



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 25 października 2023 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Olgi Perzanowskiej
pt. „Synteza i biofizyczna charakterystyka modyfikowanych fragmentów ogona
poli(A) jako narzędzi do manipulowania metabolizmem mRNA”**

Niezwyczajnie dynamiczna odpowiedź środowiska naukowego na zapotrzebowanie na szczepionkę przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, zapotrzebowanie i oczekiwanie podszyte grozą i lękiem o życie nas oraz najbliższych, uświadomiło nam jak potężne narzędzie w rękach naukowców stanowi wiedza dotycząca manipulowania mRNA. Choć mniej spektakularne w odbiorze medialnym, jednakże porównywalne znaczenie wydaje się mieć wiedza w obszarze aktywności międzynarodowego środowiska naukowego ukierunkowanej na zastosowania inżynierii kwasów nukleinowych w terapiach genowych, produkcji terapeutycznych przeciwciał oraz szczepionek przeciwnowotworowych. Tematyka pracy doktorskiej pani mgr Olgi Perzanowskiej wpisuje się centralnie w ten właśnie obszar badań naukowych co czyni ją, moim zdaniem, nie tylko wysoce interesującą i aktualną ale również bardzo ważną.

Praca doktorska wykonana została w Centrum Nowych Technologii oraz w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego, pod kolektywnym kierownictwem pana prof. dr. hab. Jacka Jemielitego oraz pani dr hab. Joanny Kowalskiej. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 192. Str. standardowego maszynopisu, w oparciu o logiczną i przejrzystą strukturę. Po spisie treści oraz wykazie skrótów i oznaczeń stosowanych w tekście rozprawy, Doktorantka zestawiała swój dorobek naukowy, na który składają się trzy opublikowane już artykuły, jedna praca w przygotowaniu oraz wiele wystąpień konferencyjnych. Ranga tych publikacji oraz jakość pozostałego dorobku w pełni rezonuje z jakością samej pracy doktorskiej oraz wysokimi walorami naukowymi wyników uzyskanych w trakcie realizacji projektu doktorskiego, które zapowiedziane są bezpośrednio w „Streszczeniu” i wyłaniają się stopniowo czytelnikowi w trakcie lektury rozprawy. Lekturę tę otwiera krótki, jednostronicowy rozdział I. pt. „Cel pracy”, w ramach którego sformułowane zostały cele strategiczne oraz szczegółowe projektu doktorskiego. W ramach tego rozdziału Doktorantka zawarła również krótki przewodnik po układzie, który stał się osnową redakcyjną dalszej części rozprawy. Rozdział II. pt. „Część literaturowa” opracowany został na zasadzie przeglądu literaturowego wprowadzającego czytelnika w tematykę badawczą dotyczącą między innymi, kwasów nukleinowych (w szczególności mRNA) oraz procesu translacji, ze szczególnym naciskiem na mechanizmy regulacyjne. Ważnym obszarem rozdziału II. jest, w moim odbiorze, podrozdział 3. poświęcony zastosowaniom medycznym oligonukleotydów oraz podrozdział 4. poświęcony omówieniu potencjału terapeutycznego cząsteczki mRNA. Klarowność, z jaką zredagowane zostały te treści, bardzo pomysłowe i estetyczne grafiki oraz odniesienia do najbardziej aktualnych pozycji literaturowych czynią te treści, w moim odczuciu, doskonałym materiałem źródłowym oraz dydaktycznym, który może być polecany studentom oraz adeptom nauki. W ramach rozdziału II. Autorka przedstawiła również podstawy teoretyczne oraz założenia metodologiczne stosowanej przez siebie w pracy doktorskiej techniki termoforezy mikroskalowej. Ten zabieg formalny odbieram również jako bardzo cenny,

uwzględniając fakt, iż technika ta jest, jak dotąd, stosunkowo rzadko stosowana a posiada znaczny potencjał i perspektywy aplikacyjne. Najważniejszym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej wyjątkowo wysokiej wartości naukowej jest, w moim odbiorze, rozdział III. pt. „Badania własne”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą sekwencję poszczególnych zadań badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego. Układ pracy, w ramach którego uzyskiwane wyniki częściowe poszczególnych zadań stanowią punkt wyjścia do realizacji kolejnych, czyni lekturę rozprawy doktorskiej nie tylko interesującą ale, co więcej, wciągającą. Dobitny przykład na tego typu konstrukcję rozprawy oraz, przede wszystkim samego projektu doktorskiego stanowi fakt, iż zakończone sukcesem projektowanie oraz synteza wyznakowanych fluorescencyjnie sond molekularnych umożliwiło prowadzone na dalszych etapach badania powinowactwa modyfikowanych ligandów do białka PABP. Bardzo ważnym etapem realizacji projektu doktorskiego było również, w moim odczuciu, zbadanie wpływu wyselekcjonowanych modyfikacji strukturalnych ogona poli(A) na końcu 3' mRNA na stabilność enzymatyczną oraz potencjał translacyjny tej cząsteczki. Wyniki tych właśnie badań przekładają się bezpośrednio na znaczący postęp w manipulowaniu metabolizmem mRNA, tak istotnym z punktu widzenia aplikacji medycznych. Z mojej perspektywy, wśród wielu bardzo cennych osiągnięć pracy doktorskiej pani mgr Olgi Perzanowskiej wyróżnić można następujące:

1. Opracowanie metod syntezy analogów ogona poli(A) znakowanych fluorescencyjnie.
2. Opracowanie metody analizy oddziaływania fragmentów poli(A) cząsteczek mRNA z aktywną częścią enzymu PABP, opierającej się na termoforezie mikroskalowej.
3. Zbadanie stabilności enzymatycznej szeregu analogów poli(A).
4. Zaprojektowanie szeregu modyfikacji mRNA wpływających na stabilność oraz potencjał translacyjny cząsteczki kwasu nukleinowego oraz badania ekspresji modyfikowanych mRNA w układach komórkowych.

W koncepcji Doktorantki, informacje dotyczące stosowanych odczynników oraz szczegóły procedur eksperymentalnych, w tym tajników syntezy organicznej, zawarte zostały w ramach końcowego rozdziału V. pt. „Część eksperymentalna”. Poziom szczegółowości tych opisów robi wrażenie i, w mojej opinii, w pełni dorównuje najwyższym standardom prac eksperymentalnych. Rozprawę zamyka zestawienie 406 pozycji cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału VI. pt. „Bibliografia”.

Rozprawa doktorska pani mgr Olgi Perzanowskiej jest również opracowaniem wyróżniającym się pod względem staranności i precyzji języka, edycji tekstu oraz wysokiej jakości grafik. Mógłbym zaproponować Autorce dosłownie pojedyncze korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 83., 14. wiersz od góry: zamiast „transferze energii rezonansowej” proponuję „rezonansowym transferze energii”
2. Str. 85, str. 104 oraz inne: proponuję stosować „intensywność fluorescencji” zamiast „fluorescencji”, w myśl zasady wielkość fizyczna nie zaś samo zjawisko
3. Str. 150, 9. Wiersz od góry „przeze mnie” zamiast „przede mnie”.

Tak wieloaspektowe, obszerne i cenne opracowanie, jakim jest w mojej opinii praca doktorska pani mgr Olgi Perzanowskiej, przynosi wiele cennych informacji oraz ożywia naszą ciekawość poznawczą. Wyrazem tego może być następujące pytanie. Bardzo podoba mi się sposób w jaki w ramach pracy doktorskiej uniknięto wpływu cząsteczek fluoroforów na zmiany strukturalne zarówno białka jak i ligandu, mogące wpływać na specyfikę oraz kinetykę reakcji. Ciekaw jestem czym kierowała się Doktorantka w wyborze czterech testowanych pierwotnie sond fluorescencyjnych, spośród setek dostępnych w laboratoriach spektroskopistów? Ciekaw jestem również czy zastosowanie najmniejszych cząsteczek fluoroforów (np. BDP-FL bądź mniejszych) dołączonych do ligandów mogłoby umożliwić bezpośrednie oraz niezaburzone analizy kinetyki i wydajności reakcji wiązania ze środowiskiem białkowym, na przykład na podstawie analizy czasów życia fluorescencji?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Olga Perzanowska przedstawiła bardzo obszerną i wartościową rozprawę doktorską opartą na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz przeprowadzonych z wyjątkową starannością prac koncepcyjnych oraz eksperymentalnych. Prac wymagających ogromnego doświadczenia w zakresie syntezy organicznej, biochemii i biofizyki kwasów nukleinowych oraz w prowadzeniu badań w oparciu o nowoczesne techniki spektroskopii molekularnej i biofizyki białek.

Obszerna część wyników oryginalnych badań naukowych stanowiących podstawę projektu doktorskiego opublikowana została w ramach artykułów w renomowanych czasopismach specjalistycznych (jak *Nature Chemistry*). Doktorantka doskonaliła również swój warsztat naukowy w ramach innych projektów badawczych, które zaowocowały współautorstwem w szeregu artykułów oraz doniesieniach konferencyjnych.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Olgę Perzanowską rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w przepisach ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie pani mgr Olgi Perzanowskiej do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.

Bardzo wysoki poziom naukowy rozprawy, znaczna ilość oryginalnych wyników oraz ich bezpośredni potencjał aplikacyjny pozwalają mi sądzić o tej pracy doktorskiej jako o wyróżniającej. W związku z tym, wnoszę również o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej pracy doktorskiej jako wyróżniającej.

