

Lublin, 29 marca 2019 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Warmińskiego

pt. „Projektowanie i synteza narzędzi molekularnych do badań struktury i funkcji końca 5' mRNA (kapu) oraz badanie ich kompleksów z białkami metodą krystalografii rentgenowskiej”

Fakt, że tematyka analizowanej rozprawy doktorskiej dotyczy bezpośrednio relacji struktury i funkcji biologicznych mRNA, czyni ją już interesującą z punktu widzenia postępu nauk o życiu. Tym bardziej, iż zastosowane podejścia, zarówno w obszarze nowoczesnej chemii organicznej, związanej z syntezą analogów 5' końca mRNA (tzw. kapu) jak i współczesnej biologii strukturalnej, związane z oddziaływaniem modyfikowanych nukleotydów z białkami, pozwoliły na stawianie wyzwań poznawczych na bardzo wysokim poziomie precyzji. Dodać należy, iż wyniki oczekiwane w tego typu badaniach posiadają wysoki potencjał w aspekcie terapeutycznym wielu schorzeń, na przykład na drodze opracowywania odpowiednich aktywatorów bądź inhibitorów procesów fizjologicznych zależnych od kapu. W świetle powyższego, moim zdaniem, praca doktorska przedstawiona przez pana mgr. Marcina Warmińskiego jawi się nie tylko interesująca ale również bardzo ważna.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem prof. Jacka Jemielitego, w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Eksperymentalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Rozprawa mgr. Marcina Warmińskiego przedstawiona została w formie 228-stronicowej książeczki, którą, zarówno w aspekcie zawartości merytorycznej jak i poziomu edytorskiego oceniam wyjątkowo wysoko. Po spisie treści oraz wykazie skrótów Autor zamieszcza krótki rozdział 1., zatytułowany „Cele projektu i koncepcja pracy”, wprowadzający zwięźle w tematykę projektu doktorskiego. W ramach tego rozdziału wyspecyfikowane zostały również dane bibliograficzne licznych publikacji, które ukazały się ze współautorstwem doktoranta, zarówno tych związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy jak i tych raportujących badania, w których doskonalił on swój warsztat badawczy. W ramach rozdziału 2. rozprawy zaprezentowany został przegląd literaturowy najbardziej aktualnych pozycji piśmiennictwa, dotyczących aspektów strukturalnych oraz biologicznych kapu jak i problemów związanych bezpośrednio z syntezą i zastosowaniami jego analogów. W moim odczuciu, treści zawarte w ramach tego rozdziału zaprezentowane zostały w sposób na tyle przystępny a zarazem wieloaspektowy, iż stanowią doskonałe monograficzne opracowanie dotyczące problematyki 5' końca mRNA, które rekomendowane być może jako cenna lektura nie tylko młodym adeptom nauki ale również szerokiemu gronu przyrodników zainteresowanych tematyką tzw. kapu. Kolejny rozdział, zatytułowany „Metodyka badań”, zawiera pogłębione wprowadzenie w problematykę związaną z syntezą chemiczną analogów kapu, syntezą oligonukleotydów na podłożu stałym oraz, jako podrozdział 3.3, w tematykę związaną z doborem oraz charakterystyką metod biofizycznych wykorzystywanych w ramach realizacji zadań badawczych projektu doktorskiego. W tym miejscu swojej oceny chciałbym dać wyraz ogromnemu wrażeniu jakie wywarła na mnie biegłość Doktoranta w stosowaniu zaawansowanych procedur syntezy organicznej, w znacznej mierze opierających się na modnym i eleganckim podejściu nazywanym czasami „click chemistry”. Wart podkreślenia jest również bogaty warsztat metodologiczny, opierający się o techniki badawcze stosowane w ramach realizacji projektu doktorskiego, włączając spektroskopię NMR, termoforezę mikroskalową, wysokorozdzielczą spektroskopię masową, spektroskopię fluorescencyjną oraz inne. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej wyjątkowo wysokim poziomie merytorycznym, jest moim zdaniem rozdział 4. pt. „Badania własne”, w ramach którego



zaprezentowane zostały wyniki eksperymentalne uzyskane w ramach projektu doktorskiego. Podstruktura tego rozdziału odpowiada poszczególnym zadaniom badawczym, początkowo ukierunkowanym na syntezę analogów kapu i nukleotydów, ważnych z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych oraz badawczych, w drugiej zaś części zogniskowanym na badaniach strukturalnych kompleksów analogów kapu z białkami. Dobór białek poddanych próbom krystalizacji w obecności wielu analogów kapu a następnie analizowanych w oparciu o krystalografię rentgenowską, podyktowany został ich fizjologicznym znaczeniem. Badaniom poddane zostało białko eIF4E, funkcjonujące jako czynnik inicjujący translację, oraz enzymy hydrolityczne DcpS oraz Dcp2. Prezentację wyników zamyka krótki rozdział 5. pt. „Podsumowanie”, po którym zamieszczone zostały jeszcze, wyjątkowo szczegółowe opisy procedur i parametrów eksperymentalnych (jako rozdział 6. pt. „Część eksperymentalna”) oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa (w ramach rozdziału 7. pt. „Literatura”).

W pełni podzielam zdanie Doktoranta w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach podsumowania. Z jednej strony, opracowane zostały ścieżki syntezy precyzyjnie zaprojektowanych analogów 5' końca nRNA, istotnych z punktu widzenia przyszłych badań jak i bezpośredniego zastosowania w produkcji szczepionek oraz terapii genetycznych. Z drugiej strony, uzyskane wyniki odkrywają szczegółowe mechanizmy molekularne, oddziaływania kapu z istotnymi z fizjologicznego punktu widzenia białkami, umożliwiając projektowanie specyficznych inhibitorów oraz aktywatorów procesów zachodzących przy udziale badanych białek. Osobiście, bardzo podoba mi się również wieloaspektowość w procesie projektowania badań oraz analizy wyników związanych z syntezą specyficznych znaczników fluorescencyjnych na bazie modyfikacji kapu fluorofortami fluoresceiny oraz cyjaniny. Jak pokazują to wyniki zawarte w rozprawie, znaczniki te umożliwiają precyzyjną lokalizację sfunkcjonalizowanego mRNA w żywych komórkach. Ciekaw jestem, czy udało by się wycechować, na przykład w oparciu o technikę analizy czasów zaniku fluorescencji, metodę różnicowania znaczników oddziałujących z różnymi środowiskami: na przykład pozostających w cytoplazmie versus związanych ze środowiskiem białkowym?



Na podkreślenie zasługuje bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy. Zamieszczone w rozprawie grafiki są, w moim odczuciu, nie tylko perfekcyjnie wykonane ale również doskonale zaprojektowane, z dbałością o przejrzystość oraz przekaz merytoryczny. Rozprawa napisana została bardzo ładnym, precyzyjnym językiem. Mógłbym zaproponować Autorowi dosłownie kilka drobnych korekt. Oto ich krótka lista:

1. Str. 34., 7. wiersz od góry: „proponuję „Tabeli 1.” w miejsce „Tabela 1.”,
2. Str. 43, 16. wiersz od góry: „w większości przypadków” zamiast „w większości przypadku”,
3. Str. 90., 19. wiersz od góry: „z widma” zamiast „w widma”,
4. Str. 138., 14. wiersz od góry: „proponuję „w Tabeli 6.” w miejsce „w Tabela 6.”,
5. Str. 172., 15. wiersz od góry: „z uzyskanych” zamiast „z uzyskane”.

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż mgr Marcin Warmiński przedstawił ogromnie wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Badania te wymagały doskonałego przygotowania w zakresie syntezy organicznej, biologii strukturalnej jak i spektroskopii molekularnej. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w serii 7. artykułów naukowych, opublikowanych w specjalistycznych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, włączając w to renomowane *Journal of American Chemical Society*, *Angewandte Chemie* oraz *Nucleic Acid Research*. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Marcina Warmińskiego spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Co więcej, w moim odczuciu, zarówno wielość jak i ranga naukowa uzyskanych rezultatów, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Marcina Warmińskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Stawiam również wniosek o uznanie rozprawy doktorskiej jako wyróżniającą.