



Lublin, 25 kwietnia 2025 r.

Dr hab. Wojciech Grudziński, prof. UMCS
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgra Piotra Surynta
pt. "Synteza i właściwości analogów trimetylokapu
znakowanych fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami"**

Zaawansowane narzędzia molekularne stały się chlebem powszednim współczesnej nauki, są one niezbędne aby zrozumieć złożone procesy biologiczne zachodzące na poziomie komórkowym. Jednym z kluczowych wyzwań w biologii molekularnej i w biofizyce jest precyzyjne śledzenie oraz charakterystyka oddziaływań białko-ligand, które odgrywają fundamentalną rolę w regulacji procesów życiowych. Badania przedstawione w niniejszej pracy wpisują się w ten nurt, oferując nowe narzędzia do analizy interakcji snurportyny – białka zaangażowanego w transport i rozpoznawanie kapowanych RNA – z syntetyzowanymi analogami kapu znakowanymi fluorescencyjnie.

Znaczenie tych badań polega nie tylko na opracowaniu wysokospecyficznych sond molekularnych, ale także na stworzeniu narzędzi pozwalających na badanie dynamiki i lokalizacji snurportyny w warunkach komórkowych. Dzięki wykorzystaniu Fluorescencyjnych Molekularnych Rotorów (FMR), które wykazują specyficzną charakterystykę emisji fluorescencji na wiązanie z białkiem, możliwe stało się uzyskanie informacji zarówno o powinowactwie, jak i specyficzności tych interakcji w czasie rzeczywistym. Tego rodzaju podejście znacząco rozszerza możliwości badawcze w zakresie biofizyki molekularnej, biologii komórki w obszarze związanym z funkcjonowaniem tych związków, a także może mieć potencjalne zastosowanie w diagnostyce i terapii chorób np. takich jak dystrofie mięśniowe.

Dodatkowo zaproponowane w pracy rozwiązania umożliwiają systematyczne badanie wpływu modyfikacji chemicznych na aktywność biologiczną i specyficzność ligandów, co może pomóc w ukierunkowanym projektowaniu leków. Wstępne badania przeprowadzone na żywych komórkach

stanowią krok w stronę wdrożenia tych wyników i otwierają nowe perspektywy w precyzyjniejszym monitorowaniu procesów komórkowych.

W świetle powyższego, przedstawione badania mają istotne znaczenie nie tylko dla poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów molekularnych transportu RNA, lecz także dla rozwoju precyzyjnych metod analizy i obrazowania biologii komórki, co czyni je cennym, interdyscyplinarnym wkładem w rozwój nauki, a w szczególności nauk przyrodniczych i medycznych. Z tej perspektywy rozprawa doktorska Pana mgra Piotra Surynta jest opracowaniem interesującym i ważnym.

Przedstawione przez Doktoranta badania istotnie przesuwają granice nauki i przyczyniają się do rozwoju nowych metod badania interakcji białko-ligand, dostarczają szczegółowych informacji o wiązaniu snurportyny do analogów kapu, identyfikują obiecujące sondy fluorescencyjne do dalszych badań biologicznych i otwierają nowe możliwości w zrozumieniu roli snurportyny w procesach komórkowych i patogenezie chorób. Przedstawione w pracy doktorskiej badania dotyczą przede wszystkim syntezy i charakterystyki analogów kapu trimetyloguanozyny (TMG) oraz ich połączeń z fluorescencyjnymi rotorami molekularnymi (FMR). Celem zaprezentowanych badań było opracowanie nowych narzędzi molekularnych do badania interakcji z snurportyną, białkiem zaangażowanym w transport RNA do jądra komórkowego. Autor w swojej pracy opisuje metody syntezy tych związków, analizuje ich właściwości fizykochemiczne i spektralne, a także bada ich oddziaływanie ze snurportyną zarówno *in vitro* jak również w komórkach. W mojej ocenie praca ma duże znaczenie praktyczne związane z wykazaniem istotnego potencjału tych sond fluorescencyjnych do monitorowania procesów komórkowych, w których bierze udział snurportyna.

Praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dra hab. Jacka Jemielitego w Centrum Nowych Technologii oraz Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Jednostka badawcza, w której przygotowana została rozprawa, jest renomowanym ośrodkiem, w którym od wielu lat prowadzone są badania na absolutnie światowym poziomie (gratuluje zespołowi Pana Profesora publikacji w Nature z 16 kwietnia 2025r.). W przedstawionej pracy doktorskiej znakomicie widać wykorzystanie przez Autora potencjału badawczego jednostki macierzystej i oferowanych przez nią zasobów związanych z zapleczem aparaturowym i doświadczeniem kadry.

Doktorant zdobywał doświadczenie nie tylko w ramach prac badawczych w grupie Profesora Jemielitego, ale również w trakcie praktyk i pracy w firmach: Adamed Pharma, Mabion SA, Narodowym Instytucie Onkologii czy Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN oraz Polytechnic Institute of Bragança w Portugalii. Rezultaty prowadzonych przez Doktoranta badań ukazały się w dwu publikacjach naukowych, stanowiących podstawowy wkład do recenzowanej rozprawy doktorskiej, a także w jednej oryginalnej pracy badawczej nie związanej bezpośrednio z pracą dokorską (kolejna publikacja jest w recenzji). Artykuły te opublikowane zostały w dobrych, międzynarodowych



czasopismach o wskaźnikach wpływu odpowiednio: *Organic and Biomolecular Chemistry* - IF: 2,9; *Journal of Organic Chemistry* - IF: 3,2 i *Frontiers in Oncology, Section: Breast Cancer* - IF: 4,0. W jednej z nich Doktorant jest pierwszym autorem.

Rozprawa została zredagowana w języku polskim na 229 stronach i podzielona jest na pięć zasadniczych części. Część wstępna, gdzie zarysowany jest kształt rozprawy, zamieszczony jest abstrakt w języku angielskim (brak wyodrębnionego streszczenia w języku polskim, choć jego rolę pełni część zatytułowana jako *1. Wstęp*) oraz wymienione są szczegółowo i precyzyjnie cele jakie postawił sobie Autor przed podjęciem badań w ramach doktoratu. Część druga to przegląd literatury opisujący stan badań w obszarze zainteresowań Doktoranta dotyczących kompleksów białko-ligand i sond molekularnych w tym m.in. omówienie biosyntezy i roli w komórkach trimetylokapu czy szlaki jego degradacji oraz enzymy dekapujące; znajduje się tu też analiza funkcji snurportyny oraz jej oddziaływań z TMG kapem czy innymi białkami oraz genami. Autor opisuje w tej części nie tylko czysto biologiczne, ale przede wszystkim, bardzo istotne, kliniczne znaczenie snurportyny. Tę część pracy kończy opis fluorescencyjnych rotorów molekularnych, ich właściwości oraz możliwości szerokiego zastosowania tych związków w badaniach: od czysto biofizycznych, przez biologię komórki aż do modeli zwierzęcych. Kolejna część to badania własne Autora, która to część podzielona jest na dwanaście podrozdziałów, a te na kolejnych kilkadziesiąt szczegółowych podpunktów. Czwarty fragment pracy Autor zatytułował Część eksperymentalna (ponad 70 stron) i są to w zasadzie *Materiały i metody*, gdzie poza omówieniem parametrów stosowanych technik badawczych takich jak np. spektrometria mas, techniki chromatograficzne czy NMR na ponad 60 stronach znalazły się opisy syntez chemicznych (moim zdaniem w doktoracie z nauk fizycznych, można byłoby umieścić je w Aneksie). Metodyce badań fizykochemicznych, biofizycznych i spektroskopowych Autor poświęcił kilka ostatnich stron. Ostatnia część pracy to Podsumowanie gdzie w sposób bardzo zwarty i syntetyczny Doktorant omawia stopień realizacji celów projektu doktorskiego, znajdują się tu wypunktowane najważniejsze wyniki i wynikające z nich wnioski. Zasadniczą część rozprawy poprzedza spis treści (w mojej opinii nadmiernie szczegółowy) oraz bardzo dobrze przygotowany wykaz skrótów i akronimów. Pracę zamyka obszerna, bo złożona z ok. 280 pozycji *Bibliografia*. Jest tu jedynie niewielka liczba prac sprzed roku 2000, a spośród nich część to klasyczne prace historyczne np. poz. 234 z 1868 r. czy poz. 263 z 1967 r. Większość cytowanej literatury to prace współczesne, prezentujące aktualny stan wiedzy naukowej (ok. 15% to prace nie starsze niż 5 lat!). W zasadzie wszystkie cytacje są to odniesienia do literatury fachowej, w większości do artykułów naukowych z uznanych i liczących się czasopism. Wykorzystanie cytowanego piśmiennictwa świadczy o umiejętności korzystania z literatury naukowej i dobrej orientacji w tematyce prowadzonych badań.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej zabrakło mi wyodrębnionej dyskusji uzyskanych w pracy wyników, w obecnym kształcie praca prezentuje krok po kroku kolejne etapy prac badawczych, przedstawia analizę wyników uzyskanych na danym etapie i motywację do podjęcia



kolejnych badań. W ten sposób dobrze śledzi się prowadzone przez Autora badania i obserwuje jak realizowane są kolejne cele pracy, ale trudno jest dostrzec szerszy kontekst przeprowadzonych badań i ich znaczenie. Ważnym elementem rozprawy są zazwyczaj również perspektywy kontynuacji badań, czy analiza możliwości wykorzystania wyników pracy doktorskiej w przyszłości. W odniesieniu do niniejszej pracy, także w tym względzie odczuwam niedosyt. Kolejną trudnością w ocenie naukowej sylwetki Doktoranta jest brak zestawienia dotychczasowej aktywności Autora, w tym udział w projektach badawczych (informacja o finansowaniu badań z projektu Sonata jest ukryta małym druczkiem na stronie 3), konferencjach, warsztatach, wymianach, szkoleniach czy działaniach popularyzatorskich lub dydaktycznych. Podczas obrony prosiłbym o przedstawienie zarówno perspektyw kontynuacji badań jak i naukowego CV Autora.

Wstęp literaturowy stanowi wprowadzenie do tematu i jednocześnie jasno definiuje motywację Autora. Doktorant w sposób klarowny, dosyć zwięzły, dobrze zilustrowany graficznie omawia najważniejsze zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej. Ta część pracy daje czytelnikowi dobry wgląd w metodykę prac badawczych realizowanych przez Autora i stanowi znakomitą podstawę dla dalszych rozważań naukowych przedstawionych w rozprawie. W trakcie omawiania poszczególnych zagadnień Autor nie tylko precyzyjnie je opisuje, odnosząc się do istniejących doniesień naukowych, ale też trafnie akcentuje ważne aspekty, które są istotne w kontekście badań prezentowanych w dalszej części pracy. Ta część rozprawy świadczy o dużej wiedzy Autora, a także o tym, że ma on świadomość rozległości poruszanych problemów.

Wyniki zaprezentowane w części dotyczącej badań własnych tworzą zwartą całość układającą się w logiczną i oryginalną historię pokazującą prace nad syntezą licznej biblioteki związków (19 TMG kapów, 42 koniugatów TMG kapu z FMR, 22 koniugatów z FMR bez TMG kapu) i dalszą ich analizą pod względem właściwości i możliwości wykorzystania w innych badaniach czy zastosowaniach np. medycznych. Jestem pod dużym wrażeniem jakości tych badań i uzyskanych wyników, które zostały opisane w pracy. Są to bardzo rzetelnie prowadzone, a zarazem żmudne badania, w których wybór metodologii, zastosowane techniki syntezy, procedury i sposób analizy a także prezentacji danych oraz dyskusja wyników i wnioskowanie są na wysokim poziomie. To co cieszy mnie jako naukowca, sprawiło trudność recenzentowi. W dobrej pracy trudno znaleźć niedoskonałości. Na większość pytań, które nasuwały mi się podczas czytania rozprawy znalazłem odpowiedzi w treści artykułów oryginalnych i dołączonych do nich danych uzupełniających (*Supplementary information*). Spośród tych, które pozostały chciałbym poprosić o odpowiedź lub komentarz na poniższe:

1. Jak wyznaczono wielkość objętości konfokalnej, która jest niezbędna do kalibracji w pomiarach FCS? Czy Autor jest w stanie oszacować jak duży wpływ na wartości wyznaczonych współczynników dyfuzji ma niepewność określenia wielkości ogniska konfokalnego?
2. W pracy przedstawione są obrazy czasów życia fluorescencji FLIM dla wybranych koniugatów (strona 131). Czy prowadzone były szerzej zakrojone badania w tym zakresie, a może są one



zaplanowane? Czy była prowadzona szczegółowa analiza histogramów czasów życia fluorescencji tych obrazów? Jeśli tak, jakie są wyniki tych analiz.

3. W obrazowaniu FLIM wykorzystano światło laserowe o długości fali 485 nm. Czym był podyktowany dobór takiej długości fali światła wzbudzającego?
4. Proszę o zaprezentowanie krzywych FCS i krótkie opisanie jak współczynniki dyfuzji zmierzono, a jak obliczono dla przykładowych związków w komórkach HeLa. Dlaczego w tych pomiarach ważne jest uwzględnienie obecności stanów trypletowych?
5. W niniejszej pracy doktorskiej jednym z głównych bohaterów są fluorescencyjne rotory molekularne (FMR) i proces TICT (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*). W cząsteczkowych układach donor-akceptor możemy mieć do czynienia z również z rezonansowym transferem energii Förstera (FRET), czy dexterowskim transferem energii (DET - *Dexter Energy Transfer*). Czym różnią się te procesy, jakie są warunki do ich zaistnienia? Jakże muszą być spełnione warunki aby układ mógł działać jako FMR?
6. Istotna część badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej, jak również publikacje naukowe Autora, w mojej ocenie, nie pozostawiają wątpliwości, że można przyznać mu stopień naukowy doktora nauk fizycznych. Jednak w związku z tym, że wg recenzenta, praca doktorska została zdominowana przez wątki związane m.in. z syntezami chemicznymi chciałbym aby podczas obrony Doktorant wydobyl aspekty i zagadnienia, które jednoznacznie pokazują przynależność tej pracy do dyscypliny: nauki fizyczne.
7. Charakteryzując FMR Autor wskazuje, że charakteryzują się one długimi czasami życia fluorescencji. Jak długie są to czasy, jak bardzo różnią się one pomiędzy badanymi FMR? W pracy szczegółowo przeanalizowano położenia pasm absorpcji, emisji i wzbudzenia oraz zmiany intensywności fluorescencji? Czy zdaniem Autora czasy życia fluorescencji FMR mogłyby być dodatkowym parametrem służącym do analizy oddziaływań białko-ligand?
8. Na czym polegała normalizacja intensywności fluorescencji, którą zastosowano w odniesieniu do wszystkich punktów zamieszczonych np. na wykresach na stronie 79, 81 czy 84?

Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom edytorski rozprawy. Praca jest estetyczna, wszystkie grafiki, rysunki, ryciny i schematy są staranne, informatywne i opracowane z dbałością o jakość odbioru. Zamieszczone grafiki znacznie pomagają czytelnikowi w zrozumieniu prezentowanych zagadnień. Bardzo dobre są tabele podsumowujące częściowe wyniki (np. Tab. 9 czy Tab. 14). Praca napisana jest dobrym i precyzyjnym językiem, którym Autor sprawnie opisuje skomplikowane zagadnienia. Do pracy mam jedynie kilka uwag edytorskich:

1. Autor korzystał z narzędzia do automatycznego dzielenia wyrazów, które nie zawsze zadziałało zgodnie z oczekiwaniami (np. w spisie treści, w III.7.4; na stronie 69: „intensyw-ności”; na stronie 13: „rozmiara-rach”).
2. Streszczenie w języku angielskim (strona 14) powinno być zatytułowane „Abstract”, a nie „Abstrakt”.
3. Nie jest dla mnie jasny podział pracy i towarzysząca jej numeracja częściowo arabska, częściowo rzymska (1, 2, 3 a dalej I, II, III, IV, V).
4. W pracy gdzie wielokrotnie w oznaczeniach związków chemicznych używa się liczb w indeksie górnym (np. m^7G kapu) wybór stylu odnośników do literatury również jako indeksów górnych nie jest wygodny dla czytelnika.



5. Na rysunkach z widmami (np. II.30, II.31, II. 32) zaznaczono linie przerywane oraz zamieszczono strzałki. Nie opisano jednak w tekście ich znaczenia. W mojej opinii oznaczenia te, bez odpowiedniego opisu nie spełniają roli zgodnej z intencją Autora.
6. Od strony 77 numery odnośników do rysunków a numery właściwych rysunków nie zgadzają się. Z kolejnymi stronami te rozbieżności zwiększają się (np. na stronie 131 w podpisie powinien być nr II.103 a jest II.94).
7. Również kilka pomyłek w odniesieniach do tabel, np. na stronie 135 na dole błędny nr tabeli 19.
8. Drobne literówki, np. szerokość szczeliny emisji/wzbudzenia jest „nM”, a powinno być „nm” (strona 200), czy oznaczenie P_a we wzorze, a P_{akt} w opisie (strona 201).
9. Słowo „ilość” w odniesieniu do „metod” na stronie 125 zamieniłbym na „liczba”.
10. W tekście nie znalazłem odniesień do tabel A1 i A2 oraz rysunku A1, które są na końcu pracy. Stanowią one coś w rodzaju Aneksu, ale nie wystąpił on ani w spisie treści ani odwołania do niego nie pojawiają się w rozprawie zasadniczej.
11. Nie wszędzie oznaczono, że wykresy pochodzą z opublikowanych artykułów (np. obrazy FLIM na stronie 131 to Fig.7 w publikacji Org. Biomol. Chem., 2024,22, 6763-6790).
12. W bibliografii nie ma jednorodnego stylu (tytuł/bez tytułu: 107 i 127; czasopismo kursywą i/lub kapitalikiem) oraz sporo błędów:
 - a. kilka pozycji ma ten sam nr (215, 264) a kilku brakuje (nie ma np. poz. 69, 167);
 - b. w kilku przypadkach dane bibliograficzne są szcążkowe (np. poz. 163, 178, 234, 235).
13. Pojawiają się wyrażenia żargonowe: „dockowanie” czy „protokół dockowania”, wzbudzenie „długością fali” (winno być „światłem o długości fali”).
14. Nie tylko Michał Rusinek się deklinuje, a czasem po skrócie dr i mgr należy postawić kropkę 😊

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, iż Pan magister Piotr Surynt przedstawił wartościową rozprawę doktorską, opartą na wynikach precyzyjnie zaplanowanych i przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Prace te wymagały wszechstronnej znajomości różnych technik badawczych oraz warsztatu chemicznego. Rozprawa doktorska opiera się na oryginalnych wynikach i analizach, które zostały opublikowane w renomowanych, międzynarodowych czasopismach specjalistycznych co jednoznacznie świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Dodatkowo liczba wykonanych eksperymentów, zsyntetyzowanych i przeanalizowanych związków, a także rozległy zakres poruszanych zagadnień świadczy o dużym zaangażowaniu i pracowitości Autora.

W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Niniejszym składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgra Piotra Surynta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne, w tym do publicznej obrony.

Gratuluje Doktorantowi oraz Panu Promotorowi uzyskania tak wartościowych wyników. Jest to szczególne osiągnięcie, które podkreśla wysoką jakość pracy badawczej ich laboratorium oraz wytrwałości w dążeniu do celu Doktoranta.



Elektronicznie podpisany przez:

Wojciech Henryk Grudziński

Data:
2025-4-25 13:47:54