



Wrocław, 12.04.2019

Recenzja 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”

Praca doktorska Pana mgr Marcina Warmińskiego została wykonana pod kierunkiem dr hab. prof. U.W. Jacka Jemielitego w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Tematem rozprawy było opracowanie narzędzi molekularnych do badania procesów biologicznych, w które zaangażowany jest koniec 5' mRNA oraz ich wykorzystanie do badań strukturalnych nad wybranymi procesami komórkowymi, co stanowi kontynuację wieloletnich badań profesora Jemielitego w tym temacie. Poznanie zarówno struktur kompleksów z nowymi analogami kapu oraz mechanizmów działania białek zależnych od kapu jest istotne i atrakcyjne naukowo, co czyni recenzowaną pracę wartościową.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 228 stron i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej cel projektu i koncepcję pracy, wstęp będący przeglądem literaturowym, metodykę badań, rezultaty nazwane „badaniami własnymi”, podsumowanie, część eksperymentalną oraz cytowaną literaturę. Do pracy nie jest dołączone streszczenie, ale domyślam się, że było ono zbędne przy wyborze jakże estetycznej formy pracy doktorskiej, a mianowicie wydania książkowego. Spis literaturowy obejmuje aż 226 pozycji opublikowanych głównie w ostatnim dwudziestoleciu. Rozprawa zawiera również wykaz używanych skrótów, niezwykle pomocny przy czytaniu

recenzowanej pracy ze względu na ilość związków chemicznych, grup funkcyjnych oraz metod badawczych stosowanych lub cytowanych itp.

Wstęp pracy liczy 44 strony i opisuje budowę chemiczną oraz właściwości chemiczne końca 5' mRNA (kapu). Autor zwięźle przedstawia tu biosyntezę kapu, jego rodzaje oraz modyfikacje powstające w jądrze komórkowych i cytoplazmie, dojrzewanie i degradację mRNA, inicjację translacji, mechanizmy rozpoznawania kapu i wreszcie strategie terapeutyczne oparte na procesach zależnych od kapu. Obszerna część wstępu stanowi opis właściwości i zastosowania chemiczne modyfikowanych analogów kapu, gdzie Doktorant krok po kroku przedstawia opisane dotychczas strategię modyfikacji kapu, stereochemię mostka 5',5'-trifosforanowego, analogi kapu stosowane jako inhibitory enzymów degradujących kap, inhibitory translacji oraz funkcjonalizację kapu jako narzędzia do znakowania mRNA. W ostatniej części wprowadzenia zostały opisane reakcje *click* stosowane w chemii nukleo- i oligonukleotydów oraz opis analogów użytych w badaniach strukturalnych. Wstęp pracy dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy choć naszpikowany jest ogromną ilością informacji, które można było przedstawić nieco syntetycznej. Nie umniejsza to jednak pracy, a stanowi dowód ogromnej wiedzy Doktoranta i jego swobody w poruszaniu się w niełatwej, międzyobszarowej tematyce badawczej.

Kolejna część rozprawy to metodyka badań, która nie jest częścią eksperymentalną pracy a raczej przybliżeniem wiedzy na temat syntezy chemicznej analogów kapu z uwzględnieniem wszystkich istotnych etapów. Według mnie ta część pracy mogła z powodzeniem znaleźć się we wstępie pracy, co mogłoby ostatecznie wpłynąć na jej rozmiar. Paragraf ten zawiera również krótki opis metod badawczych stosowanych w trakcie realizacji projektu, tj. rentgenografia strukturalna kompleksów białko-ligand, spektroskopia NMR oraz termoforeza mikroskalowa. W opisie zabrakło krótkiego choć opisu metody FQT stosowanej przy badaniu zaniku fluorescencji, którą to Doktorant obok termoforezy, stosował w badaniu oddziaływania analogów kapu z białkami.

Recenzowana praca nie posiada typowo zdefiniowanego dla rozpraw doktorskich rozdziału *cel pracy*. Nie oznacza to jednak, że nie został on precyzyjnie zdefiniowany na samym początku rozprawy, a ciekawą jego kontynuacją są paragrafy zatytułowane „Motywacja i obiekty badań” oraz „Plan badań” rozpoczynające opis badań własnych. W rozdziałach tych Autor szczegółowo przedstawił założenie projektu mające na celu,

z jednej strony: uzyskanie informacji strukturalnych i mechanistycznych na temat oddziaływania nowych jak i uprzednio zsyntezowanych analogów kapu ze specyficznymi białkami, z drugiej natomiast stworzenie pewnych narzędzi molekularnych do eksploracji tychże badań strukturalnych a także funkcji końca 5' mRNA.

Pierwszą i jakże istotną częścią badań Doktoranta było zaprojektowanie i synteza chemiczna nowych analogów 5' mRNA. Autor uzyskał zarówno naturalne analogi kapu jak i zawierające: 6-metyloadenozyne, modyfikację metylenobisfosfonianową w pozycji α i β , modyfikację tiofosforanową w pozycji β oraz w wiązaniu fosfodiesterowym. Następnie Autor dokonał funkcjonalizacji uzyskanych analogów kapu oraz oligorybonukleotydów z zastosowaniem wysoce selektywnej cykloaddycji azydkowo-alkinowej. W tym celu Doktorant uzyskał szereg analogów kapu sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem propargilowym, otrzymał jodki i azydki oligorybonukleotydów, fragmenty RNA sfunkcjonalizowane ugrupowaniem alkinowym po to by przeprowadzić wspomnianą cykloaddycję mającą na celu uzyskanie oligonukleotydowych analogów kapu. Doktorant cykloaddycję azydkowo-alkinową zastosował również do znakowania fluorescencyjnego kapu zawierającego dwa lub trzy nukleotydy.

Najbardziej biochemiczną i biofizyczną część badań mgra Warmińskiego stanowi opis właściwości biologicznych uzyskanych przez Niego analogów kapu t.j.: powinowactwa do czynnika inicjującego translację 4E (eIF4E), wydajności wbudowywania do mRNA w reakcji transkrypcji *in vitro* oraz podatności na hydrolizę enzymatyczną. Przydatność fluorescencyjnych analogów kapu zweryfikowano poprzez kotranskrypcyjne i postranskrypcyjne znakowanie mRNA, zarówno w próbówce jak i bardziej złożonym środowisku, jakim były ekstrakty komórkowe. Doktorant w opisie modyfikacji wskazuje na niezwykle niskie wydajności koniugacji, które wraz z postępem prac były optymalizowane. Opis ten jest jednak nieco niejasny, dlatego proszę Doktoranta by podczas swojej prezentacji mógł zwrócić uwagę na ten aspekt. Bardzo ciekawym etapem prac było sprawdzenie przydatności znakowanych transkryptów w obrębie kapu do badania naturalnych procesów, w które zaangażowane jest mRNA w liniach komórkowych HeLa. W tym celu, komórki poddane transfekcji mRNA kodującym lucyferazę, poddano wizualizacji i określono cytozolową lokalizację białka. Przedstawione zdjęcia w rozprawie są nieco słabe, lecz poza lokalizacją cytozolową, da się równie zauważyć bardziej specyficzną, kompartmentową lokalizację fluorescencyjnych

koniugatów. Tu proszę Doktoranta o komentarz. Mam również pytanie dotyczące badania wydajności translacji w tych komórkach, które były badane po lizie komórkowej metodą enzymatyczną kierowaną względem aktywności lucyferazy robaczka świętojańskiego. Metoda ta jest metodą pośrednią w określaniu stężeń białek w ekstraktach, do czego częściej stosowane są metody immunoprecypitacyjne lub chromatograficzne. Czy były stosowane metody bezpośredniego pomiaru stężeń, czy tylko ograniczono się do pomiarów enzymatycznych? Jeśli to drugie, to jakie były stosowane kontrole w celu precyzyjnego określenia/oszacowania wydajności biosyntezy białka?

W opisie badań Doktoranta szczególnie ciekawe jest zastosowanie analogów kapu z grupą azydkową w celach transfekcyjnych mRNA. Tak stransfekowane komórki HeLa były następnie inkubowane pochodną dibenzocyklooktanową sprzężoną z cyjaniną 5 w celu ominięcia konieczności stosowania katalizatorów miedziowych i możliwości zastosowań komórkowych. Postęp koniugacji azydkowo-alkinowej w komórkach prowadzono w sposób mikroskopowy. Mimo odpłukania nadmiarowego substratu mam wątpliwości co do detekcji postępu reakcji w komórce. Jak rozróżniano fluorescencję pochodzącą od skoniugowanego mRNA od nieprzereagowanego substratu cyjanowego?

Równie ciekawy i przeprowadzony w bardzo rzetelny sposób, jest opis pomiarów powinowactwa uzyskanych analogów kapu z białkiem Eif4E. W celu szerszego podejścia do tematu Doktorant zastosował aż trzy metody biofizyczne, prowadzące do uzyskania stałej K_d , tj.: metodę fluorymetryczną FQT, izotermalną kalorymetrię ITC oraz termoforezę mikroskalową. Tabela 6 prezentuje uzyskane wyniki, które w zależności od analogów i metody badawczej są mniej lub bardziej zbieżne. Z treści rozprawy widać, że Doktorant skłonny jest zaufać danym uzyskanym metodą FQT i MST mimo, że wartości K_d różnią się dla tych metod najwyraźniej. Najbardziej zbieżne są jednak wyniki uzyskane metodą FQT i ITC i nie jest dla mnie jasny wybór odrzucenia metody ITC. Metoda ta w wydaniu Doktoranta, miała służyć jedynie wyznaczeniu stałej powinowactwa a nie wszystkich parametrów termodynamicznych, a sama w sobie bardzo dobrze oddaje proces oddziaływania białko-ligand. W pracy brak jest jednak choć jednego termogramu ITC, więc trudno mi jednoznacznie podejść do opisywanych rezultatów i ich dyskusji. Proszę zatem Doktoranta by podczas prezentacji mógł przedstawić przykładowe termogramy i ustosunkować się do ufności poszczególnych metod w wyznaczaniu stałych K_d analogów kapu i białka Eif4E.

Ostatnia część badań stanowiąca kwintesencję realizowanego projektu dotyczy krystalizacji, rozwiązywania struktur i opisu uzyskanych struktur pod kątem dotychczasowej wiedzy oraz mechanizmów działania białek zależnych od kapu. Na wstępie Doktorant w bardzo przejrzysty sposób podszedł do problemu wyboru analogów kapu do krystalizacji. Z lektury pracy widać, co zresztą podkreśla sam Autor, proces charakterystyki strukturalnej i wyboru poszczególnych analogów był iteracyjny. Aby podkreślić wysiłek prowadzonych badań wystarczy wspomnieć, że poddano krystalizacji aż 50 kompleksów białko-ligand, czego rezultatem było uzyskanie kryształów dla 27 z nich. Ostatecznie 20 z nich dawało zadowalającą dyfrakcję prowadzącą do rozwiązania struktur krystalicznych. Opis rezultatów połączony z obszerną dyskusją bazuje zarówno na uzyskanych wynikach jak i wcześniej przeprowadzonych badaniach. Autor stara się bardzo skrupulatnie na podstawie ułożenia analogów kapu w kieszeni białka wyjaśnić jak dany element strukturalny, czy modyfikacja kapu wpływa na powinowactwo kompleksu białko-ligand i jego funkcję. Mój komentarz do przeprowadzonych badań i mechanistycznego opisu działania enzymu dotyczy tego, że pełen obraz działania można uzyskać nie tylko manipulując niskocząsteczkowym ligandem, a także samym białkiem. Zastosowanie pewnych mutacji reszt aminokwasowych zaangażowanych w rozpoznawanie lub stabilizację analogów kapu mogłoby zdecydowanie rzucić więcej światła na badany mechanizm funkcjonowania białek, a także pomóc w planowaniu przyszłych analogów. Nie mniej jednak przeprowadzone badania i uzyskane rezultaty są imponujące. Na moje szczególne uznanie zasługuje odkrycie dotyczące różnicy w oddziaływaniu diastereoizomerów. Z opisu przeprowadzonych badań widać dobrze, że mimo licznych niepowodzeń Doktorant uzyskał struktury oraz odpowiednie rozdzielczości by móc zaproponować właściwy mechanizm.

Rozprawa doktorska pana mgra Marcina Warmińskiego nie posiada osobnego rozdziału dotyczącego dyskusji. Obszerna dyskusja wyników została przeprowadzona w części rezultatowej i myślę, że rozdzielenie dyskusji od rezultatów mogło doprowadzić do zwiększania i tak bogatej w treść rozprawy. Najważniejsze konkluzje i rezultaty zostały bardzo przystępnie opisane w rozdziale pt. „Podsumowanie”. Rozprawę wieńczy część eksperymentalna, gdzie Autor syntetycznie zawarł głównie informacje związane z syntezą chemiczną i charakterystyką strukturalną.

Nie mam zasadniczych zastrzeżeń do recenzowanej rozprawy. Pracę czyta się dobrze mimo, że opisuje ona niełatwe w realizacji i prezentacji badania chemiczne, biochemiczne i strukturalne. Praca zdecydowanie mogłaby być krótsza, gdyż miejscami Autor z wielką skrupulatnością opisuje wyniki jak i podstawy teoretyczne, w innych miejscach natomiast powtarza się. Wiem z własnego doświadczenia, że nie łatwo jest rozstać się ze wszystkimi wynikami oraz opisać i przedyskutować rezultaty zbyt powierzchownie, niemniej jednak krótszą rozprawę czyta i recenzuje się łatwiej. Z drugiej strony, dzięki licznym informacjom, praca zyskuje i staje się przydatniejsza dla szerszego grona czytelników. Sam znalazłem w niej szereg przydatnych mi informacji za co oczywiście dziękuję Doktorantowi. Z lektury rozprawy widać, że Autor poświęcił ogrom pracy w realizację założonego celu, wykorzystując szereg strategii chemicznych, metod strukturalnych i biochemicznych. Cała rozprawa napisana jest bardzo poprawnym językiem. Znalazłem w niej nieliczne błędy interpunkcyjne, językowe i tylko jeden drobny błąd ortograficzny (strona 38). W pracy znajduje się również kilka drobnych błędów rzeczowych (np. w Rycinie 114 czy na stronie 144). Na szczególną uwagę i podziw zasługuje 139 rycin oraz niepoliczalna wręcz ilość schematów reakcji. Wszystkie one wykonane są z wielką starannością.

Z obowiązku recenzenta chciałbym aby Doktorant poza wyżej wymienionymi uwagami ustosunkował się do następujących zagadnień stanowiących raczej ciekawość recenzenta:

- 1) Dlaczego analogi boranowe kapu są hydrolizowane przez białko DcpS podczas, gdy inne nie?
- 2) Jakie należy poczynić kroki by móc efektywnie przebadać enzym DcpS?
- 3) W Tabeli 7 przedstawione są wartości stałych dysocjacji kompleksów eIF4E z analogami tetrafosforanowymi kapu. Dlaczego analog zawierający atom tlenu pomiędzy parami reszt fosforanowych charakteryzuje się najmniejszą wartością K_d ?
- 4) Czy zastosowanie metody HDX MS pomogłoby w analizie mechanizmów reakcji białko-ligand oraz przy optymalizacji reakcji syntezy transkryptów z kapem (patrz Rycina 94)?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Marcina Warmińskiego spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autora jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy

naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pana mgra Marcina Warmińskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę fakt, że praca Doktoranta stanowi ważny wkład w zrozumienie mechanizmów działania białek zależnych od kapu oraz to, że wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały opublikowane w siedmiu artykułach w liczących się czasopismach, z czego w czterech Doktorant jest pierwszym współautorem, wnoszę do Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana mgra Marcina Warmińskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

