

dr hab. Damian Płażuk, prof. UŁ
Pracownia Spektroskopii Molekularnej
Wydział Chemii
Uniwersytet Łódzki
ul. Tamka 12
91-403 Łódź
[e-mail: damian.plazuk@chemia.uni.lodz.pl](mailto:damian.plazuk@chemia.uni.lodz.pl)

Łódź, dn. 14.04.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. Piotra Surynta

zatytułowanej

"Synteza i właściwości analogów trimetylokapu znakowanych fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami"

złożonej do

Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Piotra Surynta została zrealizowana w zespole prof. Jacka Jemielitego, pod jego opieką promotorską, w Centrum Nowych Technologii oraz Zakładzie Biofizyki Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (grant Sonata, nr UMO-2017/26/D/ST5/00901). Tematyka pracy obejmuje syntezę oraz zbadanie właściwości biofizycznych koniugatów dinukleotydowych analogów trimetyloguanozyno (TMG) kapu oraz TMG kapowanych oligomerów RNA znakowanych Fluorescencyjnymi Molekularnymi Rotorami (FMR) jako specyficznych narzędzi molekularnych do badania snurportyny, w warunkach in vitro oraz w komórkach.

Problem badawczy został prawidłowo zdefiniowany i obejmuje on opracowanie strategii syntezy koniugatów, zbadanie ich powinowactwa do snurportyny, analizę zmian fluorescencji, ocenę odporności na degradację enzymatyczną oraz ocenę możliwości zastosowania otrzymanych sond w obrazowaniu i badaniach komórkowych. Koncepcja połączenia analogów TMG kapu z FMR jest nowatorska i oryginalna. Tak zaprojektowane hybrydowe sondy molekularne mogą być bezpośrednio wykorzystane do monitorowania procesów komórkowych związanych ze snurportyną.

Tematyka pracy mieści się na pograniczu chemii bioorganicznej, biofizyki i biologii chemicznej, stanowiąc nowatorskie połączenie syntezy chemicznej analogów nukleotydów z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych do badania procesu transportu jądrowego. Znaczenie tej pracy jest istotne zarówno z perspektywy poznawczej jak i potencjalnie aplikacyjnej. Należy podkreślić, że stopień trudności podjętego tematu jest wysoki – obejmuje on syntezę kilkudziesięciu złożonych związków nukleotydowych oraz ich wieloaspektową analizę biofizyczną i biologiczną.

Doktorant jest współautorem trzech opublikowanych prac naukowych oraz jednej znajdującej się obecnie w recenzji. Artykuły opublikowane w *Organic & Biomolecular Chemistry* (2024) oraz w *Journal of Organic Chemistry* (2023) stanowią zasadniczą część rozprawy doktorskiej. Obie prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, o ugruntowanej pozycji w dziedzinie chemii organicznej i bioorganicznej, co potwierdza oryginalność oraz wysoką jakość uzyskanych wyników. Poza publikacjami bezpośrednio związanymi z tematem rozprawy, Doktorant brał również udział w innych projektach, czego efektem jest współautorstwo pracy opublikowanej w *Frontiers in Oncology, Section: Breast Cancer* (2024) oraz współautorstwo w kolejnym manuskrypcie aktualnie będącym w recenzji.

Mgr Piotr Surynt prezentował wyniki swoich badań na forum naukowym. Wygłosił komunikat ustny pt. „Synteza i właściwości biologiczne analogów m^3G kapu znakowanych fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami” na I Ogólnopolskiej Konferencji Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, lecz informację tę znalazłem w książce abstraktów (https://smptchem.pl/wp-content/uploads/2021/06/Book_of_Abstracts_IOKO20-1.pdf) nie zaś w przedstawionej rozprawie.

Rozprawa doktorska mgr. Piotra Surynta ma charakter klasyczny. Praca liczy 230 stron i zawiera wszystkie kluczowe elementy, takie jak część teoretyczna, opis wyników z ich dyskusją, część eksperymentalną oraz podsumowanie. W pracy znajduje się bogaty materiał ilustracyjny – obejmujący schematy syntez, wykresy oraz zdjęcia mikroskopowe – a także obszerną bibliografię, obejmującą 284 pozycje. Struktura rozprawy jest logiczna, a proporcje między poszczególnymi rozdziałami właściwie zachowane.

Ważnym elementem rozprawy doktorskiej jest precyzyjne sformułowanie celu pracy. Autor precyzyjnie określił zarówno cel ogólny, jak i cele szczegółowe projektu, a droga do ich realizacji została starannie zaplanowana i konsekwentnie zrealizowana.

W pierwszej części swojej rozprawy mgr Piotr Surynt przedstawił przegląd literatury dotyczący kapu oraz nukleotydowych analogów kapu, ich biologicznych funkcji, ze szczególnym uwzględnieniem struktury i roli kapu m^7G i TMG kapu oraz zastosowania syntetycznych analogów kapu. Omówiono także białko snurportynę – jej właściwości, funkcje oraz znaczenie biologiczne i potencjalne znaczenie kliniczne. W tym rozdziale Autor przedstawił również zasadę działania fluorescencyjnych rotorów molekularnych, ich syntezę oraz zastosowania jako sond molekularnych, w tym w obrazowaniu komórkowym. Część ta, obejmująca około 30 stron stanowi solidne podstawy niezbędne do zrozumienia dalszych rozdziałów rozprawy.

Najobszerniejszą część rozprawy stanowi część doświadczalna wraz z dyskusją wyników, obejmująca 88 stron. Została ona podzielona na rozdziały odpowiadające kolejnym etapom badań, co zapewnia przejrzystą strukturę. Zastosowana metodologia jest poprawna i umożliwia uzyskanie wiarygodnych oraz powtarzalnych wyników. Syntezę substratów i związków docelowych opisano szczegółowo. Bez zastrzeżeń pozostaje również opis przeprowadzonych badań biologicznych oraz dokowania molekularnego. Doktorant precyzyjnie przedstawił zastosowane strategie chemiczne, użyte odczynniki oraz warunki reakcji. Kluczowym etapem było wprowadzenie do struktury analogów kapu funkcjonalnego linkera (z grupą azydową lub alkinową), umożliwiające przyłączenie znaczników fluorescencyjnych FMR. Zrealizowano to poprzez modyfikacje w pozycji N1, 2'-O i 3'-O- odpowiednimi linkerami z wybranymi grupami funkcyjnymi. W kolejnym etapie Doktorant wykorzystał różnorodne pod względem chemicznym (fenole, alkohole, aminy, zw. nitrowe) FMR będące analogami chromoforu GFP oraz FMR nienależący do tej klasy będący pochodną julolidyny. Wybrane chromofory FMR poddano reakcji sprzęgania z analogami kapu, wykorzystując reakcję typu „click” (cykloadycja azydowo–alkinowa katalizowana miedzią(I)). Otrzymano szereg koniugatów różniących się zarówno miejscem przyłączenia, jak i typem zastosowanego FMR. Większość z tych związków została szczegółowo scharakteryzowana metodami spektroskopowymi, w tym metodami spektroskopii NMR oraz wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRMS), natomiast czystość związków oceniano metodami HPLC. Autor zbadał także właściwości fotofizyczne otrzymanych sond – zmierzył ich widma absorpcji i emisji w roztworach modelowych oraz oceniał czułość na zmiany środowiskowe, m.in. poprzez pomiary fluorescencji w roztworach o różnym pH, mieszaninach o różnej lepkości (np. woda:glicerol) oraz w rozpuszczalnikach o zróżnicowanej polarności

W kolejnym etapie badań mgr Piotr Surynt zbadał powinowactwo otrzymanych związków do snurportyny oraz meIF4E metodą miareczkowania z wygaszaniem fluorescencji tryptofanów (FQT) synchronizowanym w czasie przy założonych kryteriach akceptacji wyników. Badania te pozwoliły ustalić, które modyfikacje FMR są dobrze tolerowane przez snurportynę, które z nich stabilizują a które destabilizują kompleks z białkiem. Wykazał, że modyfikacja w pozycji C8 lub N1 guanozyny obniża powinowactwo do białka, natomiast modyfikacja w pozycji 2'-O rybozy prowadzi do związków o zróżnicowanym wpływie na powinowactwo, w tym również silnie stabilizujących. Następnie mgr Piotr Surynt zbadał koniugaty FMR z monofosforanem guanozyny niezawierające TMG kapu. Badania te wykazały, że 2'-O-podstawione analogi fluoroforu GFP monofosforanu guanozynyny (GMP) wykazały do 10-krotnie silniejsze powinowactwo od TMGpppG do białka (sam GMP nie wiąże się z białkiem). Dodatkowo Doktorant zsyntezował analogi podwójnie podstawione FMR zawierające FMR jednocześnie

w pozycjach 2'-O- i 3'-O. Zbadał także zależność struktura – aktywność otrzymanych analogów TMGpppG z różnymi FMR z grupami hydroksylowymi, fenolowymi, aminowymi i nitrowymi w pozycji 2'-O- i 3'-O-guanozyny co pozwoliło na ustalenie czynników mających wpływ na powinowactwo do snurportyny. Dodatkowo zbadał oddziaływania otrzymanych koniugatów TMGpppG z białkiem metodami obliczeniowymi, które zostały wykonane we współpracy z dr hab. Joanną Panecką-Hofman. Badania stabilności otrzymanych koniugatów wykazały, że koniugaty z DMHBI i 2'-HEMABI są stabilne w roztworze wodnym nawet przez 3 lata w temp. -80°C. Ponadto, Doktorant zbadał odporność otrzymanych przez siebie związków na degradację enzymatyczną, i wykazał, że niektóre z modyfikacji prowadzą do związków odpornych na degradację enzymatyczną.

Do kolejnego etapu badań Doktorant wybrał koniugaty analogu TMGpppG z DMHBI i HEMABI, **1a-2'** i **1c-2'** charakteryzujące się najwyższym powinowactwem do snurportyny oraz koniugat z pochodną julolidyny w pozycji 3'-O (**1f-3'**) charakteryzującą się największą zmianą fluorescencji po związaniu z białkiem. Badania w komórkach HeLa wykonano we współpracy dr inż. Kariną Kwapiszewską, dr Tomaszem Kalwarczykiem oraz prof. dr. hab. Robertem Hołystem (zespół Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk). Badania czasów życia fluorescencji (FLIM) wykazały, że związek **1c-2'** wykazuje wydłużenie czasów życia, co sugeruje jego wiązanie z białkiem.

Kolejnym obszernym rozdziałem jest Część eksperymentalna, liczący 75 stron, w której Doktorant bardzo szczegółowo opisuje stosowaną metodologię, techniki laboratoryjne stosowane zarówno do syntezy jak i do badań właściwości fluorescencyjnych otrzymanych związków oraz ich właściwości biologicznych. Każda ze stosowanych technik jest szczegółowo opisana co zapewnia możliwość jej odtworzenia. Syntezę analogów kapu oparto na sprawdzonych procedurach opracowanych w zespole promotora – m.in. z użyciem odpowiednio chronionych nukleotydów, łączonych z drugim nukleotydem poprzez aktywowane fosforany imidazolidowe, co pozwala na uzyskanie wysokiej wydajności tworzenia wiązania trifosforanowego. Opisy syntez są precyzyjne i z pewnością umożliwiają powtórzenie reakcji.

Ostatni rozdział pracy zawiera podsumowanie oraz wnioski końcowe, w których Autor syntetycznie zestawia najważniejsze osiągnięcia i potencjalne kierunki dalszych badań

Podsumowując, Autor opracował metody syntezy i oczyszczania analogów kapu TMG zawierających różne fluorescencyjne molekularne rotory. Wykazał, że FMR przyłączone do struktury kapu zachowują swoje właściwości fotofizyczne i nie zaburzają rozpoznawania kapu przez snurportynę – przeciwnie, w niektórych przypadkach mogą wręcz zwiększać powinowactwo do białka. Przeprowadzone badania potwierdziły, że opracowane sondy mogą być wykorzystywane do detekcji snurportyny w komórkach przy

użyciu metod fluorescencyjnych. Ponadto, mgr Surynt wykazał, że opracowane koniugaty wykazują odporność na działanie enzymów degradujących kap, co dodatkowo zwiększa ich potencjał aplikacyjny.

Do najważniejszych osiągnięć mgr. Piotra Surynta należy zaliczyć:

- opracowanie nowej klasy sond molekularnych – analogów kapu TMG (2,2,7-trimetyloguanozynowego kapu) połączonych z fluorescencyjnymi rotorami molekularnymi (FMR);
- zsyntezowanie koniugatów TMG–FMR różniących się zarówno pozycją przyłączenia fluorescencyjnego molekularnego rotora (2', 3', N1), jak i jego typem (np. pochodne julolidyny, czy GFP-podobne);
- wykazanie, że sondy te umożliwiają detekcję wiązania snurportyny z kapem TMG poprzez rejestrowaną zmianę fluorescencji;
- odkrycie zwiększonego powinowactwa analogów TMG do snurportyny – koniugaty z fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami w pozycji 2'-O wykazywały nawet 100-krotnie wyższe powinowactwo niż naturalny ligand m^3GpppG , a najlepsze sondy charakteryzowały się bardzo niską stałą dysocjacji (K_D) w zakresie kilkunastu nanomoli;
- potwierdzenie, za pomocą dokowania molekularnego, że fluorescencyjne molekularne rotory mogą wchodzić w dodatkowe oddziaływania hydrofobowe ze snurportyną;
- wykazanie przydatności opracowanych sond do badań *in vivo* – w szczególności do obserwacji wiązania sondy TMG–FMR ze snurportyną w HeLa.

Drobne uchybienia edytorskie nie umniejszają ani wartości merytorycznej pracy, ani osiągnięć Doktoranta. Z obowiązku recenzenta wymieniam kilka z nich: A) na stronie 43, w zdaniu: „Zastosowanie octanu sodu, potasu lub jego bezwodnika...” niejasne jest użycie terminu „bezwodnik” – być może autor miał na myśli „bezwodny octan sodu lub potasu”; B) użycie spolszczonych form angielskich, takich jak „refluksowanie” (strona 43), jest niepoprawne stylistycznie; C) fragmenty ze stron 40 i 46 dotyczące fluorescencyjnych rotorów molekularnych są praktycznie tożsame; D) na Rys. II.24 widoczne są jedynie znormalizowane widma absorpcji, mimo że podpis sugeruje obecność również widm emisji; E) na stronie 81 znajduje się odwołanie do rys. II 41 a powinno być rys. II 42; F) na stronie 86 znajduje się odwołanie do rys. II 46 a powinno być rys. II 47; G) w części eksperymentalnej na stronie 140 ilość jodku metylu została najprawdopodobniej zaniżona – podano wartość w miligramach, choć prawdopodobnie chodziło

o gramy; H) pozycje literaturowe 112 i 113 odnoszą się do tej samej pracy, pod pozycją 215 znajdują się odniesienia do dwóch różnych prac (powtórzona pozycja 215).

Po lekturze rozprawy nasunęło się pytanie: w reakcji sprzęgania typu „click” zastosowano katalizator w postaci soli miedzi(I). Czy Doktorant badał lub szacował końcowe stężenia jonów miedzi w oczyszczonych produktach? Czy rozważano alternatywne strategie, takie jak reakcje cykloaddycji azyd – acetylen bez katalizatora Cu(I), np. z wykorzystaniem pochodnych cyklooktynu?

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska 1) prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej; 2) jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Uwzględniając wysoką wartość merytoryczną i poznawczą rozprawy, jej wkład w rozwój dyscypliny, jak również staranne opracowanie i prezentację wyników, stwierdzam, że praca doktorska mgr Piotra Surynta w pełni spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość naukową rozprawy, trafność zastosowanego podejścia badawczego oraz wpływ uzyskanych wyników na rozwój dyscypliny, wnoszę o wyróżnienie pracy.

Uzasadnienie: Na podkreślenie zasługuje nowatorski charakter rozprawy, interdyscyplinarność podejścia badawczego, a także imponujący zakres zrealizowanych eksperymentów, obejmujących zarówno zaawansowaną syntezę chemiczną, jak i kompleksowe badania biofizyczne i aktywności biologicznej. Opracowane przez Doktoranta sondy molekularne stanowią istotne osiągnięcie naukowe o dużym potencjale aplikacyjnym. Dodatkowym atutem są publikacje wyników w renomowanych czasopismach oraz umiejętność ich klarownej prezentacji. Wszystkie te elementy uzasadniają wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Piotra Surynta.

Damian Płażuk

