



Wrocław, 31.10.2024 r.

Dr hab. inż. Wioletta Rut-Schedlok, prof. uczelni
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wrocławska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marceliny Bednarczyk
pt. „Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu
selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację
struktury końca 5' mRNA”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marceliny Bednarczyk pt. „Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację struktury końca 5' mRNA” została zrealizowana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Jemielitego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej. Została ona poświęcona opracowaniu metody umożliwiającej poszukiwanie skutecznych inhibitorów aktywności dwóch enzymów odpowiedzialnych za metabolizm końca 5' mRNA – wirusowego D9 oraz ludzkiego DCP2.

Praca doktorska Pani mgr Marceliny Bednarczyk ma układ typowy dla tego typu dysertacji i obejmuje: wykaz skrótów, wprowadzenie, przegląd literaturowy, badania własne, podsumowanie, część eksperymentalną oraz bibliografię. Dodatkowo po spisie treści zamieszczony został wykaz dorobku naukowego oraz lista wystąpień konferencyjnych.

Część literaturowa recenzowanej pracy doktorskiej została poświęcona charakterystyce kwasów nukleinowych ze szczególnym uwzględnieniem informacyjnego RNA, jego roli w komórce, degradacji oraz terapeutycznym zastosowaniu. Doktorantka opisała również metody badań oddziaływań białko-ligand, podstawy fizykochemiczne spektroskopii emisyjnej oraz techniki

elektroforetyczne na przykładzie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Przegląd literaturowy został napisany w sposób zwięzły, przejrzysty i spójny w oparciu o dobrze dobraną, aktualną literaturę. Stanowi dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Charakteryzuje się starannie opracowaną szatą graficzną. Przedstawiane zagadnienia są dokładnie zilustrowane odpowiednimi schematami i rysunkami. Przy tworzeniu pracy doktorskiej trudno uniknąć jednak błędów lub mniej precyzyjnych sformułowań. W ramach obowiązków recenzenta wymienię niektóre z nich:

- str. 20 „zmienia się również nieco parowanie zasad”;
- str. 25 „tworzyć zupełnie nowe pary wodorowe”;
- str. 30 „pośredniczą z eksporcie mRNP do cytozolu”;
- str. 42 „stabilizowany przez asparaginę w pozycji 88 (D88)”;
- str. 42 „a w wyniku cięcia zostaje uwolniony”;
- we wprowadzeniu (pierwszy akapit), podrozdziale 2.1 „Kwasy nukleinowe: rodzaje, budowa, funkcje” (poza ostatnim akapitem) oraz podrozdziale 2.5.2 „Techniki elektroforetyczne na przykładzie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE)” Doktorantka nie zamieściła przypisów bibliograficznych.

Przedmiot i cel badań został umieszczony jako pierwszy podrozdział rozdziału trzeciego zatytułowanego „Badania własne”, powinien jednak stanowić oddzielny rozdział i być umieszczony po przeglądzie literaturowym. W podrozdziale tym, Doktorantka precyzyjnie opisała co jest celem rozprawy doktorskiej oraz w jaki sposób zostanie on osiągnięty, nakreślając plan pracy.

Badania własne Autorka podzieliła na dwa zasadnicze fragmenty: w pierwszym przedstawiła badania dotyczące wirusowego enzymu dekapującego D9, a w drugim ludzkiego enzymu DCP2. Wspólnym mianownikiem tych badań było opracowanie efektywnej metody umożliwiającej poszukiwanie skutecznych inhibitorów enzymów związanych z metabolizmem końca 5' mRNA. W pierwszym etapie badań Doktorantka opracowała sondę fluorescencyjną, którą po optymalizacji warunków reakcji z udziałem enzymu D9 i walidacji, użyła w badaniach HTS związków pochodzących ze zbiorów Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej oraz biblioteki związków farmakologicznie czynnych - LOPAC^{®1280}. W celu potwierdzenia wiarygodności opracowanej metody Pani mgr Bednarczyk wybrała trzy najlepsze inhibitory z biblioteki LOPAC oraz najsilniejszy inhibitor nukleotydowy ($m^7GpppCH_2p$) i wykonała pomiar inhibicji aktywności enzymu D9 wobec krótkiego fragmentu kapowanego RNA. Dla najlepszych inhibitorów Doktorantka wyznaczyła wartości IC_{50} . Ponadto, we współpracy z grupą prof. Grossa z Uniwersytetu Kalifornijskiego uzyskano strukturę krystaliczną enzymu D9 w kompleksie z inhibitorem CP-100356. Analogiczne badania Pani mgr Bednarczyk wykonała dla ludzkiego enzymu dekapującego DCP2. Rozdział „Badania własne” napisany jest w sposób przejrzysty, a starannie przygotowane rysunki i tabele dokumentują uzyskane wyniki i wysunięte na ich podstawie wnioski. W opisach

wykonywanych badań obecne są nieliczne błędy czy też mniej precyzyjne sformułowania jak np. str. 79 „ istnieje konieczność ograniczenia jego ilości w assay'u”; str. 92 „jeśli w miejscu cięcia występuje”; str. 116 „W obu przypadkach substrat pozostawał nietknięty” oraz fragment zdania „wykazywał całkiem przyzwoite właściwości inhibitorowe”; str. 118 „hydrolazy te zaakceptują jako swój substrat”. Widma masowe przedstawione na rysunku 28 powinny zostać zamieszczone również w „Części eksperymentalnej” pracy w lepszej jakości (na rys. 28 są one mało czytelne). W trakcie obrony rozprawy doktorskiej proszę Panią mgr Bednarczyk o komentarz dotyczący wyboru znaczników fluorescencyjnych sondy: dlaczego je wybrano, czy brane były pod uwagę również inne znaczniki, czy prowadzone były badanie z użyciem innych znaczników, ale nie opisano ich w pracy? W opisie rysunku 43 została umieszczona informacja, iż „Analiza densytometryczna nie była możliwa do wykonania ze względu na różnice w aktywności enzymu między powtórzeniami i ograniczonej ilości białka.” proszę o wyjaśnienie co było przyczyną różnic w aktywności enzymu?

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka przypomniała co było celem pracy oraz w jaki sposób cele te zostały osiągnięty, a następnie przedstawiła najważniejsze osiągnięcia prowadzonych badań do których należą:

- opracowanie metody FLINT do badania aktywności enzymu D9 przy użyciu sondy nukleotydowej znakowanej pirenem, optymalizowanej pod kątem badań wysokoprzepustowych ($Z'=0,75$);
- zidentyfikowanie potencjalnych inhibitorów enzymu D9 - przeprowadzono badania biblioteki nukleotydów i wyznaczono parametr IC_{50} , identyfikując 9 związków o $IC_{50} < 4 \mu M$;
- identyfikacja sześciu potencjalnych inhibitorów w badaniach HTS komercyjnej biblioteki LOPAC^{®1280}, z których trzy najlepsze związki to Seliciclib, CP-100356 oraz SCH 5826;
- potwierdzenie uzyskanych wyników za pomocą niezależnej metody z użyciem krótkiego fragmentu kapowanego RNA;
- opracowanie struktury krystalicznej enzymu D9 z inhibitorem CP-100356, co przybliżyło mechanizm inhibicji;
- opracowanie i optymalizacja metody umożliwiającej monitorowania aktywności kompleksu DCP1-DCP2-PNRC2;
- identyfikacja silnych inhibitorów DCP2 ($IC_{50} < 2 \mu M$) oraz potwierdzenie ich skuteczności w niezależnym badaniu z użyciem krótkiego fragmentu RNA.

Zabrakło mi w tej części pracy dyskusji nad uzyskanymi przez Doktorantkę wynikami, co stanowi ważny element dysertacji.

W ostatnim punkcie pt. „Część eksperymentalna” Pani mgr Bednarczyk opisała metodykę prowadzonych badań. Przedstawione opisy zawierają wszystkie niezbędne informacje do

przeprowadzenia tego typu eksperymentów. Zabrakło jedynie widm z analizy LC-MS potwierdzających czystość i masę otrzymanych sond fluorescencyjnych.

Wyniki uzyskane przez Pani mgr Bednarczyk stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny oraz z pewnością zostaną wykorzystane w dalszych badaniach prowadzonych w zespole Promotorów rozprawy. Potwierdzają one wiedzę oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. Badania dotyczące wirusowego enzymu D9 zostały opublikowane w czasopiśmie ACS Chemical Biology, gdzie Doktorantka jest pierwszy autorem. Ponadto Pani mgr Bednarczyk jest współautorką siedmiu artykułów opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Podsumowując stwierdzam, że wyżej wymienione uwagi nie wpływają na mają wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej, która stanowi oryginalne, wartościowe i znaczące osiągnięcie Doktorantki. W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023r. poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Marceliny Bednarczyk do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, ze względu na charakter prowadzonych badań, wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz dorobek naukowy Doktorantki wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Wioletta Rut-Schedlok