



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 19 kwietnia 2021 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki

Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Renaty Kasprzyk

pt. „Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5' mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych”

Teza, iż dynamiczny postęp w naukach o życiu kroczy za, a w zasadzie torowany jest rewolucyjnym rozwojem warsztatu pojęciowego oraz aparaturowego w obszarze fizyki oraz innych nauk ścisłych nie wymaga, moim zdaniem, szczególnej argumentacji. Rozprawa doktorska pani mgr Renaty Kasprzyk jednoznacznie wpisuje się w kategorię chlubnych przykładów na poparcie tej tezy. W ramach projektu doktorskiego podjęto bowiem śmiało wyzwanie opracowania, syntezy oraz przetestowania sond molekularnych opartych na nukleotydach, specyficznie dedykowanych badaniom procesów związanych z oddziaływaniem końca 5' mRNA z partnerami białkowymi istotnymi z punktu widzenia procesów fizjologicznych. Fakt, iż tego typu oddziaływania stanowią niezwykle ważne ogniwo regulacji ekspresji informacji genetycznej w komórkach, czyni poruszany problem nie tylko interesującym, ale również ważnym. Waga adresowanych w ramach przedmiotowej rozprawy

doktorskiej problemów wynika również z faktu, iż oddziaływanie 5' końca mRNA z białkami na szlaku translacyjnym budzi zainteresowanie środowiska medycznego, w aspekcie opracowywania specyficznych leków w terapii antynowotworowej oraz antywirusowej.

Praca doktorska pani mgr Renaty Kasprzyk wykonana została pod kolektywnym kierunkiem profesorów Jacka Jemielitego z Centrum Nowych Technologii oraz Andrzeja Wysmołka z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Rozprawa okazała się opracowaniem wyjątkowo obszernym, zredagowana została w języku polskim, na 267 stronach standardowego maszynopisu w oparciu o logiczną i przyjazną czytelnikowi strukturę. Po spisie treści oraz wykazie skrótów, Autorka zamieściła bardzo cenną, moim zdaniem tablicę zatytułowaną „Zapis struktury nukleotydowej”, antycypując potencjalne problemy w przedzieraniu się przez terminologię z obszaru zaawansowanej chemii bioorganicznej jakie mogą napotkać fizycy bądź reprezentanci dziedzin pokrewnych. Cel pracy sformułowany został w ramach krótkiego rozdziału I., posiadającego dodatkowy walor wprowadzenia w tematykę badawczą oraz stosowane podejścia metodologiczne. Pomiędzy rozdziałem I. oraz II. Autorka zamieściła obszerny wykaz swoich publikacji naukowych, patentów oraz komunikatów konferencyjnych, prezentujących wyniki bezpośrednio bądź pośrednio związane z tematyką rozprawy. Miejszem realizacji idei ogólnej prezentacji tematyki badawczej, w ramach której prowadzone były prace, stał się w zamyśle Doktorantki rozdział II. zatytułowany „Przegląd literaturowy”. Zamieszczony w nim tekst ma faktycznie charakter pracy przeglądowej, zredagowanej w bardzo dobry sposób, z uwzględnieniem aspektów strukturalnych i fizjologicznych badań końca 5' mRNA; z wyraźnym akcentem na otwarte i najbardziej aktualne wyzwania poznawcze. Rozdział III. zatytułowany „Metodyka badań” w sposób systematyczny prezentuje stosowane w ramach projektu doktorskiego podejścia i techniki eksperymentalne. Lektura rozdziałów II. oraz III. otwiera możliwości analizy wyników prac własnych Autorki rozprawy, zamieszczanych na dalszych jej stronicach, rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyniki uzyskane w ramach projektu doktorskiego zaprezentowane zostały w ramach rozdziału IV., zatytułowanego „Badania własne”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą realizację licznych zadań badawczych projektu doktorskiego. W mojej ocenie, zadań bardzo ambitnych a zarazem

pracochłonnych, wymagających nie tylko biegłości w obszarze zaawansowanej syntezy organicznej, ale również w obszarach biofizyki i spektroskopii molekularnej, w szczególności spektroskopii fluorescencyjnej. Opisane w sposób precyzyjny, zrealizowane zadania badawcze układają się w logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy, a zapewne również chronologiczny, w ramach którego realizacja badań późniejszych nie byłaby możliwa bez precyzyjnych informacji stanowiących rezultaty badań przeprowadzonych wcześniej. W ramach tego cyklu prowadzone były prace ukierunkowane na: (i) syntezę sond molekularnych znakowanych różnorodnymi fluoroforami, (ii) pełną charakterystykę właściwości spektroskopowych skonstruowanych znaczników, z uwzględnieniem wydajności kwantowej fluorescencji oraz, w szczególności, zmian parametrów spektroskopowych pod wpływem oddziaływania sond z partnerami białkowymi istotnymi z punktu widzenia fizjologii mRNA, (iii) optymalizację struktury sond i warunków eksperymentalnych analiz oraz (iv) walidację analiz w aspekcie prowadzenia testów wysokoprzepustowych, tak istotnych z punktu widzenia poszukiwania nowych związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym. W świetle uzyskanych wyników badań, sondami molekularnymi szczególnie obiecującymi okazały się te bazujące na fluoroforze pirenowym. Poziom intensywności fluorescencji pirenu sprzężonego z nukleotydem zależy bowiem krytycznie od oddziaływania fluoroforu z zasadą azotową. W ramach projektu doktorskiego zaprojektowano również zestawy innych sond molekularnych, opierających się, między innymi, na dwuznakowanych pochodnych nukleotydów. Tego typu rozwiązania, bardzo eleganckie z punktu widzenia spektroskopii molekularnej, wykorzystywały procesy bezpromienistego przekazu energii wzbudzenia elektronowego (tzw. FRET), formowanie ekscymerów oraz proces wygaszania fluorescencji. Bardzo podobało mi się również podejście bazujące na wykorzystaniu anizotropii fluorescencji syntezowanych sond molekularnych. Ogromne znaczenie wyników uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej pani mgr Renaty Kasprzyk potwierdzone zostało poprzez wykorzystanie w kolejnych badaniach związanych z metabolizmem mRNA sond molekularnych zaprojektowanych oraz wprowadzonych do arsenału nowych metod. Na poparcie tej tezy przytoczę choćby najnowszą pracę z grupy prof. Jacka Jemielitego, która ukazała się właśnie w czasopiśmie Scientific Reports (11 (2021) 7687). Innym interesującym

oraz ważnym, moim zdaniem, kierunkiem badań realizowanych w ramach projektu doktorskiego pani mgr Renaty Kasprzyk, było podejście zmierzające do opracowania sensorów monitorujących oddziaływanie 5' końca mRNA z białkami, z zastosowaniem sfunkcjonalizowanych nukleotydami powierzchni grafenowych: monowarstw, dwuwarstw oraz układów mezymorficznych deponowanych na tranzystorze polowym GaN. Pełna charakterystyka formowanych układów wiodła przez obrazowanie z zastosowaniem rozpraszania Ramana oraz analizy prowadzone z wykorzystaniem technik spektroskopowych FTIR oraz XPS. Badania prowadzone w ramach tego cyklu jeszcze raz wydały się pokazać jak trudnym wyzwaniem technologicznym jest „przekonanie” obiektów w skali „nano” aby podążały za naszymi oczekiwaniami dotyczącymi uporządkowania oraz funkcjonowania na wyższych stopniach organizacji. Osobiście, ten kierunek aktywności naukowo-badawczej uważam za bardzo obiecujący oraz wart kontynuowania.

W ramach VI. rozdziału rozprawy, zatytułowanego „Część eksperymentalna”, Autorka zamieściła szczegółowe opisy stosowanych procedur syntezy organicznej, identyfikacji oraz badania czystości związków chemicznych oraz protokołów pomiarowych wraz z charakterystyką wykorzystanej aparatury. W moim odczuciu, poziom precyzji tych opisów dorównuje najwyższym standardom w tym zakresie, umożliwiając przeprowadzenie analogicznych eksperymentów w innych laboratoriach. W tym miejscu swojej oceny chciałbym jeszcze zaakcentować szeroki wachlarz metod eksperymentalnych wykorzystanych w realizacji projektu doktorskiego. Z jednej strony, wskazuje to na doskonałe możliwości laboratorium i ośrodka badawczego, ale, przede wszystkim, świadczy o świetnym warsztacie metodologicznym Kandydatki. Rozprawę zamyka zestawienie cytowanego piśmiennictwa, prezentowane w ramach rozdziału VII. pt. „Bibliografia”.

Bardzo wysokiemu poziomowi naukowemu rozprawy towarzyszy wyjątkowo wysoki, moim zdaniem, jej poziom edytorski: tak w zakresie precyzji językowej jak i jakości zamieszczonych grafik. Pracę czyta się bardzo dobrze, kształtując w sobie wrażenie o erudycji Doktorantki. Grafiki zamieszczone w rozprawie, w szczególności barwne tablice, jak na

przykład ta prezentowana na Rys. V.1. ze str. 222, urzekają nie tylko pomysłowością, ale również walorami artystycznymi.

Ocena pracy doktorskiej jest zwykle miejscem wymiany wiedzy oraz doświadczeń doktorantów oraz starszych koleżanek i kolegów, pełniących funkcję recenzentów. W ramach tej tradycji, pozwolę sobie przekazać nieliczne uwagi, które nasunęły mi się w trakcie lektury rozprawy. W większości przypadków, osie rzędnych na wykresach przedstawiających widma oraz sygnały fluorescencyjne opisywane są mianem „Fluorescencja”. Proponuję stosowanie opisu w formie „Intensywność fluorescencji”, w myśl zasady: wielkość fizyczna nie zaś samo zjawisko. Wydaje się, iż widma absorpcji promieniowania IR przez próbki grafenu przed i po utlenianiu (Rys. IV.153, str. 208) byłyby bardziej widoczne, gdyby widma skorygować o składową pochodzącą od pary wodnej obecnej w komorze pomiarowej, bądź zarejestrowanej przy okazji pomiarów linii bazowej. Te drobne uwagi absolutnie nie wpływają na niezwykle wysoką ocenę wartości naukowej uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników oraz samej rozprawy, jako dojrzałego i bardzo wartościowego, moim zdaniem, dzieła.

Konkluzja

Przechodząc do konkluzji chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Renata Kasprzyk przedstawiła rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach przeprowadzonych przez nią licznych oraz bardzo zaawansowanych, oryginalnych prac badawczych. Wszystkie badania opisane w rozprawie sprawiają wrażenie doskonale zaplanowanych oraz precyzyjnie wykonanych. W mojej ocenie, zarówno stawiane sobie jako cel pracy doktorskiej ambitne problemy poznawcze jak i poziom ich realizacji odpowiadają wysokim standardom rozpraw naukowych, spełniając tym samym w pełni warunki ustawowe. Znaczna część wyników badań uzyskanych w ramach projektu doktorskiego i zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w formie 7 artykułów ogłoszonych w renomowanych periodykach międzynarodowych. Doktorantka kształtowała swoją doskonałość warsztatową również w ramach innych, zbliżonych projektów badawczych, czego efektem stały się kolejne publikacje,

patenty oraz doniesienia konferencyjne. W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie pani mgr Renaty Kasprzyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych prac oraz rangę uzyskanych wyników, wnoszę również o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.

Uprzejmie proszę o przyjęcie moich rekomendacji,

