

2017 -10- 09



Lublin, 29 września 2017 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Waszczuk pt. „Syntetyczne analogi trimetyloguanozyno kapu modyfikowane w mostku trifosforanowym jako narzędzia do badania snurportyny i optymalizacji sygnału transportu dojądrowego dla czynników terapeutycznych”

Jednym z ogromnie ważnych aspektów aktywności naukowej człowieka jest rozwój technik medycznych, otwierających nowe możliwości diagnozy oraz leczenia groźnych chorób. Badania biofizyczne prowadzone w ramach ocenianej pracy doktorskiej, przedstawionej przez mgr Małgorzatę Waszczuk, doskonale wpisują się w ten właśnie nurt działalności naukowo-poznawczej. Procedury, które do niedawna napotkać można było jedynie na stronach powieści science fiction, polegające na leczeniu na drodze wprowadzaniu do jądra komórkowego materiału genetycznego, naprawczego bądź brakującego w związku z chorobami genetycznymi, okazują się dziś możliwe, między innymi, dzięki badaniom z kategorii tych zaprezentowanych w rozprawie, w ramach której opracowano syntetyczne analogi trimetyloguanozyno kapu (TMG kapu), modyfikowane w mostku trifosforanowym. Konstrukty takie, poniekąd na zasadzie „konja trojańskiego”, umożliwiać mogą transport dojądrowy pożądanych związków terapeutycznych, zapewniając jednocześnie ich stabilność wobec litycznej aktywności enzymów z klasy nukleaz.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



W moim odczuciu, tematyka zaprezentowanej rozprawy doktorskiej jawie się więc nie tylko jako interesująca ale również bardzo ważna.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr. hab. Jacka Jemielitego, prof. UW, przy współudziale dr hab. Anny Niedźwieckiej, w charakterze promotora pomocniczego. Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Waszczuk zredagowana została w języku polskim, na 153 stronach maszynopisu, według standardowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Część merytoryczną rozprawy otwiera „Wstęp literaturowy”, prezentowany jako rozdział 1., zawierający dobrze zredagowane i bardzo potrzebne, moim zdaniem, wprowadzenie w tematykę związaną z problematyką ekspresji genów oraz aspektów dotyczących syntezy i właściwości strukturalnych oraz aktywności biologicznej TMG kapu. Rozdział wstępny zawiera ponadto krótkie wprowadzenie w tematykę związaną z pomiarami fluorescencyjnymi. Cele rozprawy, zarówno te strategiczne jak i szczegółowe, rozdzielone na obszar badań związany z syntezą organiczną oraz obszar spektroskopii i biofizyki molekularnej, sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału 2. pt. „Cele pracy”. Najważniejszym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej bardzo wysokim poziomie, jest zdecydowanie rozdział 3. pt. „Badania własne i dyskusja wyników”. Podstruktura tego rozdziału odpowiada sekwencji poszczególnych zadań badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego. W pierwszej jego części zaprezentowane zostały prace, które doprowadziły do zsyntetyzowania 13 analogów TMG kapu, posiadających modyfikacje strukturalne w obrębie mostka fosforanowego oraz drugiego nukleozydu. W części kolejnej, zaprezentowana została charakterystyka właściwości fizykochemicznych zsyntetyzowanych analogów TMG kapu, opierająca się na analizach spektroskopowych (widma ^1H oraz ^{31}P NMR, elektronowa spektroskopia absorpcyjna, stacjonarna spektroskopia fluorescencyjna). W trzeciej części tego rozdziału przedstawione zostały badania analogów TMG kapu, które określić można skrótowo mianem biofizycznych a obejmujących analizy termodynamiczne równowagi konformacyjnej oraz badanie oddziaływań analogów TMG kapu ze snurportyną, białkiem adaptorowym tworzącym kompleks z TMG kapem umożliwiający jego wnikiwanie do jądra komórkowego. Prezentację wyników zamykają, przedstawiane w formie bardzo krótkich podrozdziałów, informacje pochodzące z innych badań, wskazujące na stabilność zsyntetyzowanych analogów w środowisku biologicznym. Wyniki te wskazują jednoznacznie na



znaczenie fizjologiczne rezultatów projektu doktorskiego. Procedury eksperymentalne, zarówno te związane z syntezą organiczną analogów TMG kapu jak i ich późniejszymi badaniami spektroskopowymi, opisane zostały wyjątkowo szczegółowo, precyzyjnie i obszernie w ramach rozdziału 4. pt. „Część eksperymentalna”. Część merytoryczną rozprawy kończy „Podsumowanie”, jako rozdział 5. oraz zestawienie cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału 6. pt. „Bibliografia”.

W pełni podzielam zdanie Doktorantki co do wskazania najważniejszych rezultatów pracy doktorskiej, zestawionych w rozdziale 5. Opracowanie procedur syntezy szeregu analogów TMG kapu, stabilnych w środowisku enzymów litycznych oraz istotnych z medycznego punktu widzenia, stanowi w moim odczuciu ważny krok w kierunku „oswajania” nowoczesnych podejść w terapii genetycznej. Ponadto, przedstawienie obszernej charakterystyki biofizycznej oddziaływania nowo zsyntetyzowanych analogów TMG kapu z białkiem adaptorowym snurportyną, stanowi istotny postęp w szeroko pojętym obszarze nauki związanym z oddziaływaniami funkcjonalnymi kwasów nukleinowych z białkami.

Poza bardzo wysokim poziomem merytorycznym, zwrócić chciałbym również uwagę na wysoki poziom edytorski rozprawy, tak w aspekcie jakości grafik jak i poprawności językowej i staranności edycji tekstu. W trakcie lektury rozprawy napotkałem nieliczne miejsca, w których zaproponować mógłbym Autorce drobne korekty. Oto ich krótka lista:

1. str. iv Wstępu, 13. wiersz od góry: sformułowanie „(wymienić jakich)” nie wydaje się już konieczne,
2. str. 1., 2. wiersz od góry: zamiast „podwójna” proponuję „podwójną”,
3. str. 12, 6. wiersz od dołu: w miejsce „zlokalizowana kompleksie” proponuję „zlokalizowana w kompleksie”,
4. str. 49., 8. wiersz od dołu: zamiast „jony” proponuję „jonu”,
5. str. 51., 15. wiersz od dołu: w miejsce „Tp” raczej „Trp”,
6. str. 53., 13. wiersz od dołu: „ciemnego” w miejsce „ciemnego”,
7. str. 55., 12. wiersz od góry: „genowej” zamiast „genowejSS”,
8. str. 86., 3. wiersz od dołu: proponuję „ulegają” zamiast „mogą”,
9. str. 93., 7. wiersz od dołu, powinno być raczej „4.3.3” zamiast „4.3.5”.



Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim jest rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Waszczuk, dostarcza wiele ważnych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Zestawienie widm prezentowane w ramach Rys. 3.23 na str. 77 przedstawia stosunkowo dobrą zgodność pomiędzy wzbudzeniem fluorescencji oraz absorpcją światła. Może być to w pełni zrozumiałe wobec faktu, iż emisja fluorescencji zachodzi właśnie z tego samego poziomu elektronowego. Jednocześnie, zaobserwować można pewne drobne niezgodności w porównywanych widmach. Czy udało by się uniknąć nawet ich porównując widmo wzbudzenia fluorescencji nie z absorbancją (czy też molowym współczynnikiem absorpcji) ale z policzonym widmem liniowym 1-T (jeden minus transmisja)? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat?

2. Oddziaływanie analogów TMG kapu z białkiem snurportyną analizowane było w ramach rozdziału 3.3.2 na podstawie pomiaru łącznej fluorescencji pochodzącej z 6 cząsteczek tryptofanu, występujących w strukturze tego białka, podczas gdy tylko dwie reszty tryptofanowe zlokalizowane są w kieszenie snurportyny wiążącej TMG kap. Ciekaw jestem czy zastosowanie techniki rozdzielczej w czasie spektroskopii fluorescencyjnej umożliwiło by selektywne monitorowanie oddziaływania analogów TMG kapu z centrum wiążącym, zwiększając precyzję analiz?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Małgorzata Waszczuk przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w dwóch pracach ogłoszonych w czasopismach specjalistycznych o międzynarodowym obiegu. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Małgorzatę Waszczuk spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym



oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś ogromna liczba rezultatów oraz ich znaczenie w obszarze poszukiwania i pełnej charakterystyki molekuł tzw. „transporterów” w terapii genowej, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując Doktorantce oraz Promotorowi tak wartościowych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Małgorzatę Waszczuk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.