



UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA
INSTYTUT FIZYKI

ul. Grudziądzka 5/7 87-100 TORUŃ

<http://www.fizyka.umk.pl/>

Tel. centr. (48 56) 611 33 10

Sekretariat: (48 56) 622 63 70

Fax (48 56) 622 53 97

e-mail: ifiz@fizyka.umk.pl

DZIEKANAT
SEKCJA ds. DOKTORANCKICH



Toruń, 5 stycznia 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Przemysława Wanata,
zatytułowanej "Projektowanie, synteza i badanie właściwości adeninowych
nukleotydowych sond fluorescencyjnych - narzędzi do monitorowania
reakcji enzymatycznych", przedstawionej Radzie Dyscypliny Nauki Fizyczne
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie**

Rozprawa doktorska magistra Przemysława Wanata została przygotowana w Zakładzie Biofizyki w Instytucie Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Jemielitego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej. Poświęcona jest ona poszukiwaniom sposobów monitorowania reakcji enzymatycznych za pomocą technik fluorescencyjnych, które w ostatnich latach z coraz większym sukcesem stosowane są do poznawania zjawisk zachodzących w strukturach o znaczeniu biologicznym. Adekwatność tych metod wynika przede wszystkim z ich małej inwazyjności, niezbyt wygórowanych wymagań aparaturowych, a także z możliwości obserwacji zachodzących zjawisk w czasie rzeczywistym. Z drugiej strony, aby w pełni wykorzystać bogaty arsenał możliwości technicznych oferowanych przez nowoczesne metody mikroskopii fluorescencyjnej konieczne jest precyzyjne zaprojektowanie i wytworzenie sond o odpowiedniej strukturze, funkcji oraz żądanych właściwościach spektroskopowych. Biorąc to pod uwagę, stwierdzam, że cel naukowy postawiony przez Doktoranta w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej jest nie tylko niezwykle ambitny, ale także wskazuje na kompleksowe podejście do zagadnienia, czego najlepszym odzwierciedleniem jest sam tytuł pracy. Rozprawa obejmuje bowiem zarówno zagadnienia dotyczące projektowania nowych sond fluorescencyjnych, ich syntezę chemiczną, a także przedstawia zastosowanie tych sond w rzeczywistych układach komórkowych. Z tego punktu widzenia praca przedstawiona przez magistra Przemysława Wanata jest kompletna.

Zanim przejdę do dyskusji szczegółowej, chciałbym odnieść się do ogólnego wrażenia, które wywołuje lektura tej rozprawy doktorskiej. Jest ono niezwykle pozytywne. Pomimo tego, że w rozprawie podejmowane są trudne zagadnienia, mam tu na myśli zwłaszcza te dotyczące subtelności związanych ze strukturami chemicznymi omawianymi w rozprawie czy ich funkcjami

biologicznymi, to pracę czyta się bardzo dobrze. Czytelnik jest w uporządkowany i logiczny sposób prowadzony przez meandry zagadnień opisywanych w rozprawie, co pozwala nie tylko na dobre zrozumienie dokonań Doktoranta, ale także na umiejscowienie ich w kontekście badań prowadzonych w tej dziedzinie. W przypadku badań wykraczających poza jedną, ściśle zdefiniowaną dziedzinę, ma to kluczowe znaczenie dla prawidłowej oceny wagi rezultatów będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Właściwa prezentacja kontekstu naukowego jest w mojej ocenie niezwykle ważnym elementem rozprawy doktorskiej, zwłaszcza takiej, która ma charakter silnie interdyscyplinarny, gdyż dowodzi szerokiej wiedzy i bardzo dobrej orientacji Autora w tematyce rozprawy. Nie jest to poza tym umiejętność często występująca, zasługuje więc na szczególne wyróżnienie. Zestaw bardzo dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, opis technik pomiarowych, metod analizy danych, wskazuje na bardzo dobrą orientację Autora w podejmowanych zagadnieniach, a także na zrozumienie tajników związanych zarówno z konstrukcją sond fluorescencyjnych jak i z procesami biologicznymi, które mają być przy ich wykorzystaniu monitorowane.

Rozprawa przedstawiona przez magistra Przemysława Wanata obejmuje 200 stron, z czego 40 (rozdziały 20 i 21) poświęcone jest technikom eksperymentalnym, opisom syntez i szczegółowej charakteryzacji ich produktów, a wyniki własne obejmują około 80 stron. Spis literatury zawiera ponad 200 pozycji. Struktura rozprawy nie odbiega od klasycznej, a duża liczba rozdziałów wynika z wielu poruszanych w pracy zagadnień. Rozdziały w większości opatrzone są wstępem oraz podsumowaniem, co dodatkowo poprawia przejrzystość rozprawy i logikę wywodu.

Rozprawę otwiera bardzo starannie przygotowana i przemyślana część literaturowa, obejmująca takie zagadnienia jak chemię i biologię nukleotydów, rolę cząsteczki ATP i metody jej detekcji, a także dyskusję analogów ATP i ich modyfikacji. Zagadnienia te w jednoznaczny sposób prezentują motywację naukową dla podjętego projektu badawczego i podkreślają jego znaczenie. Kolejnymi aspektami omówionymi we wstępie są fluorescencja ekscymerowa oraz mechanizm przekazu energii typu FRET wraz z zastosowaniem tych zjawisk do badań kwasów nukleinowych oraz do badań enzymatycznych. Są to podstawowe zjawiska fizyczne wykorzystane przez Doktoranta w badaniach i ich opis w stopniu więcej niż adekwatnym podkreśla wymogi stawiane sondom fluorescencyjnym, które mają zostać zsyntezowane i wykorzystane w rozprawie. Ostatnia sekcja wprowadzenia dotyczy opisu wybranych podejść w chemii nukleotydów ze szczególnym uwzględnieniem reakcji typu „click” i reakcji CuAAC. W mojej ocenie wprowadzenie literaturowe zawiera wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia zakresu merytorycznego rozprawy, jest ono poza tym – pomimo specjalistycznego języka – napisane w sposób dosyć przystępny, co ułatwia płynną lekturę.

Wyniki badań własnych przeprowadzonych przez magistra Przemysława Wanata można podzielić na dwa główne obszary. Choć głównym celem pracy było opracowanie sond nukleotydowych – narzędzi przydatnych w bezinwazyjnym monitorowaniu w czasie rzeczywistym reakcji enzymatycznych – to projekt składał się z części syntetycznej oraz spektroskopowej. Część syntetyczna polegała na zaprojektowaniu i zoptymalizowaniu reakcji syntezy analogów nukleotydów pod kątem ich zastosowań jako sondy molekularne. Badania spektroskopowe i mikroskopowe dotyczyły zaś opisu własności spektroskopowych otrzymanych związków, a także określenia ich podatności na hydrolizę enzymatyczną czy zdolność do penetracji błony komórkowej. W moim przekonaniu każda z tych części osobno mogłaby stanowić podstawę samodzielnej, bardzo dobrej rozprawy doktorskiej.

Rezultaty będące wynikiem wysiłku włożonego w otrzymanie sond molekularnych, optymalizację syntez i charakterystykę chemiczną produktów stanowią nową, wartościową wiedzę, na którą składają się:

(1) synteza analogów nukleotydów i analogów terminalnej reszty fosforanu zawierającej grupy alkinowe, dzięki której uzyskano analogi adenozyiny, guanozyiny, cytydyny, urydyny, oraz 7-metyloguanozyiny. Łącznie zsyntezowano 16 analogów nukleotydów zawierających jedną grupę alkinową przyłączoną do reszty terminalnego fosforanu oraz 17 analogów nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe.

(2) opracowanie warunków wydajnej reakcji CuAAC nukleotydów ze znacznikami fluorescencyjnymi, co pozwoliło na uzyskanie znakowanych nukleotydów i sond nukleotydowych: 11 pojedynczo znakowanych nukleotydów będących analogami nukleotydów purynowych, oraz 19 sond ekscymerowych będących analogami trifosforanów adenozyiny, guanozyiny, cytydyny, oraz 7-metyloguanozyiny.

(3) opracowanie warunków sekwencyjnej reakcji CuAAC, co pozwoliło na przyłączenie kolejno dwóch różnych znaczników do struktury nukleotydu, bez konieczności wykorzystania grup ochronnych, ani wydzielania produktu pośredniego. W ten sposób możliwa była synteza 18 analogów trifosforanów guanozyiny, adenozyiny, oraz 7-metyloguanozyiny, zawierających w swej strukturze dwa różne znaczniki.

Drugim obszarem badań przedstawionych w rozprawie są badania własności optycznych uzyskanych sond, zarówno ekscymerowych jak i wykorzystujących efekt FRET. Obejmowały one:

(1) pomiary charakterystyczne analogów nukleotydów zawierające dwa identyczne barwniki fluorescencyjne (sondy ekscymerowe) oraz dwa różne barwniki fluorescencyjne (sondy FRET), których celem było określenie ich właściwości emisyjnych oraz stabilności względem

rozmaitych czynników. Efektem tych eksperymentów była dalsza selekcja sond pod kątem badań enzymatycznych.

(2) monitorowanie reakcji enzymatycznych z niespecyficznym enzymem PDE-I z wykorzystaniem sond nukleotydowych w czasie rzeczywistym, które potwierdziło funkcjonalność zaprojektowanych sond. W miarę przebiegu reakcji widmo fluorescencji ulegało zmianie w sposób oczekiwany dla sond ekscymerowych (pojawienie się fluorescencji monomerowej), dla sond FRET (pojawienie się fluorescencji donora), oraz dla sond wygaszeniowych, dla których obserwowano wzrost natężenia fluorescencji fluoroforu.

(3) przetestowanie właściwości sond w komórkach i lizatach komórkowych, czyli w układach o znacznie bardziej złożonym środowisku reakcji. Również w tym przypadku zaobserwowane zostały zmiany widm fluorescencji użytych sond nukleotydowych. Istotną obserwacją było wykazanie, że niektóre spośród wytworzonych sond penetrują błonę komórkową i mają zdolność lokowania się w cytozolu.

Już nawet ten skrócony opis dowodzi, że zakres eksperymentów przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej jest imponujący. Co równie istotne, eksperymenty te tworzą spójną całość, posiadają początek i koniec, dają poczucie, że po „A” następuje „A”, a po „Z” następuje „Ż”. Zastanawiam się, czy faktycznie ten projekt był w ten sposób zaplanowany, a później z żelazną konsekwencją egzekwowany, czy też ten porządek i kompletność rozprawy jest do pewnego stopnia dziełem przypadku, przypadku, który w tej sytuacji można nazwać szczęściem naukowym.

Struktura i zawartość merytoryczna tej rozprawy uniemożliwia w zasadzie wyróżnienie jednego wyniku i wskazanie go jako jej największe osiągnięcie. Poprzez wewnętrzną spójność, rozprawa ta jest dziełem kompletnym i jako taka stanowi osiągnięcie. Wartość naukową wyników włączonych do rozprawy (a z jej lektury wynika, że sporo rezultatów się w niej nie znalazło) oceniam bardzo wysoko. Ocena ta jest dodatkowo podkreślona poprzez dorobek publikacyjny Doktoranta, obejmujący publikacje w wiodących czasopismach z dziedziny, takich jak Chemical Communications, Organic Letters czy Chemistry – A European Journal. W dwóch pracach magister Przemysław Wanat jest pierwszym autorem, a kolejne publikacje są w przygotowaniu.

Przy okazji recenzji tej bardzo dobrej rozprawy doktorskiej, pozwolę sobie na jeszcze jedną dygresję. W zasadzie nie powinno nikogo dziwić, że Doktorant pracujący w wiodącej grupie badawczej kierowanej przez prof. dr. hab. Jacka Jemielitego, w bardzo dobrym ośrodku i otoczeniu intelektualnym, prowadzi wysokiej klasy badania i posiada w dorobku dobre publikacje. Ale w mojej opinii magister Przemysław Wanat prezentuje znacznie wyższy poziom nawet od tego oczekiwanego. Z lektury rozprawy doktorskiej wynika jednoznacznie, że jest

dojrzałym badaczem, który nie tylko potrafi w sposób niemal perfekcyjny przedstawić wyniki swoich badań, ale i z pokorą do nich podejść, krytycznie analizować uzyskiwane dane, uczyć się na niepowodzeniach lub nawet przekuć je w sukces.

Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana z bardzo dużą starannością, napisana jest poprawnie w języku polskim, a jej lektura nie sprawia większych trudności. Nie ukrywam, że jestem pod wrażeniem. Rysunki zostały przygotowane z pietyzmem, cała oprawa graficzna, formatowanie, dbałość o szczegół zasługuje na uznanie. Przyznaję, że gdy po raz pierwszy przekartkowałem tę rozprawę, to moje pierwsze wrażenie było takie, że będzie to dobry doktorat. I się zawiodłem. Bo jest to rozprawa naprawdę bardzo dobra. Można znaleźć kilka niedociągnięć, ale to są takie drobiazgi, że nie warto ich przytaczać. No może poza brakiem konsekwencji w doborze objaśnionych skrótów i dosyć częstej sytuacji, w której podpis pod rysunkiem znajduje się na drugiej stronie (częściowo lub w całości).

Rozprawa doktorska przygotowana przez magistra Przemysława Wanata jest pracą wyjątkową, zarówno pod względem zawartości merytorycznej, kompletności wyników, ich jakości i znaczenia, jak i wzorowej, logicznej i konsekwentnej prezentacji. Zadanie, którego podjął się Doktorant wymagało opanowania umiejętności nie tylko w zakresie syntezy nowych sond nukleotydowych, ale również w ich zastosowaniu do monitorowania reakcji enzymatycznych w czasie rzeczywistym. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach chemicznych. Podsumowując, zarówno tematyka rozprawy doktorskiej, jej rozmach, zakres przeprowadzonych syntez chemicznych i eksperymentów spektroskopowych, a także stopień zrozumienia uzyskanych wyników, nie pozostawiają najmniejszej wątpliwości, że magister Przemysław Wanat jest wysokiej klasy badaczem. Podkreślić chcę także wysoką jakość warsztatową przygotowanej rozprawy doktorskiej. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa, zatytułowana *„Projektowanie, synteza i badanie właściwości adeninowych nukleotydowych sond fluorescencyjnych - narzędzi do monitorowania reakcji enzymatycznych”*, spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie magistra Przemysława Wanata do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę argumenty przedstawione w recenzji, chcę wystąpić z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.



Sebastian Mackowski