



Katedra Chemii Bioorganicznej

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

50-370 Wrocław

Prof. Paweł Kafarski

e-mail: pawel.kafarski@pwr.edu.pl

web: <http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl>



Wrocław 10.12.2020

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Przemysława WANATA

„Projektowanie, synteza i badanie właściwości adeninowych nukleotydowych sond fluorescencyjnych – narzędzi do monitorowania reakcji enzymatycznych”

Praca doktorska Pana mgr Przemysława Wanata została wykonana pod opieką Pana prof. Jacka Jemielitego i Pani prof. Joanny Kowalskiej. Gdy promotorami jest tak znakomity duet uczonych trudno sobie wyobrazić, aby praca nie była udatną realizacją bardzo oryginalnego pomysłu badawczego.

ATP jest niekiedy nazywane „molekularną jednostką monetarną” organizmu. Jest tak dlatego, że jest to molekula, która nie dość, że dostarcza energii dla prawidłowego przebiegu większości jego procesów, ale również pełni funkcję wielofunkcyjnego kofaktora i komórkowego hydrotoku (związek, który dobrze rozpuszcza związki hydrofobowe, w roztworze wodnym). Dlatego też synteza ATP i jego analogów sfunkcjonalizowanych grupami fluorescencyjnymi, czyli związków, które mogą mieć zastosowanie do badania roli ATP w komórce jest wyborem jak najbardziej wartym wysiłku.

Nie zamierzam szczegółowo opisywać badań wykonanych przez Pana Przemysława Wanat w ramach realizacji pracy doktorskiej. Po pierwsze, opisane zostały one na 104 stronach recenzowanej rozprawy oraz w postaci trzech dobrych publikacji naukowych. Tu warto dodać, że nie wszystkie wyniki zostały już opublikowane.

Doktorant zaprojektował i otrzymał sondy do badania enzymów degradujących ATP. Wybrał tu układy, w których ATP i jego analogi sfunkcjonalizowane były dwoma znacznikami fluorescencyjnymi – związanymi z terminalną resztą trójfosforanu (lub jego analogu) i z grupami 2' i 3' rybozy. Dobór grup fluorescencyjnych i odstępniaka między nimi a miejscami wiązania w bazowej cząsteczce, podyktowany był tym, że Doktorant usiłował wykorzystać te sondy korzystając z dwóch efektów – fluorescencji

ekscymerowej i efektu FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Trzeba pochwalić fakt, że jako techniki syntezy Pan Przemysław Wanta wybrał reakcje typu „click”, które okazały się wysoce efektywne zarówno w przypadku wprowadzania dwóch jednakowych jak i dwóch różnych znaczników fluorescencyjnych do cząsteczki.

Następnym etapem było zbadanie właściwości fluorescencyjne otrzymanych sond. Badania te pozwoliły określić zakres stosowalności sond w zależności od warunków w jakich zamierzano je stosować. Szczególnie ważnymi dla mnie były badania nad wpływem obecności surfaktantu Tween 20 na te właściwości.

W końcu Doktorant zbadał wpływ wyselekcjonowanych sond na aktywność dwóch enzymów – fosfodiesterazy z jadu węża i ludzkiej oraz roślinnej bis(5'-adenozylotrifosfatazy. Badania te pokazały, że otrzymane sondy można użyć w układach *in vivo*. Dodatkowo wykazano, że sondy ekscymerowe mogą znaleźć zastosowanie w screeningu aktywności inhibitorów fosfodiesterazy z jadu węża.

Zwieńczeniem pracy były badania wykonane nad zdolnością obu grup związków do penetracji błony komórkowej komórek HeLa i ich rozpoznawania przez pirofosfatazy. Badania te, które trzeba potraktować jako wstępne przyniosły obiecujące wyniki.

Podsumowując, trzeba stwierdzić, że w pracy doktorskiej Pana mgr Przemysława Wanata pojawia się wiele wątków i wszystkie z nich przyniosły interesujące wyniki. Cała praca to przykład kompletnego projektu badawczego zrealizowanego w bardzo przemyślany i dobry sposób.

Praca doktorska ma układ klasyczny i zaczyna się od wprowadzenia czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Ten wstęp, zresztą jak cała praca, napisany jest bardzo dobrze i czytelnie, ładną polszczyzną, a także zawiera niewiele elementów tzw. żargonu naukowego. Pochwalić należy także to, że każdy rozdział zakończony jest krótkim i ciekawym podsumowaniem, które nie nosi znamion streszczenia. Ten system Doktorant konsekwentnie stosuje w całej pracy. Niestety, bardzo utrudnia poruszanie się po pracy sposób numerowania poszczególnych rozdziałów i paragrafów.

Następujące po części literaturowej rozdziały opisujące badania własne (wraz z czytelnym graficznym streszczeniem i krótkim podrozdziałem prezentującym cel badań) oraz część eksperymentalna są bardzo szczegółowe i dobrze pokazują zarówno sposób realizacji badań, jak i ogrom pracy włożony w ich realizację. Słowem, praca Pana mgr Przemysława Wanata mi się po prostu podoba i nawet wybaczam mu brak bardziej ogólnych wniosków, jakimi mógłby zakończyć pracę. Pochwalić również trzeba dbałość Doktoranta o wyraźne pokazanie tych fragmentów badań, bez opisu których nie udałoby się skonstruować rozprawy, a które wykonali Jego współpracownicy.

W trakcie czytania pracy zanotowałem kilka pytań i uwag, które przedstawiam w porządku chronologicznym:

- Na stronie 75 Doktorant omawia trzy mechanizmy nukleofilowej substytucji atomu fosforanowego. Nie wiem, dlaczego Autorzy publikacji, na którą Pan mgr Przemysław Wanat się powołuje nie podali czwartego mechanizmu. Ten czwarty mechanizm, który obserwuje się również w układach biologicznych, to pseudorotacja. Jest ona ważna, bo reakcja ta zachodzi z inwersją konfiguracji na atomie fosforu;
- W rozdziale 13 brakuje mi pokazania wzorów omawianych związków. Można tego było dokonać na dwa sposoby: poprzez dodanie odpowiedniego rysunku (zdaję sobie sprawę, że te wzory są widoczne w innym miejscu pracy) lub przez wprowadzeni numeracji struktur do graficznego abstraktu. Zdaję sobie sprawę, że oba rozwiązania są „kulawe”;
- Jak rozumiem widma ^{31}P NMR były rejestrowane bez rozprzęgania od wodorów. Widmo na str. 89 sugeruje, że kwas 2-bromoetenofosfonowy jest jednym izomerem – to nie ma żadnego znaczenia dla przeprowadzonych badań, ale wydaje mi się interesujące;
- Czy istnieją dodatkowe dowody (oprócz nukleofilowości atomu azotu N7 guaniny) na miejsce metylowania analogów GTP - reakcji opisanej w paragrafie 14.7?
- Wyniki badań za pomocą metod obliczeniowych, opisane w rozdziale 16.5 są zgodne z moim doświadczeniem dotyczącym elektroakceptorowego charakteru grupy fosfonowej – nie jest to dobry akceptor elektronów;
- Badania opisane w paragrafie 18.2 są również zgodne z moją intuicją. Wydaje mi się, że interesującym byłoby sprawdzić aktywność sond fosfonianowych, w których grupę CH_2 zastąpić grupą CF_2 – są to lepsze, jeśli chodzi o izoelektronowy charakter, analogi fosforanów.

Przywilejem, a nawet obowiązkiem recenzenta jest wskazanie tych fragmentów pracy, które budzą jego wątpliwości. I nie chodzi tu bynajmniej o usterki edytorskie, jakich nie sposób uniknąć przy pisaniu takiego dzieła - zresztą tych praktycznie w pracy nie ma. Nie zamierzam zatem uchylać się od podania kilku uwag krytycznych. I tak:

- Gdybym był żoną Pana Przemysława obraziłbym się za podziękowania, chyba, że jest to rodzaj kodu małżeńskiego zrozumiałego tylko dla zainteresowanych (str. 3);
- Zdaję sobie sprawę, że jest kłopot z nazwami zwyczajowymi związków naturalnych – ale reguły przenoszenia tych nazw na język polski preferują β -lapachon (str. 61);
- Metoda może być ogólna, korzystna itp., ale nie wszechstronna (str. 86);

- Na str. 92 jest jedyny błąd edytorski jaki udało mi się znaleźć, ciekawe czy Doktorant go znajdzie;
- Widma się rejestruje, a nie nagrywa (str. 98);
- Podoba mi się notacja „X=nic” (str. 128);
- Zmieniłbym słowo „wobec” na dole strony na „do” (str. 143).

Są to uwagi marginalne i nie mają żadnego wpływu na moją wysoką ocenę wartości rozprawy Pana mgr Przemysława Wanata, a raczej mają pokazać, że pracę starałem się przeczytać starannie.

Reasumując, przyszło mi recenzować solidną, dobrze napisaną i ciekawą pracę opisującą realizację innowacyjnego i świeżego pomysłu badawczego. Praca ta w pełni spełnia warunki zarówno ustawowe jak i zwyczajowe jakie stawia się pracom doktorskim. Zatem, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Wanata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres i jakość wykonanych badań, ich stopień trudności i uzyskane wyniki proponuję wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą. Nie bez znaczenia jest też fakt, że wyniki tych badań zostały już opublikowane w postaci trzech artykułów umieszczonych w czasopismach o bardzo wysokim standardzie a dodatkowa publikacja jest przygotowywana do wysłania do czasopism. Dodatkowo Pan mgr Przemysław Wanat jest współautorem trzech bardzo dobrych publikacji nie wchodzących w zakres tematyki jego dysertacji naukowej. Co więcej, sondy opracowane przez Doktoranta zostały zweryfikowane przez kolegów z zespołu, którzy opisali ich użycie w dwóch niezależnych publikacjach.

