



Toruń, 27 czerwca 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Marka Baranowskiego,
zatytułowanej "*Fluorofosforanowe analogi (oligo)nukleotydów jako
narzędzia do badań procesów biologicznych*", przedstawionej Radzie
Dyscypliny Nauki Fizyczne Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego
w Warszawie**

Rozprawa doktorska magistra Marka Baranowskiego 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. Zakres merytoryczny rozprawy obejmuje dwa ramowe zagadnienia: (1) opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej opartej o fluorofosforanowe analogi nukleotydów, oraz (2) zbadanie możliwości wykorzystania oligonukleotydów znakowanych resztą fluorofosforanową jako sond molekularnych w badaniach z wykorzystaniem techniki ^{19}F NMR. Każde z tych zagadnień wpisuje się w rozwijane obecnie kierunki badań, przy czym na szczególne podkreślenie zasługują badania przeprowadzone w części drugiej rozprawy doktorskiej, w której opisano szeroki wachlarz zastosowań fluorofosforanowych analogów nukleotydów w eksperymentach opartych o metodę ^{19}F NMR. Nie ulega wątpliwości, że są to struktury niezwykle interesujące, a ich otrzymanie na wydajnej drodze syntezy chemicznej z dużą kontrolą struktury może przyczynić się do odkrycia nowych zjawisk istotnych z naukowego i medycznego punktu widzenia. Biorąc to pod uwagę, stwierdzam, że cel naukowy postawiony przez Doktoranta w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej jest nie tylko ambitny, ale jego realizacja może skutkować otwarciem nowych eksperymentalnie obszarów w zakresie badań tworzenia się dupleksów DNA, monitorowania rozwijania struktur drugorzędowych pod wpływem zmian otoczenia, kwantyfikacji oddziaływań między kwasem nukleinowym a białkiem lub małą cząsteczkowym ligandem.

Zanim przejdę do dyskusji szczegółowej, chciałbym odnieść się do ogólnego wrażenia, które wywołuje lektura tej rozprawy doktorskiej. Jest ono niezbyt pozytywne, a na pewno jest ono mniej pozytywne niż wynikałoby to z moich - być może zbyt wygórowanych - oczekiwań, które miałem podejmując się tego – nie ukrywam – dużego wyzwania, gdyż zakres merytoryczny rozprawy nie jest do końca zbieżny z moim doświadczeniem naukowym.

Pierwszym, podstawowym i niestety nieodłącznym wrażeniem, które towarzyszyło mi podczas lektury rozprawy, był chaos strukturalny rozprawy. Uwidacznia się on już podczas lektury streszczenia, które odwraca sekwencję badań prezentowanych w sekcji Badania Własne, w zasadzie bez jakiegokolwiek konkretnego powodu. Tego rodzaju zaburzenia chronologii nie ułatwiają lektury. Drugim przykładem chaosu strukturalnego jest umieszczenie opisu techniki NMR w części Przegląd Literatury, podczas gdy jest to technika badawcza z dużym entuzjazmem i powodzeniem wykorzystywana w celu uzyskania wyników opisanych w rozprawie. Opis techniki nie jest przeglądem literatury i jako taki powinien się znaleźć w rozdziale poświęconym technikom eksperymentalnym, który zresztą w rozprawie się znajduje. Co więcej, opis istotnych elementów techniki NMR pojawia się już znacznie wcześniej, bo na stronie 75, i konia z rzędem temu, kto się rozezna w zagadnieniach dotyczących szerokości linii w widmach NMR i powiązania ich z czasami relaksacji spin-spin. Ku zaskoczeniu czytelnika, w podrozdziale 2.3 zawarty jest z kolei dokładny opis procedury eksperymentalnej związanej z syntezą dinukleotydów adeninowych zawierających ugrupowanie 5'-tiofosfoestrowe. Opis ten również powinien się znaleźć w części eksperymentalnej. Następnym przykładem chaosu strukturalnego jest wzmocniony dualizm w podawaniu odnośników literaturowych, niektóre z nich umieszczone są na dole strony, a większość znajduje się w obszernym spisie literatury na końcu rozprawy. Jest to postępowanie niezrozumiałe, a przynajmniej dla mnie mało intuicyjne. Wzmocnienie dualizmu definiuję też jako wprowadzenie trzeciego sposobu umieszczania odnośników literaturowych bezpośrednio na rysunkach, bez podania pełnych danych bibliometrycznych ani też odnośnika numerycznego do spisu literatury (przykładem Rys. 1-22). Zresztą format tego typu dziwacznych odniesień literaturowych zamieszczonych bezpośrednio na rysunkach również fluktuuje (Schemat 1-3). Podobnie oceniam zamieszczenie na stronie 109 autoreferatu, który bardziej pasuje do autobiografii niż do rozprawy doktorskiej. Jeśli wyniki opisane w tej części były przedmiotem publikacji, to powinno się to znaleźć w części Przegląd Literatury. Odnośniki do tabel znajdują się czasami więcej niż 10 stron przed właściwą tabelą, na przykład w podrozdziale 1.2.4.1, podobnie jest z niektórymi rysunkami. Ponadto, w tekście rozprawy niektóre skróty są definiowane wielokrotnie, na przykład PDE-I, a nie znajdują się one w zestawieniu użytych skrótów, choć pozostałe badane enzymy w tym zestawieniu można znaleźć. Wiele skrótów nie zostało umieszczonych w zestawieniu skrótów, co w istotny sposób utrudnia lekturę rozprawy, kilka skrótów znajdujących się w zestawieniu pojawia się w rozprawie mniej niż trzy razy (na przykład FDA), co rodzi pytanie o sensowność zamieszczenia rzadko użytego w rozprawie skrótu w zestawieniu. Niektóre skróty są stosowane w sposób dowolny, na przykład UV-Vis vs. UV/VIS, a definicja gęstości optycznej (OD) jest doprawdy kuriozalna (jednostka ilości substancji absorbującej promieniowanie UV-Vis).

W rozprawie doktorskiej występują też różne sposoby prowadzenia narracji, czasami jest to pierwsza osoba liczby pojedynczej, czasami pierwsza osoba liczby mnogiej, a czasami opis jest bezosobowy. Trudno zidentyfikować klucz, który stał za takim rozróżnieniem. Wreszcie, są w rozprawie fragmenty, w których przydałoby się wprowadzenie podziału na poszczególne paragrafy, przykładem niech będą informacje opisane na stronach 116-117 i 169-170, gdzie wiele wątków (często rozłącznych) jest opisanych w jednym akapicie. Wpływa to niestety negatywnie na płynność i przejrzystość wywodu.

Rozprawa przedstawiona przez magistra Marka Baranowskiego obejmuje ponad 280 stron (choć z drugiej strony trudno to ocenić, bo niektórych stron brakuje, na przykład nie ma stron 177 i 178), jest więc pracą obszerna, w której 100 stron zostało poświęconych na Przegląd Literatury. Jest to sekcja opisana całkiem przyzwoicie, w stopniu zadowalającym wprowadza w podstawowe zagadnienia podejmowane w rozprawie, włączając w to rolę atomu fluoru w badaniach biologicznych, syntezę związków fluorofosforanowych, sposoby monitorowania procesów biochemicznych przy użyciu fluorowanych związków, a także opis enzymów użytych w rozprawie. Ostatni podrozdział w tej części jest poświęcony opisowi techniki NMR. Poniżej zamieszczam kilka uwag, komentarzy i pytań do tej części rozprawy doktorskiej.

Strona 24 – ADME – brak definicji

Strona 26 – co to takiego jest jądro protonu?

Strona 30 – odnośniki literaturowe oznaczone kursywą, w innych miejscach jest inaczej, czasami z użyciem spacji, a czasami bez spacji

Brak wcięcia nowego akapitu – usterka powszechna

Strona 32 – „połączone są pomiędzy sobą wiązaniem”.

ATP – brak definicji

Strona 33 - NFSI – brak definicji, DAST – brak w wykazie skrótów

Strona 37 – lek antywirusowy a nie wirusowy

Strona 40 – co oznacza sformułowanie, że fluor nie jest mimikiem?

Strona 41 – a co oznacza sformułowanie, że fluor jest jądrem magnetycznym?

Strona 42 – brak opisu co to takiego jest podłoże stałe w syntezie fluorowanych kwasów nukleinowych

Strona 49 – w tekście jest 8 pm, na rysunku jest 8 ppm („zmianie tej towarzyszyła znaczna zmiana”)

Strona 53 – co to są bloki budulcowe?

Strona 56 – IM-CT, cóż to jest?

Strona 56 – brak odnośnika do artykułu w podpisie rysunku 1-26

Strona 60 – coś to takiego jest spacer?

Co to jest hiperchromiczność i jaki ma związek ze spektroskopią UV-Vis?

Strona 66 – co oznacza pojęcie: poszerzenie sygnału NMR?

Strona 69 – AMPF, ADPF, ATPF, UMPF, GTPF – jaki jest sens używania skrótów, które są niezdefiniowane?

Strona 85 – „obiektami badań niniejszej pracy”

Strona 95 – jaki jest powód stosowania w spektroskopii NMR głównie jąder o spinie $\frac{1}{2}$?

Strona 95 – chciałbym zwrócić uwagę, że słowo tabela w języku polskim się odmienia, innymi słowy, ulega deklinacji.

Strona 97 – Rys. 1-51, czy przedstawiony schemat ma zastosowanie do sytuacji, w której spin jąder atomowych wynosi $\frac{1}{2}$?

Strona 103 – które jądro atomowe składa się z otaczających elektronów?

Strona 108 – Rys. 1-60 nie jest rysunkiem

Niezwyczajnie irytująca jest znikoma dbałość Doktoranta o komfort czytelnika, związana z używaniem na rysunkach czcionek w rozmiarze mikroskopijnym (Rys. 1-25, 1-34, 2-1, i wiele wiele innych). Jeżeli jakaś informacja jest ważna i warta zamieszczenia, to powinna zostać zamieszczona w taki sposób, żeby była czytelna. Jeżeli informacji zawartej na rysunku przeczytać nie można bez użycia szkła powiększającego, to jest to informacja zbędna, a więc nie ma najmniejszego sensu zamieszczanie jej na rysunku. Różnicę obrazuje porównanie rysunków 3-7 i 3-10, zawierają one analogiczne informacje, ale w przypadku tego pierwszego czytelność jest co najwyżej umiarkowana.

Pierwsza część rozprawy doktorskiej zawierająca opis badań własnych, poświęcona jest opracowaniu wysokoprzepustowej metody nakierowanej na poszukiwanie inhibitorów enzymów hydrolizujących fluorofosforanowe analogi nukleotydów oraz zastosowaniu jej zarówno do enzymów modelowych, a także takich o znaczeniu terapeutycznym. Zaproponowana metoda opiera się na pomiarze natężenia fluorescencji sondy fluorogenicznej, selektywnej na obecność jonów fluorkowych, uwalnianych w wyniku zajścia reakcji enzymatycznej. Zaprezentowane wyniki, uzyskane dla bardzo licznej grupy związków, wskazują, że postawiony cel został z sukcesem zrealizowany. Przy pomocy zaproponowanej metody udało się określić aktywność szeregu związków, wskazać takie, które są silnymi inhibitorami enzymów zastosowanych w badaniach. Choć dyskusja uzyskanych wyników jest bardzo jakościowa, często sprowadza się ona do wymienienia dobrych i złych inhibitorów, opracowana przez Doktoranta metoda jest dużym osiągnięciem technologicznym i jak przypuszczam może zostać zastosowana do innych

pokrewnych zagadnień. Pewien niedosyt budzi (1) brak dobrze zdefiniowanej hipotezy badawczej dotyczącej wysokoprzepustowych badań przesiewowych, nie jest jasne, jakie było uzasadnienie dla przeprowadzenia eksperymentów dla ponad stu związków, jeśli opisy uzyskanych wyników opatrzone są w większości komentarzem, że są to spodziewane wyniki, a także (2) mało przejrzysta ścieżka logiczna związana z optymalizacją metody, zarówno pod kątem doboru buforów jak i innych istotnych parametrów. Przypuszczam, że tego typu badania zostały przeprowadzone, ale nie znalazły się z w rozprawie z powodu ich obszerności. Byłoby też dosyć interesujące przedstawienie możliwości implementacji tej metody do innych zagadnień. Poniżej zamieszczam kilka uwag, komentarzy i pytań do tej części rozprawy doktorskiej.

Strona 116 – Rys. 2-1: czy krzywa przedstawiona na panelu B jest krzywą eksperymentalną? Jeśli tak, to dlaczego dla zerowego stężenia czegokolwiek co jest oznaczone na osi X wartość natężenia fluorescencji jest większa od 0?

Strona 117 – wysoko przepustowej? Czy wysokoprzepustowej?

„eksperyment wysokoprzepustowy składał się z dwóch płytek”

Strona 118 – równe odstępy czasowe, czyli jakie? Po określonym czasie, czyli kiedy? Odpowiednio dobrany roztwór, czyli jaki? Albo jest to opis eksperymentu (który nie powinien się moim zdaniem tutaj znaleźć) i wówczas wymagana jest skrupulatność w opisie procedury, albo jest to mało istotny opis nie do końca wiadomo czego.

Jak dokonuje się pomiaru fluorescencji przy pomocy czytnika płytek? Co jest detektorem w tej technice?

Co oznacza „szerokie spektrum substratowe”?

Strona 119 – sformułowanie „uzyskane dane mogłyby być nieprawdziwe” jest niedopuszczalne. Dane są zawsze prawdziwe.

Strona 120/121 – Rys. 2-3D jest omawiany przed Rys. 2-3A. Jak został wyznaczony stosunek sygnału do szumu przedstawiony na Rys. 2.3C? Jaka jest granica detekcji w tym eksperymencie? I jak ją można odnieść do wartości użytecznych? Zgodnie z danymi przedstawionymi na Rys. 2-3A, eksperyment przeprowadzony w buforze HEPES nie prowadzi do liniowej zależności natężenia fluorescencji od stężenia jonów fluorkowych. Stoi to w sprzeczności z tekstem. Co więcej, dla każdego bufora natężenie fluorescencji przy zerowym stężeniu jonów fluorkowych jest niezerowe i znaczne. W jakim stopniu wpływa to na poprawność działania opracowanej metody wysokoprzepustowej? Jak zostały wyznaczone względne wartości natężeń fluorescencji? Skąd (fizycznie) wynika warunek na wielkość określoną wzorem (2.1)? W jakim stopniu wartość Z' jest zależna od stężeń reagentów?

Strona 125 – Rys. 2-5 oś X nie została opisana, na panelu D oś X opisana jest inaczej niż w przypadku poprzednich rysunków, poza tym krzywa w tym przypadku przebiega przez punkt (0,0). Dlaczego?

Strona 130 – jak należy interpretować ujemne wartości inhibicji? Skąd się biorą błędy pomiarowe w tym eksperymencie?

Strona 148 – co oznacza pojęcie „rozłączne specyficzności substratowe”?

Strona 149 – brak odnośnika do pracy dot. funkcji enzymu Fhit. Jak dokładnie został przeprowadzony eksperyment zaprezentowany na Rys. 2-12 i 2.13?

Strona 158 – 159 – opis tych pomiarów jest przesycony żargonem: analiza ilości i integracji sygnałów, widma fosforowe, w dół pola, w górę pola, atomy uległy przesunięciu. W opisie tych wyników brakuje informacji o rozdzielczości spektralnej w tym eksperymencie. W szczególności dla przejrzystości prezentacji, warto rozszerzyć skalę dla widm na Rys. 2-15.

Strona 160 – podobnie jak tabela, słowo wykres również podlega deklinacji.

Drugi temat badań własnych przeprowadzonych i opisanych w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej związany jest z zastosowaniem fluorofosforanowych analogów nukleotydów jako sond molekularnych w eksperymentach opartych o metodę ^{19}F NMR. Pierwsza część tych eksperymentów polegała na syntezie fluorofosforanowych analogów nukleotydów, Doktorant uzyskał 18 struktur różniących się długością łańcucha oraz sekwencją. Następnie sondy te zostały wykorzystane do badań oddziaływań z DNA, z białkami, ligandami. Poniżej zamieszczam kilka uwag, komentarzy i pytań do tej części rozprawy doktorskiej.

Strona 171 – rysunek jest nieczytelny

Strona 172 – rysunek jest nieczytelny

Strona 173 – czym się różni potwierdzenie od ostatecznego potwierdzenia?

Strona 175 – co opisuje parametr delta?

Strona 180 – jeśli dane eksperymentalne są równe z dokładnością do błędu pomiarowego, dyskusja różnic między nimi pozbawiona jest sensu, komentarz dotyczy wartości T_m

Strona 188 – jak dokładnie przebiega pomiar, którego wynik przedstawiony został na Rys. 3-8? Dlaczego wyniki przedstawione na tym rysunku różnią się wartością błędu?

Strona 190 – jaka jest rozdzielczość spektralna dla danych przedstawionych na Rys. 3-10? Osiąga ona poziom 0.0001 ppm?

Wyniki badań własnych przeprowadzonych przez magistra Marka Baranowskiego stanowią znaczącą część rozprawy doktorskiej. Wyrażam przypuszczenie, że w zasadzie

materiał doświadczalny zebrany w rozprawie wystarczyłby na dwa, a może nawet i więcej doktoratów. A zadaniem doktoranta jest przygotowanie i napisanie jednej i tylko jednej rozprawy doktorskiej. Wyrażam drugie przypuszczenie, że gdyby Doktorant okroił nieco zakres merytoryczny, opisując nieco bardziej szczegółowo wybrane aspekty przeprowadzonych przez siebie badań, ta rozprawa doktorska byłaby znacznie lepsza, a przedstawione eksperymenty byłyby opisane w przejrzysty sposób, podobnie jak ich interpretacja.

Wartość naukową wyników włączonych do rozprawy oceniam wysoko, zwłaszcza w zakresie obejmującym zastosowanie fluorofosforanowych analogów nukleotydów jako sond molekularnych w badaniach NMR. Ocena ta jest dodatkowo podkreślona poprzez dorobek publikacyjny Doktoranta, obejmujący publikacje w wiodących czasopismach z dziedziny, takich jak *Nucleic Acids Research*, *Journal of Organic Chemistry*, czy *Organic and Biomolecular Chemistry*. W trzech pracach związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej magister Marek Baranowski jest pierwszym autorem, a kolejne publikacje są w przygotowaniu. Doktorant jest też współautorem kilku prac powstałych w grupie prof. dr. hab. Jacka Jemielitego, a także dwóch zgłoszeń patentowych.

Rozprawa doktorska przygotowana przez magistra Marka Baranowskiego jest dziełem solidnym, dowodzącym, że Doktorant świetnie orientuje się w tematyce badawczej, a także bardzo dobrze sobie radzi z warsztatem doświadczalnym, zarówno dotyczącym syntezy modyfikowanych nukleotydów jak i prowadzeniem eksperymentów spektroskopowych. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach chemicznych. Podsumowując, nie rodzi najmniejszej wątpliwości stwierdzenie, że magister Marek Baranowski jest dojrzałym naukowcem, który podjął się rozwiązania ważkiego problemu naukowego i projekt ten zakończył sukcesem. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa, zatytułowana „*Fluorofosforanowe analogi (oligo)nukleotydów jako narzędzia do badań procesów biologicznych*”, spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie magistra Marka Baranowskiego do dalszych etapów procedury doktorskiej.



Sebastian Mackowski