

Prof. dr hab. Maria Bretner

Warszawa 22.06. 2020

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pietrow

„Synteza podwójnie funkcjonalizowanych dinukleotydomowych analogów końca 5' mRNA
(tzw. kapu)”

wykonanej w Pracowni Syntezy Organicznych Nanomateriałów i Biomolekuł Wydziału
Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Pauliny Pietrow została wykonana w zespole Pani dr hab. Marzeny Jankowskiej-Anyski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa wydana jest w formie książkowej i liczy 166 stron. Układ pracy jest typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich.

Praca poprzedzona jest wstępem teoretycznym, liczącym 47 stron, stanowi to około 30% objętości pracy, co jest typowe dla prac doktorskich. W tej części Doktorantka przedstawiła strukturę końca 5' mRNA tzw. kapu, i jego wielorakie funkcje pełnione w komórkach. Doktorantka opracowała ten fragment bardzo starannie i bogato ilustrowała. Ponadto omówiła metody syntezy różnych modyfikowanych struktur kapu i wpływu tych modyfikacji na właściwości biologiczne. Modyfikacje dotychczas wykonane dotyczyły wprowadzenia zmian w jednym lub obu nukleotydach kapu. Ponadto po wbudowaniu zmodyfikowanego kapu do transkryptu mRNA zauważono jego wpływ na efektywność translacji. Lektura części teoretycznej daje mi podstawę do stwierdzenia, że przeprowadzone przeglądy literaturowe były solidnym fundamentem do realizacji badań.

Podstawowym celem jaki postawiła sobie Doktorantka było opracowanie metod syntezy podwójnie funkcjonalizowanych, w obrębie drugiego nukleotydu, dinukleotydomowych analogów kapu. Celem tych modyfikacji było dołączenie cząsteczki peptydu, poprawiającej transport analogu przez błonę komórkową, a także znacznika fluorescencyjnego, w celu umożliwienia lokalizacji tak zmodyfikowanego kapu w obrębie komórki. Nie był to jedyny cel tej pracy. Doktorantka postanowiła też sprawdzić możliwość dotychczasowo

niestosowanej w syntezie nukleozydów metody wykorzystującej wiązanie disiarczkowe do syntezy modyfikowanego w pozycji C6 drugiego nukleotydu kapu.

Rozdział zatytułowany „Badania własne” liczący 53 stron to najważniejsza i jednocześnie najciekawsza część rozprawy doktorskiej.

Doktorantka rozpoczęła badania od syntezy trzech różnie podwójnie modyfikowanych monofosforanów gwanozyny, wykorzystując i modyfikując znane metody. Najwięcej trudności sprawiła synteza 5'-monofosforanu N2-propargilo-6-tioguanozyny, ale i tu Doktorantce udało się dopracować odpowiednie procedury.

Kolejnym etapem badań było sprzęganie monofosforanów z P-imidazolidem 5'-difosforanu 7- metyloguanozyny według wcześniej opracowanych metod.

Następnie Doktorantka zbadła możliwość zastosowania innych modyfikacji kapu poprzez dołączenie tiolu, znacznika fluorescencyjnego lub peptydu.

Dołączanie peptydu N3-(Ala)₃ i znacznika fluorescencyjnego doktorantka przeprowadziła dwoma metodami a) stosując jako substrat 5',5'-trifosforan P1-7-metyloP3-N2-propargilo- $\{2',3'-O-[1-(2\text{-karboksyetylo)etylideno}]\}$ gwanozynę oraz b) funkcjonalizując podwójnie modyfikowany monofosforan a następnie sprzęgając go z P-imidazolidem 5-difosforanu-7MeGua. Zabrakło mi jednak porównania wydajności całkowitej obu metod.

Wykorzystując doświadczenie zdobyte w tym etapie badań Doktorantka przeprowadziła syntezę podwójnie funkcjonalizowanego analogu kapu z dołączonym peptydem N3-TAT, który był następnie zastosowany do badania zdolności penetracji przez błonę komórkową jak również do zdolności hamowania kap zależnej translacji w lizacie z retikulocytów króliczych. Największym wyzwaniem okazało się opracowanie metody syntezy modyfikowanego kapu zawierającego 6-tioguanoznę o czy może świadczyć opis tych prób zawarty na 35 stronach rozdziału Badania własne. Dzięki przeprowadzaniu wielu eksperymentów zarówno na poziomie nukleozydu jak i nukleotydu Doktorantka otrzymała szereg modyfikowanych tiolami poprzez mostek disiarczkowy w obrębie drugiego nukleotydu, analogów kapu. Na tym też nie poprzestała wytrwale realizując założenia swej pracy doktorskiej w celu otrzymania podwójnie modyfikowanego analogu kapu zawierającego znacznik fluorescencyjny połączony z rybozą drugiego nukleozydu poprzez wiązanie amidowe kwasu lewulinowego.

Rozprawę kończą podsumowanie i wnioski. Omówienie i opis wyników jest bardzo silną stroną recenzowanej pracy doktorskiej.

Bardzo dobre wrażenie robi też logiczny i zwięzły opis eksperymentów – dzisiaj rzadko się zdarza tak szczegółowy i konkretny opis wykonanych doświadczeń. Szczególnie

zaś chciałbym pochwalić wnikliwość dokonanych obserwacji, które dotyczą zarówno danych literaturowych jak i tych podczas badań własnych.

Stronę redakcyjną i estetyczną pracy również należy ocenić bardzo wysoko, jakkolwiek z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na zwrócenie uwagi na niektóre niedociągnięcia:

Str 69- użycie zwrotu przeacetylowanie należy zaliczyć do żargonu laboratoryjnego

Str 69 zmiany poprawiły wygląd widma masowego- raczej zmiany przyczyniły się do poprawy wyników syntezy co znalazło odzwierciedlenie w sygnałach widma MS

Str 70 podpis po schemacie 21 – błędne warunki reakcji etapu 4, oraz odnośnik do str 92, powinien być raczej do str 92 – 92-93

Str 72 schemat 22 strzałki dla etapów 4 i 5 powinny być skierowane w przeciwnym kierunku

Podsumowując uważam, że Doktorantka wykazała biegłość w zastosowanych technikach badawczych i umiejętność odpowiedniej interpretacji wyników. Rozprawa jest jasno napisana i Autorka podkreśliła w niej znaczenie przeprowadzonych badań.

Doktorantka nie podała informacji czy wyniki jej badań zostały opublikowane, lub czy były prezentowane na konferencjach, natomiast po przeszukaniu bazy Skopusa okazało się, że jest współautorką w 3 publikacjach z listy filadelfijskiej o dość wysokich współczynnikach oddziaływania : ACS Omega, 2019, 4(17), 17576-17580 (IF 2,58) ; Bioorganic Chemistry, 2020, 96,103583 (3,92) i Bioconjugate Chemistry, 2020, 31(4), 1156-1166 (IF 4,38)

Stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Pauliny Pietrow spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim i wnioskuje o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Prof. dr hab. Maria Bretner

Warszawa 22.06. 2020

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pietrow

„Synteza podwójnie funkcjonalizowanych dinukleotydowych analogów końca 5' mRNA
(tzw. kapu)”

wykonanej w Pracowni Syntezy Organicznych Nanomateriałów i Biomolekuł Wydziału
Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej daje podstawę do stwierdzenia, że przeprowadzony przegląd literaturowy był solidnym fundamentem do realizacji badań.

Cele pracy doktorskiej zostały przedstawione w sposób uzasadniający podjęcie badań w kierunku syntezy nowych analogów kapu jak również potrzeby opracowania owych metod syntezy.

Dzięki przeprowadzaniu wielu eksperymentów zarówno na poziomie nukleozydu jak i nukleotydów Doktorantka otrzymała szereg podwójnie funkcjonalizowanych, w obrębie drugiego nukleotydu, dinukleotydowych analogów kapu .

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, wielkość przedstawionego materiału doświadczalnego i bardzo dobry sposób jego prezentacji co zdecydowanie wyróżnia na korzyść niniejszą rozprawę na tle innych prac doktorskich, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny o przyznanie wyróżnienia jej Autorce, Pani mgr Paulinie Pietrow.

M. Bretner