) as functional nanoparticles for downregulation of EGFR oncogene in cancer cells", *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, art. nr 4863 (IF=4,56; punkty MNiSW=140).

Każdej z ww. publikacji towarzyszy syntetyczne przedstawienie jej tematyki i wykonanych badań oraz wkładu własnego, co uważam za bardzo wartościowy element rozprawy, ułatwiający zorientowanie się w obszernym materiale badawczym. W następnej części, zatytułowanej „Dyskusja” Doktorant omówił szerzej uzyskane wyniki.

W celu otrzymania oligonukleotydów niosących klastry boru przygotowane zostały amidofosforyny zawierające grupę propargilową w pozycji 2' urydyny lub N3 tymidyny. Syntony te zostały wprowadzone do oligonukleotydów w zaprojektowanych pozycjach i poddane reakcji typu „click” z klastrami boru wyposażonymi w łączniki zakończone grupą azydową. Sekwencja nukleotydów jest w nich komplementarna do fragmentu mRNA kodującego EGFR i dobrana tak, aby objąć różne warianty transkrypcyjne. Wprowadzenie modyfikacji w pozycji 2' spowodowało niewielkie tylko obniżenie temperatury mięknienia dupleksów z komplementarnym RNA, a co bardzo ciekawe – jednocześnie znacząco zwiększyło zdolność uzyskanych modyfikowanych oligonukleotydów do wyciszania ekspresji docelowego białka. Kontynuując ten nurt badawczy uzyskano oligonukleotydy niosące do pięciu klastrow boru w formie metalakarbaboranu  $[Fe(C_2B_9H_{11})_2]^-$  (FESAN). Tym razem zaobserwowano, zapewne sprzeczny z oczekiwaniami, wzrost ekspresji białka w obecności niskich stężeń oligonukleotydów antysensowych. Dla wyjaśnienia tego zjawiska postawiono i potwierdzono hipotezę o stymulowaniu przez klastry boru procesów obronnych komórki. Zwiększenie stężenia B-ASO doprowadziło do wyciszenia ekspresji, jednak nie silniejszego niż dla referencyjnego ASO. Należy jednak zauważyć że B-ASO z pięcioma resztami metalakarbaboranu niosą ze sobą 90 atomów boru, co jest bardzo obiecujące w kontekście możliwości zastosowania ich w terapii BNCT. Nasuwa się tu pytanie, czy Doktorant rozważał użycie klastrow  $^{10}B$  zamiast naturalnej mieszaniny?

Dalszy ciąg badań nad B-ASO dotyczył wpływu klastrow boru (a konkretnie metalakarbaboranu FESAN) na szybkość degradacji przez fosfodiesterazy. W tym przypadku również dokonano zaskakujących obserwacji – okazało się, że użyte klastry boru nie spowalniają (jak można było spodziewać się z danych literaturowych), lecz przyspieszają hydrolizę enzymatyczną wiązań fosfodiesterowych. Dalsze badania tego zjawiska podjęte przez Doktoranta wskazują, że spowodowane jest to powinowactwem metalakarbaboranu zarówno do białek, w tym nukleaz, jak i kwasów nukleinowych. W efekcie działają one jak katalizatory, zbliżając do siebie obie te cząsteczki, co pozwala enzymowi na skuteczniejsze przecinanie oligonukleotydu.

Kolejną pracą Doktoranta było zbadanie nanostruktur powstających po zmieszaniu roztworów dwóch tzw. tripedów – związków złożonych z klastra boru niosącego dwa identyczne łańcuchy oligonukleotydowe, przy czym jeden z tripedów zawierał oligonukleotydy antysensowe, a drugi – nici komplementarne. Stosując techniki AFM i krio-TEM Doktorant wykazał powstawanie pierścieniowych nanostruktur, głównie z zakresu rozmiarów 20-40 nm. Co ciekawe, pomimo tworzenia przez składowe oligonukleotydy układów komplementarnych, uzyskane nanostruktury wykazywały znaczące hamowanie ekspresji EGFR, są też nieco bardziej odporne na działanie nukleaz, a także są interesującymi kandydatami na donory atomów boru w terapii BNCT.

Przedstawiony w niniejszej recenzji opis badań Doktoranta jest bardzo skrótowy i obejmuje jedynie najważniejsze i najciekawsze wyniki zawarte w opublikowanych 5 artykułach i omówione w dysertacji.

Kolejną częścią rozprawy jest zestawienie wniosków płynących z wykonanych prac, a następnie kilkunastoparagrafowy opis perspektyw i planów dalszych badań Doktoranta, związanych z przedstawioną tematyką. Ten element ocenianej pracy doktorskiej uważam za bardzo ciekawy i godny polecenia.

Należy podkreślić, że praca została przygotowana bardzo starannie, zarówno od strony redakcyjnej, jak i językowej. Liczba błędów interpunkcyjnych czy literówek jest bardzo mała. Doktorant biegle posługuje się poprawnym

językiem polskim, choć nie ustrzegł się przed kilkoma anglicyzmami, jak np. „drafty” zamiast „szkice” czy „figury” zamiast „ilustracje”. Są to jednak wyjątki, pracę czyta się płynnie i z dużym zainteresowaniem. Wszystkie moje uwagi krytyczne mają znaczenie marginalne i nie umniejszają bardzo wysokiego poziomu rozprawy.

Nie ulega wątpliwości, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymogi określone zarówno w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.), jak i w Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), wobec czego wnioskuję o dopuszczenie mgr. Damiana Kaniowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN o przyznanie niniejszej rozprawie wyróżnienia. Przemawia za tym niezwykle wysoki poziom przeprowadzonych badań, ich obszerność i interdyscyplinarność. Rozprawę stanowi aż pięć pierwszoautorskich pełnych artykułów naukowych w wysoko notowanych czasopismach z listy JCR (w tym jeden wyróżniony przez redakcję). Ich łączny Impact Factor wynosi 24,31, a łączna punktacja MNiSW to 620 pkt. Z części literaturowej wynika duża wiedza doktoranta i umiejętność przekazania jej w sposób klarowny i ciekawy. Uzyskane wyniki zostały przedstawione starannie i uzupełnione wartościowymi komentarzami. Mój wniosek o wyróżnienie przedkładam z pełnym przekonaniem, że rozprawa na nie zasługuje.