



UNIwersYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

prof. dr hab. Adam Huczyński
Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Poznań, 22 kwietnia 2025 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. " Synteza i właściwości analogów trimetylokapu znakowanych fluorescencyjnymi
molekularnymi rotorami"
autorstwa mgr Piotra Surynta

Oceny rozprawy doktorskiej pt. *"Synteza i właściwości analogów trimetylokapu znakowanych fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami"* dokonuję w związku z powołaniem mnie na funkcję recenzenta przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Fizyczne UW na posiedzeniu w dniu 17.02.2025 roku.

Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska powstała pod opieką promotora - prof. dr hab. Jacka Jemielitego w Centrum Nowych Technologii oraz Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Rozprawa ma charakter klasycznej i niezwykle obszernej dysertacji napisanej na aż 229 stronach. To naprawdę staranne dzieło naukowe, pełne wyczerpujących danych, opisów eksperymentalnych wielu pomiarów biofizycznych i biochemicznych, a także kilkudziesięciu syntez. To praca wybitnie interdyscyplinarna z wieloma celami naukowymi i złożoną metodologią, dobraną tak, by eksperymentalnie potwierdzić kilka hipotez badawczych Autora.

Jako cele naukowe Doktorant obrał: otrzymanie i zbadanie właściwości odpowiednio zaprojektowanych koniugatów dinukleotydowych analogów TMG kapu oraz TMG kapowanych oligomerów RNA, które, poprzez oznaczenie ich fluorescencyjnymi

molekularnymi rotorami (FMR), mogłyby służyć jako narzędzia do badania snurportyny, zarówno w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*), jak i żywych komórkach między innymi do oceny wybranych procesów życiowych.

Badania własne opisane w doktoracie poprzedza wyczerpujący, moim zdaniem dość długi, wstęp teoretyczny, w którym Doktorant starał się przedstawić kontekst badań własnych w świetle doniesień literaturowych i scharakteryzować obiekty swoich badań, tj. strukturę i znaczenie biologiczne kapu TMG, funkcję i rolę biologiczną białka adaptorowego – snurportyny, jego interakcje z TMG kapem oraz zastosowanie FMR do badań procesów biofizycznych i biochemicznych zachodzących w komórkach. Ta część, mimo swojego skomplikowania (bo nie są to łatwe zagadnienia), a także poprzez obszar wiedzy, który nie należy do zagadnień powszechnie znanych, jest napisana w sposób niezwykle przystępny, ułatwiając recenzentowi wglębiecie się w opisywane zagadnienia. Łatwość, z którą przychodzi Doktorantowi opisywać te skomplikowane struktury, oddziaływania i procesy biochemiczne potwierdza jego rozległą wysoce specjalistyczną i interdyscyplinarną wiedzę.

Mój podziw wzmacnia również fakt, iż dyscyplina, którą opisuje, jest niezwykle nowa i dynamicznie rozwijająca się, a przełomowe publikacje i doniesienia pojawiają się regularnie w ostatnich latach. To wszystko nie przeszkadzało jednak Doktorantowi na śledzenie najnowszych doniesień naukowych i opisać stan wiedzy nie sprzed kilku lat, ale właściwie na bieżąco. Wiem, że nie jest łatwo być na bieżąco z literaturą naukową, gdy prowadzi się tak zaawansowane i długotrwałe badania eksperymentalne, ale mgr Piotrowi Suryntowi to się niewątpliwie udało.

Przechodząc do oceny badań własnych, zacznę od syntezy organicznej (rozdział III), gdyż jest ona najbliższa mojemu sercu i w chemii medycznej najważniejsza, bo bez obiektów badań – nowych i dobrze zaprojektowanych molekuł, nie ma możliwości prowadzenia ciekawych badań biofizycznych lub biochemicznych.

Swoje badania chemiczne Doktorant rozpoczął od syntezy obszernej serii dinukleotydowych analogów TMG kapu zawierających linker z grupą azydową lub propargilową do dalszych modyfikacji. Zaprojektowane związki cechowały się zróżnicowaną budową.

Otrzymane regioizomery 2' i 3' przypadku uretanów propargilowych i 2-azydoetylowych różnorodnych nukleozydów nie były rozdzielane chromatograficznie, co moim zdaniem znacznie skomplikowało w kilku przypadkach reakcje następce i nie pozwoliło scharakteryzować spektralnie izomerów. **Dlaczego pominięto ten etap?**

Mając na uwadze późniejsze obserwacje Doktoranta, iż regioizomery z niektórymi FMR wykazują bardzo różne właściwości podczas oddziaływania ze snurportyną, separacja na tym etapie zapewniłaby czystość w kolejnych krokach i pozwoliła uniknąć bezsensownego w mojej opinii koniugowania z FMR przeprowadzanego na mieszaninie izomerów. Mieszanie się nie bada.

Obiektywną trudnością były dla eksperymentatora niewielkie ilości otrzymywanych dinukleotydowych i tetranukleotydowych modyfikowanych pochodnych TMG, które otrzymywano nieraz zaledwie w ilości kilku miligramów. Operacje na tak małych ilościach związków zawsze są trudne. Za niewątpliwy sukces uznaję, iż podczas syntezy dinukleotydowych pochodnych TMG lub MMG kapu zawierających linker z grupą azydową lub propargilową udało się w większości przypadków rozdzielić regioizomery, chociaż różnice w czasach retencji były bardzo małe. Charakterystyka spektroskopowa tych układów pominęła jednak spektroskopię ^{13}C NMR - **dlaczego?**

W lekką konsternację wprowadził mnie natomiast opis syntezy pochodnych azydowych i propargilowych FMR – dlaczego jest on obecny w doktoracie, skoro dr inż. Błażej Wojtczak był całkowicie odpowiedzialny za syntezę tych związków? Oczywiście

związki te nie mogły pojawić się w doktoracie jak *Deus ex machina*, jednak moim zdaniem opis syntez był zbędny.

Znakowanie fluorescencyjne Doktorant przeprowadził, stosując reakcję cykloaddycji azydku do alkinu katalizowaną jonami miedzi(I), jedną z reakcji klik, za którą w 2022 roku Morten P. Meldal i K. Barry Sharpless otrzymali Nagrodę Nobla z chemii. Kluczem do efektywnego wykorzystania tego procesu jest znalezienie warunków, w których rozpuszczone będą substraty i sól miedzi, co nie zawsze jest proste. Przeprowadzona koniugacja z barwnikami pozwoliła uzyskać związki w ilościach często mniejszych od 1 mg, co przełożyło się na bardzo ubogą lub nawet znikomą charakterystykę spektroskopową obejmującą tylko HRMS (ESI(-)). **Nie mogę natomiast zrozumieć, dlaczego, pomimo znacznych ilości produktów z grupy C-fosfonianowych pochodnych FMR, pominięto etap analizy NMR?**

Dysponując znaczną biblioteką pochodnych (42 koniugatów TMG kapu z różnymi FMR (5 typów fluoroforów), 22 nukleotydowych koniugatów z FMR niezawierających TMG kapu, Doktorant określił ich właściwości spektralne: absorpcję promieniowania UV/Vis, widma fluorescencyjne (λ_{exc} , λ_{em}). Zadanie to było mozolne i niewdzięczne, bo charakter widmowy koniugatów zależał silnie od środowiska (polarności rozpuszczalnika – badano mieszaniny DMSO-H₂O, pH, itd.). Wymagało to standaryzowania metod, co przy tak różnorodnej grupie pochodnych nie jest pracą łatwą. Niepokojącym w mojej opinii zjawiskiem, które wyniknęło z badań Doktoranta jest pH-zależność użytych fluoroforów oraz obserwowane silne wygaszanie fluorescencji w wodzie dla fluoroforów takich jak DMHBI, *o*-HBI oraz *p*-NHBI. Nie wiem, czy bardziej uzasadnioną metodologią badań Doktoranta nie powinno być ograniczenie liczby stosowanych barwników po badaniach ich prostych analogów, a nie dopiero po ich trudnej koniugacji z dinukleotydowymi i tetranukleotydowymi analogami TMG kapu. Oszczędziłoby to wiele pracy. **Proszę o komentarz podczas obrony.**

2) B. A. Wojtczak, M. Bednarczyk, P. J. Sikorski, A. Wojtczak, P. Surynt, J. Kowalska and J. Jemielity, Synthesis and Evaluation of Diguanosine Cap Analogs Modified at the C8-Position by Suzuki-Miyaura Cross-Coupling: Discovery of 7-Methylguanosine-Based Molecular Rotors, (2023), *J. Org. Chem.*, 88, 11, 6827-6846

Cele naukowe i pytania, które postawił przed sobą Doktorant były ambitne i nowatorskie. Praca doktorska zawiera oryginalne i spójne wyniki naukowe uzyskane w ramach dobrze przemyślanego projektu badawczego. Mgr Piotr Surynt wykonał ogrom dobrej pracy syntetycznej i szereg cennych badań biofizycznych, rzucając nowe światło w miejscach, w których panował naukowy mrok. Rozprawa zawiera szereg starannie wykonanych rysunków, schematów i tabel, które ułatwiają czytelnikowi poruszanie się w tak bogatym wstępie teoretycznym oraz opisie badań własnych.

Oceniając pozytywnie wykonaną pracę badawczą stwierdzam jednoznacznie, że będąca przedmiotem niniejszej recenzji rozprawa doktorska mgra Piotra Surynta spełnia wszystkie wymogi formalne i zwyczajowe oraz warunki określone w art.187 ust. 1-2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jedn. Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Piotra Surynta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Chemii Medycznej
Huczyński
prof. dr hab. Adam Huczyński