

Wrocław, 18 kwietnia 2021



Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Marcin Drąg
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Renaty Kasprzyk

z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego

pt. „Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5' mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych”

Badania kwasów nukleinowych w aspekcie ich przydatności w nowych terapiach leczniczych w ostatnim czasie jest mocno eksplorowane zarówno w placówkach akademickich jak również w przemyśle. Dobitym przykładem użyteczności jest zastosowanie w ostatnim czasie technologii mRNA do stworzenia szczepionki przeciw COVID-19. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Renaty Kasprzyk doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, w szczególności w aspekcie badań nad zastosowaniem interdyscyplinarnych metod badawczych w poszukiwaniu optymalnych molekuł chemicznych. Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Jacka Jemielitego z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, a także w laboratorium prof. dr. hab. Andrzeja Wismołka z Zakładu Fizyki Ciała Stałego na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Głównym celem pracy Doktorantki było opracowanie technologii otrzymywania oraz zastosowania nukleotydowych narzędzi, które następnie mogłyby być wykorzystane do badania interakcji końca 5' mRNA z wybranymi białkami, które pełnią ważną funkcję z terapeutycznego punktu widzenia. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie coraz liczniejszych doniesień literaturowych o kluczowej, acz dalej nie do końca zrozumiałej i wyjaśnionej roli tych białek w rozwoju wielu chorób uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Owocem pracy mgr Renaty Kasprzyk jest 10 publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, z których siedem (*Chem. Eur. J.*, 2020; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020; *Chem. Eur. J.*; 2019; *Molecules*, 2019; *Chem. Commun.*, 2018; *Org.*

Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 (71) 320 4526
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

Biomol. Chem., 2018; *Org. Biomol. Chem.*, 2016) dotyczy tematu rozprawy, a trzy prace są efektem współpracy z realizacją innych projektów. W trzech pracach z zakresu tematyki doktoratu, mgr Renata Kasprzyk jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania. Doktorantka wyniki swoich badań wielokrotnie prezentowała na konferencjach międzynarodowych i krajowych w postaci wystąpień ustnych lub posterów. Powyższy dorobek naukowy oceniam bardzo wysoko i śmiało mogę stwierdzić, że zarówno ilość prac jak ich jakość pozwala uznać go za wybitny w aspekcie tak młodego pracownika naukowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Renaty Kasprzyk ma klasyczny układ i liczy 267 stron. Wstęp do pracy poprzedza wykaz skrótów oraz zapisów struktur nukleotydowych, a także jasno określony cel pracy. Wstęp teoretyczny do pracy jest bardzo obszernym materiałem, w którym Doktorantka na bardzo wysokim poziomie merytorycznym i z wysoką dokładnością przedstawiła znaczenie biologiczne końca 5' mRNA, białka związane z metabolizmem końca 5' mRNA, terapeutyczne zastosowanie analogów kapu jak również narzędzia do oddziaływań białko ligand. Zacytowana literatura pochodzi w większości z oryginalnych prac, co świadczy o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w literaturze tematu. Sam wstęp jest doskonałym kompendium wiedzy i pozwala na zrozumienie idei powstania hipotezy badawczej, która następnie była eksplorowana w ramach pracy doktorskiej. Strona edytorska rysunków jak również opisów jest na bardzo wysokim poziomie, a jedynym mankamentem są występujące literówki. Uważam, iż tak doskonałe i na tak wysokim poziomie merytorycznym opracowanie jest doskonałym materiałem wyjściowym do napisania pracy przeglądowej, do czego Doktorantkę gorąco zachęcam.

W rozdziale Metodyka Badań, Doktorantka dokładnie wyjaśnia podstawy eksperymentalne metod użytych w późniejszych badaniach, a także organizację planu badań. Ilość zastosowanych metod badawczych oraz ich różnorodność świadczy o doskonałym warsztacie eksperymentalnym i badawczym mgr Renaty Kasprzyk.

Najbardziej obszernym rozdziałem jest ten opisujący badania własne. Ilość przeprowadzonych eksperymentów oraz ich jakość jest wręcz imponująca. Wszystkie eksperymenty są przedstawione z niezwykłą szczegółowością i bez problemu mogą być powtórzone przez niezależnych eksperymentatorów. Również strona graficzna jak i przedstawienie wyników badań na wykresach oraz rycinach w pełni pozwala na pełne zrozumienie celów pracy. Każdy z podrozdziałów jest zakończony podsumowaniem otrzymanych wyników oraz krytycznym spojrzeniem na sukcesy i ewentualne niepowodzenia w badaniach. Jest to naprawdę bardzo dojrzała i wyważona analiza wskazująca na bardzo duży zasób wiedzy Doktorantki i doskonałą umiejętność planowania eksperymentów badawczych. Dobór metod badawczych wskazuje, że praca ma charakter wybitnie

interdyscyplinarny i łączy ze sobą aspekty chemii, fizyki oraz biologii. Moje pytanie dotyczy tutaj wniosku zamieszczonego na stronie 136 rozprawy, cytując „Zaobserwowano także, że IC₅₀ m7GSpSpSG D2 jest niższe w lizacie niż z rekombinowanym DcpS. Przypuszczalnie jest to efektem niższego stężenia DcpS w lizacie komórkowym, niż w metodzie z białkiem rekombinowanym.” Czy aby na pewno jest to kwestia stężenia? W tego typu badaniach bardzo często obserwuje się taki wynik i jednym z najbardziej prawdopodobnych wytłumaczeń jest inna aktywność enzymu w badaniach biochemicznych na rekombinowanym enzymie, a inna w lizacie komórkowym wynikająca ze zmian konformacyjnych białka, a także samego środowiska pomiaru. Bardzo bym prosił Doktorantkę o ustosunkowanie się do tego pytania.

W rozdziale Dyskusja mgr Kasprzyk podsumowuje wszystkie wyniki swoich badań, a także wskazuje na dalsze możliwe kierunki badawcze. Uważam, iż wyniki pracy mają wysoce nowatorski oraz oryginalny charakter i z pewnością znajdą liczne zastosowania w badaniach, a ich szczególną przydatność widziałbym w poszukiwaniu nowych molekuł o potencjale do zastosowania w terapii.

Podsumowując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Renaty Kasprzyk uważam:

1. Wydajna synteza około 40 fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów (sond molekularnych) i ich pełna charakterystyka strukturalna.
2. Identyfikacja nukleotydów znakowanych pirenem (nazwanych PyFLINT), jako jedynych, w których oddziaływanie z białkami prowadziło do zmiany intensywności fluorescencji.
3. Otrzymanie trzech sond fluorescencyjnych do badania oddziaływania kompleksów kap-eIF4E i kap-DcpS (PyFLINT-B) oraz katalizowanej przez DcpS hydrolizy kapu (PyFLINT-HA) i udowodnienie, iż mogą być używane w badaniach HTS i lizatach komórkowych.
4. Synteza sond do badania RNA kap N7-guanino metylotransferazy odpowiedzialnej za selektywną metylację Gppp-RNA i identyfikacja sondy pirenowej jako optymalnej w dalszych badaniach.
5. Udowodnienie użyteczności metody PyFLINT-M na przykładzie inhibicji trzech N7-MTaz: ludzkiej RNMT-RAM, Ecm1 z *E. cuniculi* oraz VCE z wirusa *Vaccinia*.

6. Synteza i charakterystyka analogów GTP znakowanych BDP-FL i karboksyfluoresceiną i użycie optymalnej molekuly do badań anizotropii fluorescencji miejsca wiążącego GTP transglutaminazy II.
7. Synteza, charakterystyka spektroskopowa i enzymatyczna dwuznakowanych sond nukleotydowych, zawierających pary znaczników tworzące ekscymer, parę FRET lub układ fluorofor–wygaszacz, a następnie ich użycie do badania aktywności fosfodiesterazy PDE-I oraz enzymu dekapującego DcpS.
8. Zaprojektowanie biosensora do oznaczania stężenia białek specyficznie wiążących kap.

Ostatni rozdział pracy stanowi Część Eksperymentalna, w której Doktorantka precyzyjnie opisuje procedury eksperymentalne oraz analizy związków. Ich opis jest całkowicie wystarczający do powtórzenia przez niezależnego badacza.

Reasumując wartość merytoryczną przedstawionej pracy doktorskiej mgr Renaty Kasprzyk, można zdecydowanie stwierdzić, iż otrzymane wyniki mają znamiona odkrycia naukowego, a przedstawiony w pracy materiał badawczy został już opublikowany w licznych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

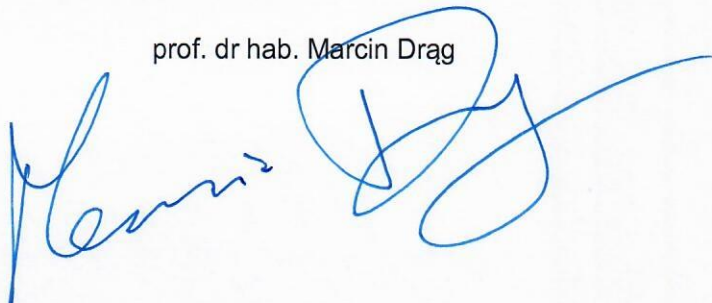
Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Renaty Kasprzyk została przygotowana w niezwykle staranny sposób. Zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Renaty Kasprzyk z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego pod tytułem „Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5' mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, doskonały dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Renaty Kasprzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'M' followed by a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.