



Dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Seksja ds. pracowniczych

Wpłynęło dn. 23.02.16

podpis 

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marcina Ziemniaka „Nowe syntetyczne analogi
kapu mRNA i ich zastosowania w badaniach biochemicznych i strukturalnych nad
kompleksem enzymatycznym degradującym kap Dcp1/Dcp2 i innymi białkami
oddziałującymi z kapem”.**

Struktura kapu jest istotnym elementem eukariotycznych mRNA, cząsteczek kluczowych dla najbardziej podstawowego procesu życia – przepływu informacji od DNA do białka. Badania pochodnych kapu mogą dostarczyć nie tylko istotnych informacji o mechanizmie jego przetwarzania, ale także pozwolić na stworzenie narzędzi zarówno badawczych, jak i terapeutycznych. Stąd tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta jest istotna i ciekawa.

W skład przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej wchodzi wstęp teoretyczny, opis badań własnych, opis materiałów i metod oraz bibliografia. Struktura tekstu odbiega od tradycyjnego układu. Brak jest wyraźnie oddzielonej Dyskusji uzyskanych wyników (obecny jest jedynie krótki podrozdział 2.4.2.0 „Podsumowanie i komentarz uzyskanych wyników”). Wprowadzenie teoretyczne napisane jest z dużym rozmachem (zajmuje połowę objętości rozprawy) i pokrywa bardzo wiele tematów, od podstaw chemii kwasów nukleinowych przez syntetyczną chemię organiczną analogów kapu, podstawy metod fluorescencyjnych, enzymologii, po biologię kapu i zastosowania jego analogów. Z jednej strony doceniam wysiłek Doktoranta oraz rozmach z jakim podszedł do przygotowania Wstępu, z drugiej strony dla czytelnika lepiej byłoby, gdyby wstęp ograniczał się do zagadnień ściśle

związanych z pracami własnymi Doktoranta. Podrozdział 1.4.2 „Dynamika konformacyjna białek” oraz w szczególności rozważania o zwijaniu się białek nie są konieczne, a siłą rzeczy są też opisane pobieżnie. Jest to przykład części wstępu, która mogłaby bez uszczerbku dla jakości rozprawy być pominięta.

W badaniach własnych Doktoranta szacunek budzi niezwykle szeroki wachlarz zastosowanych metod. W ich zakres wchodzi synteza organiczna, charakterystyka biochemiczna (badania enzymatyczne, pomiary stałych wiązania dla oddziaływań ligandów z białkiem, transkrypcja *in vitro*), czy metody spektroskopowe (fluorescencja, NMR). Opis badań własnych rozpoczyna się od syntezy chemicznej analogów kapu (wprowadzenie teoretyczne do tej części jest bardzo dobrze opisane we wstępie). Ta część prac jest opisana starannie i wyczerpująco i uzupełniona bardzo profesjonalnie w części Metody wynikami analiz HPLC oraz spektroskopowych potwierdzających strukturę chemiczną uzyskanych związków. Dużo uwagi jest poświęcone określeniu konfiguracji absolutnej uzyskanych związków, co pozwoli kolejnym badaczom syntetyzującym te związki wyizolować właściwe stereoizomery. Kolejne etapy prac zawierały wyczerpującą charakterystykę biochemiczną uzyskanych analogów oraz ich badania, jako inhibitorów. Opisane są też badania spektroskopowe oraz badania funkcjonalne degradacji histonowego mRNA.

Jakość merytoryczną przeprowadzonych prac oceniam bardzo wysoko. Jest to dodatkowo potwierdzone przez fakt, że większość z zamieszczonych w pracy wyników jest już opublikowana, a co za tym idzie została zweryfikowana przez innych specjalistów w tej dziedzinie. Mgr Ziemiak jest pierwszym autorem trzech prac doświadczalnych opublikowanych w *RNA*, *Bioorg Med Chem.*, *RSC Adv.*) oraz pracy przeglądowej w *Future*

Med Chem. Jest to znakomity dorobek dla młodego badacza. Szczególną uwagę zwraca praca w bardzo dobrym czasopiśmie RNA, która zawiera opis analogów kap, jako inhibitorów kompleksu Dcp1/2.

W Wynikach Własnych zamieszczono opis wyników uzyskanych przez innych badaczy (2.3.1.4 Badania spektroskopowe UV-Vis; 2.3.2.1 Wiązanie do eIF4E, Inhibicja translacji, Wiązanie się do Dcp; 2.3.2.25 Translacja in vitro; 2.4.1.2.2 Kinetyka w warunkach jednego obrotu; 2.4.2.2 Wpływ elementów strukturalnych RNA na jego stabilność; 2.4.2.3 Translacja i stabilność histonowego mRNA; 2.4.2.4 Destabilizacja histonowego mRNA; 2.4.2.5 Potwierdzenie roli Dcp2 w degradacji egzogennej mRNA). Osobiście preferuję konwencję, w której doświadczenia wykonane przez innych badaczy są tylko wspomniane w Wynikach dla zachowania ciągłości wywodu, a sam wynik jest prezentowany w Dyskusji.

Podczas obrony prosiłbym Doktoranta o przedyskutowanie dwóch kwestii. Pierwsza dotyczy fluorescencyjnych pochodnych kapu (związki 18-22). Czy i w jakim stopniu znakowanie pozycji 2' i 3' pierścienia rybozy oraz fakt, że uzyskane związki stanowią mieszaninę tych dwóch form może ograniczać ich zastosowanie poza opisanymi w pracy badaniami DcpS? Czy istnieją białka, które tworzą oddziaływania z pozycjami 2' i 3' pierścienia rybozy i wprowadzona modyfikacja może te oddziaływania blokować? Druga kwestia dotyczy inhibitorowych właściwości związku 14b. Badania kinetyczne wskazują, że jest on mieszanym inhibitorem. Jaki może być molekularny mechanizm inhibicji zgodny z mieszanym charakterem? Czy fakt że związek 14b jest powoli hydrolizowany ogranicza jego zastosowania? Czy wartości 1400 μ M są na tyle niskie, że pozwalają na planowanie

praktycznych zastosowań? Jakie dalsze modyfikacje można by wprowadzić do związku 14b, aby zwiększyć jego siłę wiązania oraz ograniczyć hydrolizę?

Od strony edytorskiej praca została przygotowana poprawnie – szczególnie ryciny są przygotowane bardzo starannie. Kilka sformułowań zawartych w pracy jest nieprecyzyjnych. Na stronie 65 mowa jest o ewolucji konwergentnej, jako zachodzącej między niespokrewnionymi filogenetycznie organizmami. W tym jednak przypadku chodzi o konwergentną ewolucję mechanizmu działania dwóch niespokrewnionych białek. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć niedociągnięcia typograficzne (szczególnie w interpunkcji) oraz stylistyczne. Szczegółowa lista zostanie przekazana Doktorantowi.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania naukowe na wysokim poziomie i stanowi ważny wkład w zrozumienie przetwarzania mRNA. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Marcina Ziemiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, bardzo istotne pole badań oraz sukces publikacyjny, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Marcin Niesiński