



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 3 września 2021 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Wojtczak pt. „Wykorzystanie zmian polaryzacji oraz innych metod spektrofлуorymetrycznych do badania aktywności oraz inhibicji białek oddziałujących z końcem 5' mRNA”

Rok 2021 niewątpliwie już na zawsze zapisze się w naszej pamięci jako upływający pod znakiem obaw związanych z pandemią koronawirusa. Jest to jednocześnie rok nadziei na pokonanie choroby, co stało się udziałem szczepionek opartych na nośnikach informacji genetycznych. Te, implementowane do układu pacjenta, ulegają ekspresji, czego efektem jest synteza pożądanego białka. Nie wykorzystuje się do tego celu DNA, co wymagałoby wprowadzenia modyfikacji do jądra komórkowego, ale matrycowe mRNA, który po upływie określonego czasu ulega destrukcji. Jest to strategia oparta na tzw. terapii genowej, której procesy stały się obiektem zainteresowań badawczych Pani mgr Anny Wojtczak. Za szczególnie interesujące uznała Ona ich etapy początkowy i końcowy, polegające na oddziaływaniu ligandów białek z końcem 5' mRNA (kapem) oraz degradacji informacyjnego RNA. W ramach głównego nurtu projektu doktorskiego podjęła się Ona opracowania metody spektroskopowej dla szybkiej i wysokoprzepustowej oceny wielkości oddziaływań zaangażowanych w wiązanie analogów kapu z białkiem inicjującym translację eIF4E oraz inhibicję białka DcpS (*ang.* Decapping Scavenger), które równocześnie stanowią częsty cel terapeutyczny. Wobec wspomnianego faktu, przedłożona praca jest opracowaniem nie tylko interesującym

ale i ważnym. W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć badawczych jest wysoka, zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Praca została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem znakomitych specjalistów, prof. dra hab. Jacka Jemielitego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej, w jednym z czołowych laboratoriów na świecie zaangażowanych w tego typu badania. Doktorantka kształtowała swój warsztat badawczy w szeregu badań, których rezultaty ukazały się w latach 2016-2021, w znakomitej liczbie indeksowanych czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym. Prace charakteryzują się dużymi wartościami oddziaływania tzw. impact factor. *Scientific Reports* (IF 4.379), w której Doktorantka jest pierwszym w kolejności autorem, *The Journal of American Chemical Society* (IF 15.419), w której występuje jako czwarta w kolejności, oraz *Chemical Science* (IF 9.658), *Organic & Biomolecular Chemistry* (IF 3.412), a także *The Journal of Organic Chemistry* (IF 4.890), w których występuje Ona jako druga w kolejności. W dorobku Pani Wojtczak znajdujemy również pracę opublikowaną w roku 2013 w *The Journal of Organic Chemistry*, która nie zalicza się do formalnej oceny dorobku doktorskiego, ale świadczy o zaangażowaniu i bardzo dojrzałym traktowaniu własnej przyszłości naukowej.

Rozprawę doktorską stanowi świetnie napisane opracowanie, zredagowane w języku polskim na 177 stronach obejmujące: sześć rozdziałów poprzedzonych spisem treści, wykaz dorobku naukowego, jedno zgłoszenie patentowe oraz jeden patent, udział w konferencjach naukowych oraz wykaz użytych skrótów i oznaczeń. Rozprawę rozpoczyna *Cel pracy*, który pozwala na zapoznanie się z tematyką badawczą podjętą przez Doktorantkę. Dąży Ona do opracowania bardziej wydajnej i mniej czasochłonnej metody diagnostycznej do analizy aktywności ligandów białek wiążących kap w stosunku do metod dotychczas używanych w macierzystym laboratorium tj. wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz miareczkowania zsynchronizowanego czasowo. Prezentacja oryginalnych wyników własnych w rozprawie poprzedzona została rozdziałem zatytułowanym *Część literaturowa*, pełniącym rolę wstępu jak i przeglądu literaturowego, dotyczącego ujęć strukturalnych, oraz roli różnych modyfikacji końca 5' mRNA (kapu) w procesie translacji, a następnie degradacji mRNA. Mgr Wojtczak w sposób zwięzły i klarowny wprowadza w aktualny stan wiedzy i otwarte problemy badawcze. Rozdział ten wzbogacony został o przegląd dotychczasowej wiedzy na temat białek szczególnie interesujących Panią mgr w kontekście wykonywanych

eksperymentów oraz charakterystykę procesów i parametrów fluorescencyjnych. Część ta zredagowana została, w mojej opinii, z wysoką dbałością o precyzję sformułowań oraz szatę graficzną.

Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej wysokim poziomie merytorycznym, jest obszerny rozdział III pt. *Badania własne*. Doktorantka w sposób naturalny podzieliła go na dwie części. Pierwszą, w której poszukiwała, a następnie optymalizowała metody spektroskopii fluorescencyjnej do charakterystyki oddziaływania białko-ligand oraz drugą, w której zastosowała wybrane metody do ewaluacji analogów kapu o nieznanych właściwościach. Pierwsze podrozdziały poświęcone zostały badaniom nad śledzeniem aktywności enzymatycznej białka DcpS poprzez kompleksowanie jonów fluorkowych uwalnianych w trakcie reakcji hydrolizy. Prace na tym projektem Pani mgr rozpoczęła jeszcze w trakcie przygotowywania rozprawy magisterskiej. Doktorantka używała do tego sondy fluorogenicznej i optymalizowała warunki dla pomiaru intensywności fluorescencji, a następnie prowadzenia eksperymentów na płytkach 96 dołkowych. Jak można się dowiedzieć z treści rozprawy, nieprawidłowa aktywność enzymu DcpS, zaangażowanego w proces degradacji mRNA powiązana jest z zaburzeniami zdrowotnymi u ludzi, takimi jak rdzeniowy zanik mięśni i niepełnosprawność umysłowa. Pani mgr Wojtczak w sposób bardzo ostrożny i precyzyjny określiła wiarygodność metody polegającej na pomiarze zmian intensywności poprzez zbadanie 76 związków o znanych wcześniej właściwościach inhibitorowych. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów wysokoprzepustowa metoda oparta na oznaczaniu stężenia jonów fluorkowych zaimplementowana została do poszukiwania potencjalnych inhibitorów białka DcpS spośród biblioteki LOPAC - związków farmakologicznie aktywnych, dinukleotydowych analogów kapu modyfikowanych w mostku fosforanowym, analogów benzytowych, analogów fosfotioestrowych, czy też analogów kapu w których 5-członowy pierścień rybozy zastępowano sześcioczłonowym pierścieniem 1,5-anhydroaltritolem. Spośród wspomnianych, nie udało się znaleźć silniejszego inhibitora niż znane dotychczas Doktorantce, a różne warunki dla reakcji enzymatycznych i reakcji odbezpieczania sondy fluorogenicznej nieco deprecjonowały metodę, z uwagi na brak możliwości monitorowania aktywności enzymatycznej w sposób ciągły. Niemniej, było to pierwsze tego typu podejście zaadaptowane do celów wysokoprzepustowych.

Innym, bardzo ważnym, i w mojej ocenie najbardziej interesującym kierunkiem badań realizowanym w ramach projektu doktorskiego był ten, zmierzający do zaprojektowania i optymalizacji warunków dla badania reakcji enzymatycznych oraz oddziaływania białko-ligand przy użyciu parametru, jakim jest anizotropia fluorescencji. Badaniom przy użyciu wiązki światła spolaryzowanego poddawano 3 białka wiążące nukleotydy 7-metyloguaninowe: wspomniane wcześniej DcpS, ale także eIF4E oraz cN-IIIIB. W pierwszym kroku Doktorantka dobierała sondy fluorescencyjne, co było przedsięwzięciem niezwykle pracochłonnym i trudnym nie tylko z uwagi na strukturę chemiczną barwnika, odpowiednią wydajność kwantową, czy też pożądany zakres spektralny, ale przede wszystkim jeśli chodzi o długość linkera - na tyle krótkiego by nie obniżał zbyt wartości anizotropii fluorescencji i na tyle długiego, by nie zaburzał wiązania z białkiem. Spośród 13 sond fluorescencyjnych rozważanych dla białka eIF4E do eksperymentów wysokoprzepustowych wyselekcjonowane zostały dwie. Dalsze badania polegały na poszukiwaniu ligandów silnie wiążących białko. Analogicznie, dla białka DcpS przebadano 8 barwników, z czego 4 układy sonda-białko poddawano dalszym testom kompetencyjnym, natomiast ze względu na słabe powinowactwo barwników do białka cN-IIIIB, eksperymentów dla tego układu nie kontynuowano. Bardzo obiecująco prezentują się wyniki badań analogów kapu modyfikowanych w pozycji C⁸ cząsteczki 7-metyloguanozyny lub guanozyny wykazujące przesunięcia spektralne. W tym miejscu swojej oceny chciałbym podkreślić, iż rezultatem podjętych wysiłków badawczych przez Panią mgr stała się możliwość szybszej i szerszej oceny wpływu modyfikacji analogów kapu na oddziaływanie z białkami. Moim zdaniem, z poznawczego punktu widzenia wyniki są cenne oraz interesujące. Prezentację wyników rozprawy doktorskiej Pani mgr Wojtczak dopełnia *Podsumowanie* będące treścią rozdziału IV.

W ramach rozdziału V, zatytułowanego *Część eksperymentalna*, Autorka zawarła dokładny opis procedur przeprowadzonych eksperymentów, identyfikacji i badania czystości związków chemicznych, parametrów określających powinowactwo ligandów białek, formuł odnoszących się do definicji wykorzystywanych parametrów fluorescencyjnych, czy też określających tzw. okno pomiarowe dla separacji sygnałów kontroli pozytywnej i negatywnej wraz z charakterystyką wykorzystywanej aparatury pomiarowej. Wszystkie te informacje, w moim odczuciu, pozwalają na dokładne odtworzenie doświadczeń. Jak mogłem dowiedzieć się z rozdziału poświęconemu podziękowaniom, doświadczenia te były wykonane przy współpracy wielu osób zaangażowanych w realizację projektu. Świadczy to o otwartości

Doktorantki na zawieranie współpracy naukowych mających na celu realizację postawionych sobie celów badawczych. Rozprawę zamyka zestawienie cytowanego piśmiennictwa, które umieszczono w rozdziale VI.

Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorce jedynie nieliczne poprawki:

1. Str. 19, w omawianym na tej stronie rys. 5B przedstawione są widma absorpcji trimetyloguanozyny, natomiast w tekście, na podstawie tego widma omawiana jest cząsteczka 7-metyloguanozyny. Domyślam się, że pewnie stąd wynika błędne przypisanie maksimów widm absorpcji dla ostatniej z cząsteczek, dla jej form kationowej i zwitterjonu.
2. Trzecie zdanie od góry strony 56 skorygowałbym do postaci: „Wzbudzeniu ulegają tylko te fluorofory, których kierunki dipolowego momentu przejścia są równoległe do kierunku wektora elektrycznego wiązki wzbudzającej lub tworzą z nim kąt różny od 90° .”
3. Str. 56, ostatnie zdanie od dołu strony, r (anizotropia), a nie @.
4. Str. 142, Zdanie „Przeprowadzone pomiary inhibicji z ich użyciem potwierdziły, że metoda anizotropii fluorescencji...” powinno brzmieć „Przeprowadzone pomiary inhibicji z ich użyciem potwierdziły, że metoda zmian intensywności fluorescencji...”

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji o potencjale zaprezentowanych metod fluorescencyjnych dla wysokoprzepustowego badania powinowactwa ligandów białek, ale nasuwają jednocześnie pewne pytania:

1. W badaniach wysokoprzepustowych Pani mgr używała matrycy dołków wykonanych z plastiku, a ten poddany naprężeniom (np. w procesie wytwarzania) może już sam zmieniać kierunek polaryzacji, czyniąc materiał nieużytecznym dla pomiarów anizotropii fluorescencji. Czy wpływ tego efektu był brany przez Doktorantkę pod uwagę? Jaka ewentualnie metodę zaproponowałaby Ona do wyeliminowania tego efektu?
2. Jak bardzo parametr stężenia związku hamującego aktywność enzymu w 50 % (IC_{50}) zależy od wyboru metody, którą się go wyznacza?

Mając na uwadze wartość merytoryczną i naukową badań przeprowadzonych przez mgr Wojtczak, uprzejmie wnoszę również do Rady Dyscypliny Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.

Left L. L. L. L. L.