

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 15.09.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Wojtczak

**pt.: „Wykorzystanie zmian polaryzacji fluorescencji oraz innych metod
spektrofluorymetrycznych do badania aktywności oraz inhibicji białek oddziałujących z
końcem 5' mRNA”**

**wykonanej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu
Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Jemielitego i dr hab. Joanny Kowalskiej**

„Bez interdyscyplinarności nie powstanie dziś żaden zaawansowany produkt, który byłby sprzedawalny, generował sukces rynkowy, tworzył miejsca pracy czy istotne wpływy budżetowe. W tej chwili rzadko kiedy wypełnienie luki rynkowej czy rozwiązanie problemu gospodarczego lub cywilizacyjnego opiera się na jednej dziedzinie” – mówił w 2018 roku prof. Aleksander Nawrat. Interdyscyplinarność przejawia się w różnorodności stosowanych podejść badawczych, umiejętności identyfikowania problemów i poszukiwania rozwiązań z pogranicza dyscyplin naukowych. Bez interdyscyplinarności, czyli rozwiązania postawionego problemu badawczego z wykorzystaniem wiedzy i technik kilku dyscyplin naukowych, nie powstałaby praca doktorska mgr Wojtczak. Postawiony w niej problem badawczy dotyczy opracowania wysokoprzepustowej metody, opartej na fluorescencji, do badania bibliotek związków oddziałujących z białkami wiążącymi strukturę końca 5' mRNA (tzw. kapu). Do rozwiązania tego problemu Doktorantka wykorzystwała wiedzę kilku dyscyplin naukowych takich jak fotochemia, enzymologia, biologia molekularna, biologia strukturalna, biochemia, chemia organiczna i analityczna, statystyka oraz chemia leków. W mojej opinii interdyscyplinarność recenzowanej pracy doktorskiej nie polega tylko na prostej sumie wiedzy wymienionych dyscyplin, lecz na ich wzajemnym inspirowaniu się. Interdyscyplinarność tej pracy to również propozycja nowej perspektywy badawczej oraz szansa na wykorzystanie opracowanych metod do znalezienia nowych związków o potencjalnie dużym

zastosowaniu w diagnostyce molekularnej oraz w profilaktyce i leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych takich jak choroby nowotworowe, genetyczne czy wirusowe. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska odpowiada więc na ogromne potrzeby ludzkości w zakresie nowych leków i szczepionek, co w mojej opinii w pełni uzasadnia celowość jej realizacji

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu LIDER finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju i projektu PRELUDIUM, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, których kierownikiem była Doktorantka. Całość rozprawy obejmuje 177 stron maszynopisu. Praca doktorska podzielona jest na 6 głównych rozdziałów (tj. cel pracy, część literaturową, badania własne, podsumowanie, część eksperymentalna oraz bibliografia). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów oraz wykaz dorobku naukowego mgr Wojtczak. Spis piśmiennictwa obejmuje 217 pozycji uwzględniających pełne dane bibliograficzne. Warto podkreślić że wśród cytowanych prac 47 to prace opublikowane przez zespół prof. Jemielitego i/lub dr hab. Kowalskiej. Recenzowana praca doktorska to kontynuacja wieloletnich badań i dokonań oraz gwarancja ich dalszej realizacji. W pracy znajduje się kilkanaście tabel, kolorowych rysunków oraz schematów, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Dodatkowo, jest bardzo estetyczna i napisana jest w sposób zrozumiały oraz przystępny. Moje wątpliwości budzą jedynie dwa sformułowania zapożyczone z języka angielskiego tj. „screening” zamiast badania przesiewowe oraz że „eksperymenty były wykonywane w duplikatach”. Na pochwałę zasługuje również okładka pracy, nawiązująca swoją grafiką do tematyki pracy doktorskiej. Widać na niej białka, ligandy oraz absorpcję promieniowania. Tylko gdzie jest emisja (fluorescencja)?

Na początku lektury pracy doktorskiej uwagę przyciągają podziękowania. Po ich lekturze, widać, że Doktorantka jest świadoma, iż jej praca powstała dzięki współpracy, pomocy oraz wsparciu innych członków zespołu. Z resztą współpraca o której mowa zapewniła interdyscyplinarność jej pracy i rozwój naukowy Doktorantki w różnych dziedzinach nauki, co sama zauważyła dziękując za to swojemu Promotorowi.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Cele pracy” mgr Anna Wojtczak przedstawiła cel główny swojej pracy, którym było **opracowanie wysokoprzepustowych metod opartych na fluorescencji do poszukiwania i badania ligandów białek wiążących strukturę końca 5' mRNA, czyli strukturę tzw. kapu**. Dodatkowym celem pracy było wykorzystanie opracowanych metod do poszukiwania nowosyntetyzowanych analogów kapu jako ligandów białek wiążących kap oraz przeprowadzenie dla nich analizy SAR.

W następnym rozdziale zatytułowanym „Część literaturowa” Doktorantka wprowadziła czytelnika we wszystkie zagadnienia ujęte w rozprawie doktorskiej. Na początku wyjaśniła rolę kwasu mRNA w procesie ekspresji genów, opisała budowę, właściwości i proces biosyntezy końca 5' mRNA tzw. kapu, którego struktura i budowa znacząco wpływa na czas życia mRNA w komórce. Następnie omówiła proces inicjacji translacji białek zachodzący na matrycy mRNA ze szczególnym uwzględnieniem roli kapu w tym procesie. Dużo miejsca poświęciła jednemu z najważniejszych obiektów swoich badań czyli białku eIF4E. Białko to jest czynnikiem inicjującym translację a jego stężenie jest podwyższone w komórkach nowotworowych przez co jest doskonałym celem molekularnym w poszukiwaniu nowych leków, których działanie polegałoby na ograniczeniu dostępności białka dla transkryptów. To właśnie białko jest jednym z czterech białek dla którego Doktorantka poszukiwała nowych ligandów z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych. W kolejnym podrozdziale opisała w jaki sposób dochodzi do degradacji mRNA oraz szczegółowo opisała działanie i strukturę trzech enzymów biorących udział w tym procesie tj. DcpS, Nudt16 oraz cN-IIIB. Enzym DcpS został zidentyfikowany jako cel terapeutyczny w leczeniu rdzeniowej atrofii mięśniowej. Nudt16 może odgrywać kluczową rolę w procesie nowotworzenia. W przypadku enzymu cN-IIIB znaczenie biologiczne nie jest znane, a znalezienie inhibitorów tego enzymu pozwoliłoby poznać bliżej jego komórkową funkcję. Enzymy te, podobnie jak białko eIF4E były również obiektem badań Doktorantki i również stanowią cel molekularny w poszukiwaniu nowych terapii chorób nowotworowych lub genetycznych bądź w ich diagnozowaniu. W dalszych podrozdziałach Kandydatka szczegółowo opisała modyfikacje chemiczne jakim mogą podlegać struktury kapu. Dokonała w tym temacie solidnego przeglądu literaturowego. Następnie dokładnie wyjaśniła, na przykładzie białek eIF4E i DcpS, w jaki sposób chemicznie zmodyfikowane cząsteczki kapu umożliwiają poznanie mechanizmów w których struktura kapu bierze udział na poziomie molekularnym. Najbardziej obiecującym, w mojej opinii, zastosowaniem modyfikowanych chemicznie kapów jest terapia genowa i opracowanie szczepionek przeciwnowotworowych. Trzymam mocno kciuki za sukces tych badań, realizowanych przez zespół prof. Jemielitego i już teraz zgłaszam się jako ochotnik do testowania tej terapii. Zastanawiam się tylko czy w działaniu „wyuczonych” (dzięki szczepionce) limfocytów T nie przeszkodzą systemy obronne komórek nowotworowych, na przykład receptory hamujące odpowiedź immunologiczną organizmu? Kolejny duży podrozdział Doktorantka poświęciła opisowi metod badania oddziaływań ligand-białko ze szczególnym uwzględnieniem metod fluorescencyjnych takich jak: metoda miareczkowania fluorescencyjnego zsynchronizowanego czasowo, anizotropia fluorescencji oraz fluorescencja z zastosowaniem molekularnych rotorów jako sondy fluorescencyjne. Techniki wykorzystujące zjawiska fluorescencji charakteryzują się wysoką czułością, w związku z tym nie zużywa się dużych ilości reagentów. Nie bez znaczenia jest również duża dostępność do aparatury badawczej. W badaniach tych można wykorzystać zarówno cząsteczki, które posiadają naturalne właściwości fluorescencyjne jak również związki chemiczne znakowane odpowiednimi fluoroforami. Nic więc dziwnego, że w swojej pracy Doktorantka zdecydowała się wykorzystać

właśnie tą technikę spektroskopową w swoich badaniach wysokoprzepustowych. Uważam, że Doktorantka doskonale przeprowadziła czytelnika przez trudne tematy spektroskopowe z jednoczesnym wskazaniem zastosowań tych metod w szeroko pojętej biologii molekularnej. Uważam, że podrozdział ten powinien znaleźć swój finał w postaci rozdziału w skrypcie dla studentów lub doktorantów.

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Badania własne”. Rozdział ten został przez Doktorantkę podzielony na cztery zasadnicze podrozdziały. Każdy z nich dotyczył innej metody badawczej, ale zawsze opartej o technikę fluorescencji. W pierwszym podrozdziale Doktorantka badała aktywność enzymatyczną białka DcpS poprzez pomiar stężenia jonów fluorkowych uwalnianych w trakcie reakcji enzymatycznej z jednoczesnym ich „wychwytem” przez sondę fluorogeniczną. W metodzie tej Doktorantka wykorzystała nienaturalny substrat enzymu DcpS – analog m^7GMPF . Detekcja wysokoprzepustowa polegała na braku lub niskiej fluorescencji sondy po związaniu inhibitora z enzymem. Opracowana metoda została wykorzystana przez p. Wojtczak do wysokoprzepustowego poszukiwania i selekcji inhibitorów enzymu DcpS. Doktorantka przetestowała dzięki opracowanej przez siebie metodzie 1346 związków. Wśród nich zidentyfikowała inhibitor silnie oddziałujący z enzymem DcpS ($m^7GSppspSG$ D2), dla którego wyznaczana została struktura krystalograficzna, potwierdzająca jego ścisłe oddziaływanie z białkiem DcpS. Choć opisany powyżej eksperyment wydaje się prosty do wykonania to do zoptymalizowania tej metody Doktorantka wykonała wiele dodatkowych eksperymentów walidujących. Przetestowała różne klasy analogów kapu, dokonując dla nich analizy SAR. Jest to mój ulubiony podrozdział w recenzowanej przez mnie pracy doktorskiej. Jedynym nasuwającym się moim pytaniem jest czy enzym DcpS działa specyficznie jedynie wobec wiązania F-P? Czy sprawdzane były inne podstawniki niż fluor w cząsteczce m^7GMP ?

Kolejny podrozdział rozprawy dotyczył opracowania i zastosowania techniki anizotropii fluorescencji do identyfikacji oddziaływań różnych analogów kapów z białkami cN-IIIB, eIF4E i DcpS. Metoda ta jest szybka ale wymaga obecności fluofora w badanym ligandzie, co z punktu widzenia syntetycznego może być kłopotliwe oraz drogie a cząsteczka tak zmodyfikowana może się nie rozpuszczać w roztworze wodnym. Czy w trakcie prowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów można było zauważyć problemy z rozpuszczalnością badanych analogów kapów? W podrozdziale tym Doktorantka przetestowała (wysokoprzepustowo) kilkadziesiąt ligandów i z powodzeniem zastosowała metodę anizotropii fluorescencji do badania białek DcpS i eIF4E. Dodatkowo w badaniach z białkiem eIF4E, rozszerzyła aplikacyjność metody do badania dostępnych komercyjnie ligandów allosterycznych białka eIF4E, a także do oceny powinowactwa krótkich oligonukleotydów. W tym miejscu pracy doktorskiej pogubiłam się nieco w oznaczeniach badanych cząsteczek. W przypadku enzymu cN-IIIB mgr Wojtczak nie udało się opracować metody anizotropii fluorescencji ze względu na zbyt słabe wiązanie się sond fluorescencyjnych do białka.

Następny podrozdział dotyczył testowania analogów kapu modyfikowanych w pozycji C⁸ cząsteczki m⁷Guo lub Guo. Modyfikacje wprowadzone do badanych cząsteczek polegały na wprowadzeniu tzw. fluorescencyjnych molekularnych rotorów, których fluorescencja zależy od mikrootoczenia i lepkości środowiska (w tej pracy środowisko lepkie rozumiane jest jako ligand związany z białkiem). Doktorantka scharakteryzowała 14 tego typu cząsteczek pod kątem ich użyteczności jako sond do badania oddziaływania z białkami eIF4E i DcpS oraz jako sond enzymatycznych dla enzymów DcpS i Nudt16. Przeprowadziła analizę właściwości spektroskopowych tych cząsteczek, ich stabilności, a także przebadła je pod kątem oddziaływania z białkami eIF4E i DcpS. Wytypowała sześć analogów kapu – molekularnych rotorów, charakteryzujących się wysoką wydajnością i które zmieniały swoje właściwości emisyjne pod wpływem wiązania z białkiem lub w wyniku zachodzącej reakcji enzymatycznej. Ciekawa jestem jak na tle widm intensywności emisji fluorescencji badanych ligandów (Rys. 63) wygląda widmo cząsteczki tioflawiny?

Ostatni podrozdział dotyczył zastosowania metody miareczkowania fluorescencyjnego do badania nowych analogów kapu jako ligandów białka eIF4E. W wyniku tych prac Doktorantka zidentyfikowała i scharakteryzowała kilkadziesiąt różnych cząsteczek różniących się modyfikacjami chemicznymi i przeprowadziła pełną analizę SAR.

Przedostatni rozdział dysertacji został zatytułowany „Podsumowanie”, w którym na trzech stronach Doktorantka podsumowała wyniki swojej pracy podkreślając jednocześnie, że jej najważniejszym osiągnięciem jest zidentyfikowanie inhibitora silnie oddziałującego z enzymem DcpS (m⁷GSp_{sp}SG D2) o powinowactwie zbliżonym do znanej, z badań klinicznych w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni, cząsteczki RG3039. W mojej opinii osiągnięć tych jest znacznie więcej, chociażby opracowanie i zoptymalizowanie wysokoprzepustowych metod opartych na fluorescencji i anizotropii fluorescencji do badania analogów kapu wobec białek oraz możliwość zaadaptowania tych metod do badania innych białek wiążących kapy.

Ostatni rozdział pracy poświęcony został części eksperymentalnej i zawiera opis metod oraz procedur stosowanych przez Doktorantkę. Został on podzielony przez Doktorantkę na 25(!) części, które w pełni oddają olbrzymią ilość i różnorodność technik badawczych zastosowanych w recenzowanej dysertacji. Tak szeroka gama metod po raz kolejny udowadnia interdyscyplinarność pracy doktorskiej p. Wojtczak. Pani mgr Wojtczak zastosowała w mojej opinii właściwe metody i procedury do których należały, w dużym uproszczeniu: (i) metody chromatograficzne, (ii) spektroskopowe (absorbcyjne i fluorescencyjne), (iii) biochemiczne (wyznaczanie IC₅₀ i EC₅₀), (iv) enzymatyczne (wyznaczanie stałych asocjacji i inhibicji) oraz (vi) statystyczne i (v) konformacyjne. Wszystkie czynności zostały dokładnie opisane i na pewno będą służyły młodszym koleżankom i

kolegom jako źródło „gotowych przepisów” w ich badaniach. Pewien niedosyt budzi jedynie brak informacji na temat ogólnej procedury otrzymywania białek, krystalizacji i syntezy chemicznej analogów kapów, choć zdaję sobie sprawę że prace te wykonały inne osoby, o czym Doktorantka napisała w swojej dysertacji.

Opisane eksperymenty, ich analiza i płynące z badań wnioski zostały częściowo poddane ocenom recenzentów w czasopismach w których zostały opublikowane. Stąd moja rola jako recenzenta jest znacznie ułatwiona. Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie i logicznie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniałam pytania które mi się nasunęły podczas lektury:

1. Str. 28. Struktura enzymu DspS to homodimer z wymienionymi domenami. Białka z wymienionymi domenami mają tendencję do oligomeryzacji. Czy białko to było stabilne w formie dimeru? Czy przed prowadzonymi eksperymentami zostało to sprawdzone?
2. Str. 37 i dalej. Czy sprawdzana była konfiguracja bezwzględna izomerów D1 i D2 badanych przez Doktorantkę diastereoizomerów? Czy trudność w przechodzeniu jednego z nich przez błonę komórkową można powiązać z innym ułożeniem konformacyjnym cząsteczki i powstających z tego tytułu zawaad sterycznych? Czy badane przez Doktorantkę białka „preferują” którąś z form diastereoizomeru D1 lub D2 w badanych analogach?
3. Str. 38. Czy dla analogów kapu modyfikowanych na zasadzie azotowej (w pozycji N^7 guaniny) sprawdzane były podstawniki indolowe? Czy istnieje szansa, że podstawnik taki zmieści się w kieszeni hydrofobowej białka a ligand utworzy na wzór motywu zamka tryptofanowego w białkach stabilny kompleks z białkiem?
4. Str. 45. Czy terapia genowa z wykorzystaniem analogów kapu posiada działanie terapeutyczne, jak napisała Doktorantka czy raczej profilaktyczne?
5. Proszę Doktorantkę o wybór jednego najlepszego liganda dla każdego z badanych białek. Jakie eksperymenty biologiczne lub biochemiczne można by zaplanować dla tych najlepszych ligandów, celem potwierdzenia ich działania jako terapeutyki lub sondy molekularne?

Na zakończenie mojej recenzji chciałabym kolejny raz podkreślić o interdyscyplinarności badań prowadzonych przez p. Annę Wojtczak, których istota doskonale wpisują się w definicję zaproponowaną przez Allena F. Repko: „Badania interdyscyplinarne są procesem odpowiadania na pytanie, rozwiązywania problemu lub zajmowania się pewnym tematem, który jest zbyt szeroki lub złożony, aby mógł być adekwatnie podjęty przez pojedynczą dyscyplinę. Wykorzystują one

dyscyplinarne perspektywy i integrują ich osiągnięcia, aby wytworzyć pełniejsze rozumienie lub postęp poznawczy". Tak właśnie rozumiem i oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską.

Reasumując, uważam, że tematyka pracy doktorskiej p. Anny Wojtczak jest niezwykle interesująca, część doświadczalna została dobrze zaplanowana, wyniki zinterpretowane poprawnie a cele pracy w pełni zrealizowane. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w pięciu publikacjach w prestiżowych czasopismach z listy JCR (*Sci. Rep*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Chem. Sci.*, *Org. & Biomol. Sci.* oraz *J. Org. Chem.*). Na ogólny opublikowany dorobek mgr Wojtczak łącznie składa się sześć artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR oraz dwa patenty (jeden PCT i jeden URP). Jest to ponadprzeciętny dorobek publikacyjny jak na tak młodego adepta nauki. Swoje wyniki badań Doktorantka prezentowała również podczas 4 konferencji międzynarodowych oraz 7 konferencji krajowych. Była również kierownikiem dwóch grantów naukowych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Anny Wojtczak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w prace nad optymalizacją wysokoprzepustowych metod spektrofлуorymetrycznych do badania aktywności oraz inhibicji białek oddziałujących z końcem 5' mRNA, nad odkryciem wielu nowych ligandów tych białek oraz nad identyfikacją kluczowych modyfikacji chemicznych dla wysokiej aktywności biologicznej analogów tzw. kapów zwracam się jednocześnie do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Sylvie Rodziewicz-Motowidło