



Prof. dr hab. Marianna Kańska
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii
Ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
e.mail: mkanska@chem.uw.edu.pl

Warszawa 22-07- 2013 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Karoliny Piecyk**

pt.

**„Synteza i badania biologiczne analogów 5' końca mRNA) zawierających
modyfikowaną w pozycji N2 i N7 guanozynę**

W Pracowni Biomolekuł Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego zespół badawczy, kierowany dr hab. Marzeną Jankowską-Anyszką oraz we współpracy z Zakładem Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki UW, prowadzi intensywne badania nad syntezą zarówno naturalnych, jak też zmodyfikowanych chemicznie analogów kapu, czynnika występującego w mRNA komórek organizmów eukariotycznych. Kap odgrywa ważną rolę w zainicjowaniu translacji, zapewnieniu trwałości mRNA, jak też w transporcie wewnątrzkomórkowym kwasów nukleinowych. Wymienione funkcje są realizowane poprzez oddziaływanie kapu z odpowiednimi białkami rozpoznającymi jego budowę.

W celu poszerzenia wiedzy o powyższych procesach wprowadza się modyfikacje w różnych częściach kapu tj. w zasadach nukleotydowych, w pierścieniach cukrowych czy w łańcuchu fosforanowym. Nienaturalne analogi kapu poddaje się wszechstronnym badaniom biochemicznym, biologicznym i biofizycznym w celu uzyskania informacji dotyczących mechanizmów ich działania, a w szczególności do zgłębiania tajników rozpoznawania i wiązania kapu przez

specyficzne czynniki białkowe. Uzyskana wiedza może zostać wykorzystana m.in. do opracowania nowych terapii w niektórych chorobach, w tym nowotworowych, związanych z nieprawidłowym poziomem białek wiążących kap. W swojej pracy doktorskiej mgr Karolina Piecyk skupiła się na syntezie analogów kapu zawierających modyfikowaną w pozycjach N² i N⁷ guanozynę i badaniu ich właściwości w oddziaływaniu z dwoma białkami: faktorem eIF4E (ang. *eukaryotic Initiation Factor 4E*) uczestniczącym w translacji oraz snurportyną 1, białkiem zaangażowanym w transport małych jądrowych RNA bogatych w urydynę, U sRNA, (ang. *Uridine rich small nuclear RNA*). Tego typu badania należy zaliczyć do ważnych i istotnych z punktu widzenia medycyny ze względu na ich potencjalne wdrożenie w przemyśle farmaceutycznym.

Pierwszym etapem pracy doktorskiej mgr Karoliny Piecyk było otrzymanie mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych w pozycjach N² i N⁷ guanozyny.

Na podstawie danych literaturowych i wielu eksperymentów wstępnych mgr Karolina Piecyk przyjęła najbardziej optymalną strategię syntezy N² modyfikowanych analogów kapu. Polegała ona na otrzymaniu 2-fluoropochodnej inozyny, a mianowicie 2-fluoro-2',3',5'-tri-O-acetylo-O⁶-[2-(4-nitrofenylo)etylo]inozyny jako prekursora do syntezy N² modyfikowanych pochodnych guanozyny. Ta 2-fluorowana pochodna w reakcji substytucji nukleofilowej S_NAr z aminami doprowadziła do otrzymania 16 pochodnych guanozyny różniących się charakterem podstawnika przy atomie N² (podstawniki alifatyczne z łańcuchami liniowymi i rozgałęzionymi oraz aromatyczne z grupami będącymi donorami lub akceptorami elektronów). Te pochodne były wykorzystane do syntezy N² modyfikowanych mononukleotydowych analogów kapu, które otrzymano w wyniku ich fosforylacji dokonanej metodą opracowaną przez Yoshikawę. Dwie z N² pochodnych guanozyny z podstawnikami propyn- i pentynowym posłużyły do syntezy 5 mononukleotydowych analogów kapu zawierających w swej strukturze w pozycji N² pierścień triazolowy. Po wielu próbach mgr Karolina Piecyk opracowała optymalną procedurę (1,3-dipolarna cykloadycja między terminalnymi alkinami z organicznymi azydami katalizowana jonami Cu⁺) pozwalającą uzyskać pożądany związek z wydajnością od 80 do 90%.

Modyfikowane w pozycji N⁷ mononukleotydowe analogi kapu były dwójakiego rodzaju: z podstawnikiem przy atomie N⁷ i niemodyfikowaną pozycją N² (analogi monometyloguanozyno kapu, MMG) oraz z podstawnikiem przy N⁷ i z dwoma

podstawnikami metylowymi w grupie aminowej przy N² (analogi trimetyloguanozyno kapu ,TMG).

W wyniku reakcji sprzęgania prowadzonej w środowisku bezwodnym (metoda Sekine) mgr Karolina Piecyk otrzymała 12 nowych dinukleotydowych analogów kapu zmodyfikowanych w pozycji N² oraz 7 analogów w pozycjach N⁷ oraz N² z wydajnością od 40 do 65%.

Otrzymane analogi kapu zostały poddane badaniom biologicznym ukierunkowanych na określenie ich przydatności jako inhibitorów inicjacji translacji. Pomiary inhibicji, wykonane w metodą bioluminescencyjną, w dwóch standardowych roztworach (lizak z retikulocytów króliczych oraz ekstrakt z nicieni *Ascaris suum*). Wyniki badań zmodyfikowanych w pozycji N² triazolowych pochodnych kapu wykazały, że wszystkie te analogi wydajnie inhibują translację w ekstrakcie z retikulocytów króliczych, a najsilniej hamuje wiązanie białka eIF4E związek, do którego pierścienia triazolowego jest przyłączony podstawnik 2,6-dimetoksyfenoksypropylowy tj. 5'-monofosforan N²-{1-[3-(2,6- dimetoksyfenoksy-propylowo]-1H-1,2,3-triazol-4-ylo}metyleno-7-metyloguanozyna. Natomiast pomiary inhibicji w ekstrakcie nicieni *Ascaris suum* wykazały, że tylko analogi z pojedynczym podstawnikiem przy N² wykazują aktywność biologiczną. Analogi z podstawnikami alkilowymi wykazywały zbliżoną zdolność do inhibicji. Spośród analogów z podstawnikami aromatycznymi najbardziej interesujący okazał się związek z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym.

Dwunukleotydowe analogi kapu, zmodyfikowane w obrębie pierwszego nukleotydu w pozycji N², wykorzystane zostaną do badania ich powinowactwa względem snurportyny tj. białka uczestniczącego w transporcie molekuł RNA do jądra komórkowego w celu znalezienia najbardziej efektywnego analogu. W wyniku wstępnych badań metodą wygaszania fluorescencji białka wyznaczono stałe asocjacji białko-ligand dla niektórych analogów kapu, które wskazują zależność powinowactwa od rodzaju podstawnika w zmodyfikowanym analogu. Pracę w kierunku charakterystyki wszystkich otrzymanych analogów kapu są kontynuowane w ramach międzynarodowego grantu ERA-NET EuroNanoMed w temacie „*Nanoconstructs for delivery of RNA splice-switching oligonucleotide therapeutics*” ukierunkowanego na poszukiwanie leków przeciwko mięśniowej dystrofii Duchenne'a.

Ostatnim osiągnięciem mgr Karoliny Piecyk było otrzymanie pierwszego znanego konjugatu kapu z peptydem zdolnym do wnikania do wnętrza komórki (CPP, ang. *Cell Penetrating Peptide*). Do tego celu Doktorantka użyła standardowego peptydu MPS (*Membrane Permeable Sequence*), który w swej sekwencji zawiera resztę lizyny podatną na modyfikację. Wykorzystując doświadczenie i procedury, nabyte w trakcie syntezy różnych zmodyfikowanych analogów kapu, mgr Karolina Piecyk opracowała metodę sprzęgania modyfikowanego dinukleotydowego analogu kapu z peptydem MPS. Ten konjugat jest obiektem dalszych badań mających potwierdzić jego zdolność do przenikania błony komórkowej.

Należy podkreślić, że syntetyczna część badań jest wyłącznym dziełem Autorki, natomiast część badań biologicznych i pomiarów fizykochemicznych została wykonana we współpracy z Zakładem Biofizyki Wydziału Fizyki UW i na Uniwersytecie Colorado, USA. Wyniki osiągnięte w trakcie wykonywania przedstawionej pracy doktorskiej są oryginalne i charakteryzują się wysokim poziomem merytorycznym. Wymagały one od mgr Karoliny Piecyk dużego wkładu pracy w badania doświadczalne, jak i w interpretację wyników. Doktorantka wykazała bardzo dobrą znajomość i umiejętność stosowania różnych technik syntezy organicznej. Praca doktorska mgr Karoliny Piecyk ma charakter interdyscyplinarny, mieszczący się na pograniczach biochemii, biologii, chemii organicznej oraz enzymologii. Taki obszar badań wymaga od eksperymentatora dużego wkładu pracy w opanowaniu różnych technik stosowanych w tych dziedzinach nauki. Autorka opanowała wiedzę z nowoczesnych metod syntetycznych oraz fizykochemicznych, służących do analizy chemicznej i ustalania struktury badanych związków chemicznych. Rozdział złożonych mieszanin poreakcyjnych wymagał opanowania różnych technik chromatograficznych niezbędnych przy tak skomplikowanych zadaniach. Należy podkreślić, że wszystkie badania przeprowadzone przez Doktorantkę były bardzo żmudne i wymagające olbrzymiej precyzji. Na koniec trzeba wyraźnie nadmienić, że wyniki uzyskane przez mgr Karolinę Piecyk noszą nie tylko charakter poznawczy, ale potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie praktyczne w medycynie a w szczególności w immunoterapii nowotworowej czy chorobach wywołanych zaburzeniami w metabolizmie i transporcie białek. Opracowane przez Doktorantkę metody syntez mogą być wykorzystane do otrzymywania innych

analogów kapu, które mogą mieć charakter nie tylko poznawczy, ale również istotne znaczenie medyczne.

Układ recenzowanej pracy jest klasyczny i klarowny dla czytelnika. Składa się z następujących części: Wstępu, Celu i założeń pracy, Badań własnych, Podsumowania, Części eksperymentalnej i Literatury. Pierwszy rozdział, zatytułowany jako Wstęp i obejmujący ¼ tekstu dysertacji, jest właściwie przeglądem literatury związanej z tematem pracy. Mgr Karolina Piecyk szczegółowo omawia tam zagadnienia związane z budową kapu, z jego biologicznymi funkcjami, rolę kapu w badaniach biofizycznych i biochemicznych i wskazuje, jakie nadzieje wiążą się z jego potencjalnym zastosowaniem w medycynie. W części literaturowej Doktorantka umieściła również szczegółowe dane dotyczące metod syntezy analogów kapu.

Strona formalna rozprawy nie budzi większych zastrzeżeń. Jednak, jak zwykle przy tak dużej objętości tekstu, nie udało się uniknąć pewnych uchybień i niezręczności językowych. Do obowiązków recenzenta należy ich wskazanie. Wymienię tylko niektóre z nich. I tak np.

- Autorka często omawia dane kwestie przy pomocy bardzo rozbudowanych, złożonych zdań, zapominając przy tym o zasadach interpunkcji. W tych zdaniach złożonych często brak lub nieprawidłowo umieszcza się przecinki, co utrudnia zrozumienie.
- W niektórych partiach dysertacji Doktoranta używa czasowników w pierwszej osobie liczby pojedynczej, a w innych stosuje tryb bezosobowy. Dysertacja jest dziełem własnym Autorki, więc powinna być pisana w pierwszej osobie liczby pojedynczej.
- Str. 11; Łacińska systematyczna nazwa pierwotniaka jest *Leishmania* a nie *Leiszmania*
- Str. 17: Błąd w znanym nazwisku: Winno być van der Waalsa, a nie *van der Vaalsa*..
- Str. 18. Winno być aktywna, a nie aktywana
- Str. 19: W opisie rysunku – zczepnięte zamiast zaczerpnięte.
- Str. 23: Jest „indol łańcucha bocznego tryptofanu” zamiast reszty indolowej. Ta uwaga odnosi się do dalszych części tekstu gdzie Autorka podaje, że w danej sekwencji peptydu jest 5 tryptofanów lub innych aminokwasów, zamiast 5 reszt tryptofanowych itd.;

- Str. 34: *proteis* zamiast *proteins*
- 37: Jest: „*pierścień guaniny znajduje sięna środku azotu w pozycji 2*” – nie wiadomo o co tu chodzi.
- Str. 142: Pozycja 11 w spisie literatury; to nie jest cytat

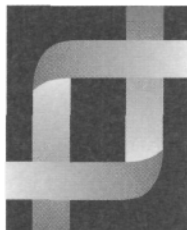
Zarówno te, jak i wiele innych, nie wymienionych drobnych uwag, wg mojej opinii, nie mają istotnego wpływu na wartość i jakość pracy zaprezentowanej mi do recenzji. Wysoko oceniam sposób przedstawienia aktualnego stanu wiedzy z dziedzin nauki odnoszących się do tematu prowadzonych przez Autorkę. Ogólnie można stwierdzić, że praca doktorska mgr Karoliny Piecyk stanowi wartościowy wkład w dziedzinę chemii kwasów nukleinowych, a szczególnie w chemię kapu – końcowego odcinka RNA. Badania wykonane w ramach recenzowanej pracy doktorskiej są oryginalnymi i stanowią poważne osiągnięcie Doktorantki.

Reasumując stwierdzam, że dysertacja pt.

**Synteza i badania biologiczne analogów 5' końca mRNA) zawierających
modyfikowaną w pozycji N2 i N7 guanozynę**

odpowiada w pełni wymaganiom stawianym pracom na stopień doktora i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Karoliny Piecyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.





Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Poznań, 9 września 2013 r.

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Piecyk zatytułowanej
„Synteza i badania biologiczne analogów 5' końca mRNA zawierających
modyfikowaną w pozycji N2 i N7 guanozynę”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Karoliny Piecyk powstała w grupie badawczej kierowanej przez dr hab. Marzenę Jankowską-Anyszkę. Jest to szczególnie interesująca rozprawa doktorska, gdyż pokazuje w sposób modelowy, jak można prowadzić ważne badania naukowe w interdyscyplinarnej grupie badawczej. W grupie tej oprócz chemików bioorganików spotykają się biofizycy, biochemicy i biolodzy, a każdy z nich wnosi do wspólnych badań swój własny profesjonalizm.

Rozprawa doktorska liczy 150 stron i składa się z kilku rozdziałów, z których najważniejsze to: część literaturowa, omówienie i dyskusja uzyskanych wyników. Ponadto, w rozprawie doktorantka przedstawiła także: cel badań i ich streszczenie, dokładny opis prowadzonych eksperymentów, wykaz publikacji.

Mgr Karolina Piecyk rozpoczęła rozprawę od omówienia w „części literaturowej” zagadnień związanych z strukturą kapu, zwracając szczególną uwagę na jego funkcje biologiczne, biosyntezę oraz oddziaływania z białkowym czynnikiem inicjującym eIF4E oraz snurportyną. Ten rozdział pozwala lepiej zrozumieć cel i ważność badań prowadzonych przez mgr Karolinę Piecyk. W szczególności dotyczy to tego fragmentu, w którym omawia funkcje końca 5' mRNA w procesie translacji, w tym jego oddziaływania z białkami regulującymi ten proces. Rozdział ten, wszystkie zawarte w nim informacje nabierają dodatkowej ważności, jeśli zestawimy go celem badań doktorantki. Pozwala lepiej zrozumieć zasadność modelowych struktur fragmentów kapu, które kandydatka zsyntetyzowała. Modyfikowane pochodne kapu, które przygotowała mgr Piecyk w pierwszym momencie wydają się dość „egzotyczne”, jednakże lektura tego rozdziału pozwala zrozumieć kryteria wyboru podstawników modyfikujących

guanozynę w pozycjach N2 lub N7. Wybór proponowanych przez doktorantkę podstawników reszty guanozynowej staje się szczególnie zrozumiały, jeśli uwzględni się to co wiadomo dotychczas o strukturalnych uwarunkowaniach oddziaływań kapu z eIF4E i snurportyną.

W dalszej kolejności doktorantka przedstawia cel swoich badań. Dla lepszego jego zrozumienia należy dodać, że obserwuje się silną zależność pomiędzy aktywnością białka eIF4E (które rozpoznaje kap, co jest istotne do inicjacji procesu translacji) a procesem nowotworzenia i apoptozy. Wcześniejsze badania prowadzone w grupie profesora Edwarda Darżynkiewicza skupiały się na poszukiwaniu związków o silnym powinowactwie do eIF4E, które mogłyby selektywnie inhibować działanie czynnika inicjującego 4E w komórkach ulegających niekontrolowanemu wzrostowi. Wyniki badań uzyskanych przez grupę profesora Darżynkiewicza sugerowały, że określone typy podstawników w pozycjach N2 i/lub N7 guanozyny w fragmencie kap mogą wzmocnić selektywność inhibicji translacji mRNA. Właśnie chemicznej syntezy tak modyfikowanych pochodnych guanozyny podjęła się mgr Piecyk i jej promotorka. Celem rozprawy doktorskiej było nie tylko przygotowanie samych modyfikowanych pochodnych guanozyny, ale także ich 5'-monofosforanów i w dalszej kolejności wybranych dinukleotydowych analogów kapu. Ponadto, dla kilku z nich mgr Piecyk przygotowała ich biokoniugaty z białkiem penetrującym MPS.

Najciekawsza część rozprawy doktorskiej dotyczy badań własnych. Celem mgr Piecyk była chemiczna synteza kilkudziesięciu strukturalnie dość podobnych pochodnych guanozyny. Bardzo sensownym wydaje się, więc podejście, które prowadzi do przygotowanie prekursorowej pochodnej, która traktowana specyficznym związkiem chemicznym zostanie przekształcona w określoną N2 podstawioną pochodną guanozyny. Z kilku możliwych podejść mgr Piecyk zdecydowała, że prekursorową pochodną będzie trójacetylowana pochodna inozyny, z blokadą układu laktamowego i podstawnikiem fluorowym w pozycji 2. W literaturze zostało dobrze opisane, że tego typu pochodna ulega wydajnej substytucji w pozycji 2 za pomocą odpowiednich amin. Doktorantka zoptymalizowała warunki syntezy prekursorowej pochodnej inozyny z całkowitą wydajnością około 70%. Na szczególną uwagę zasługuje kolejny etap syntezy, w którym w pozycji 2 wprowadzony zostanie podstawnik fluorowy. Z spośród trzech testowanych wybrała metodę polegającą na traktowaniu substratu azotynem *tert*-butylu i fluorowodorem w pirydynie. Szkoda, że doktorantka zapomniała podać w tym miejscu, kto jest autorem oryginalnej procedury. Stosując odpowiednie aminy alifatyczne i aromatyczne, zarówno pierwszorzędowe, jak i drugorzędowe, uzyskała N2-podstawione pochodne guanozyny z wydajnościami rzędu 41-86%.

W następnym etapie większość z nich została metodą Yoshikawy przekształcona w odpowiednie 5'-monofosforany. Jedynie informacja doktorantki, że jest to metoda od wielu lat stosowana w grupie

badawczej powstrzymuje mnie od krytyki, że nie próbowała użycia nowszych metod fosforylacji. Na miejscu doktorantki pokusiliby się też o inną, niż użycie kolumny z DEAE-Sephadex'em, metodę oczyszczania docelowych pochodnych 5'-monofosforanów guanozyny. Chodzi mi głównie o pracochłonność tej metody, zwłaszcza, że kandydatka przygotowała kilkanaście takich pochodnych. Z własnego doświadczenia wiem, że podobne pochodne dobrze rozdzielają się na silikażelowych płytach TLC rozwijanych w odpowiednio dobranej mieszaninie wody i acetonitrylu. Ostatni etap tego cyklu syntezy to metylowanie w pozycji N7 5'-monofosforanów N2-podstawionych pochodnych guanozyny. Do tego celu użyła klasycznego podejścia, polegającego na traktowaniu substratu jodkiem metylu, co pozwoliło otrzymać pożądane podstawione pochodne guanozyny.

Bardzo interesujące były także dwie pochodne, w których podstawnik w pozycji N2 zawierał wiązanie potrójne (alkinowe). Pozwoliło to mgr Piecyk uzyskać poprzez cykloaddycję Huisgena odpowiednie pochodne zawierające w pozycji N2 podstawiony pierścień triazolowy. Chcąc zapewnić optymalne warunki syntezy tych pochodnych kandydatka sprawdziła kilka alternatywnych metod decydując się w końcu na podejście oparte o N2-alkinowaną pochodną guanozyny i odpowiedni azydek. Podejście takie jest o tyle optymalne, że użycie różnych azydków może prowadzić do powstania różnych pochodnych i rzeczywiście doktorantka wychodząc z dwóch pochodnych N2-alkinowanych guanozyny przygotowała pięć pochodnych triazolowych.

Mgr Piecyk przygotowała też szereg pochodnych 5'-monofosforanów guanozyny lub jej N2,N2-dimetylowanych analogów i zawierających w pozycji N7 różnego typu podstawniki. Podobnie, jak dla pochodnych guanozyny omówionych wcześniej, wybór podstawników w pozycjach N2 i N7 guanozyny podyktowany był uzyskaniem optymalnej inhibicji translacji mRNA. Także w tym przypadku struktura podstawników guanozyny została wybrana w oparciu o badania krystalograficzne kompleksów białka eIF4E i różnych analogów kapu.

Jest rzeczą niezwykle cenną, że mgr Piecyk nie tylko zsyntetyzowała szereg podstawionych pochodnych 5'-monofosforanu guanozyny, ale także przeprowadziła badania biologiczne, w których w układach bezkomórkowych badała ich wpływ na inhibicję translacji mRNA. Dla pięciu z nich mgr Piecyk wykonała pomiary inhibicji translacji (IC_{50}) w bezkomórkowym ekstrakcie z retikulocytów króliczych. Większość z nich wykazała inhibicję na poziomie referencyjnego N7-metyloGTP oraz N7-metylowanego kapu (m^7GpppG). Interesującym byłoby się dowiedzieć, czemu badania takie ograniczyła jedynie dla pięciu pochodnych guanozyny (przygotowała ich przecież 20) oraz czym tłumaczy ich dość ograniczoną aktywność inhibującą. Czy znaczy to, że struktura wybranych podstawników alkilowych pochodnych GMP nie była optymalnie przewidziana?

Dla większej grupy inhibitorów (dla 14 pochodnych) doktorantka dokonała podobnych pomiarów inhibicji translacji w bezkomórkowym ekstrakcie z pasożytniczych nicieni *Ascaris suum*. Badania te prowadzone były podczas kilku pobytów kandydatki w laboratorium dr Richarda Davisa w Stanach Zjednoczonych. Obserwowała pewne zależności pomiędzy strukturą pochodnych GMP oraz ich aktywnością inhibującą. Obserwowany poziom inhibicji był znaczący, jakkolwiek jedynie dla jednej pochodnej był szczególnie wyraźny.

Syntezy odpowiednich pochodnych guanozyny dominowały jednak w badaniach mgr Piecyk. Bardzo ambitnie wygląda także kolejny etap jej badań, w którym różnego typu N2 i/lub N7 postawione pochodne 5'-monofosforanów guanozyny były substratami do przygotowania modelowych dinukleotydowych pochodnych kapu. Metoda syntezy dinukleotydowych pochodnych kapu jest dobrze rozwinięta w grupie profesora Darżynkiewicza i zapewne z porad dr hab. Jacka Jemielitego doktorantka korzystała. W sumie przygotowała kilkanaście w różny sposób modyfikowanych pochodnych kapu. Obecnie są badane ich oddziaływania z snurportyną. Jest to nowy projekt badawczy, w którym uczestniczy grupa promotorki mgr Piecyk i dotyczy regulacji procesu dojrzewania pre-mRNA związanego z dystrofią mięśniową Duchenne'a. Snurportyna jest białkiem odpowiedzialnym za transport do jądra RNA zakończonych kapem. Stosując metodę pomiaru wygaszania fluorescencji snurportyny doktorantka określiła stałe wiązania białka i trzech modelowych pochodnych kapu.

Ostatnim zadaniem badawczym mgr Piecyk była chemiczna synteza koniugatu zawierającego dinukleotydowy analog kapu i peptydu penetrującego błonę komórkową (CPP). Doktorantka sama przygotowała 16 aminokwasowy peptyd MPS. Chcąc na późniejszym etapie połączyć oba składniki, modelowy kap zaopatrzyła w podstawnik alkinowy a peptyd w grupę azydkową. Rozumiem, że peptyd MPS miał zawierać grupę azydkową, ale jestem przekonany, że przygotowanie tak modyfikowanego peptydu można było zlecić firmie zewnętrznej za rozsądną cenę lub nawiązać współpracę z grupą badawczą w Polsce, która chemiczną syntezę peptydów prowadzi regularnie. Uważam, ten fragment badań w wykonaniu doktorantki za zbędny.

Podsumowując wyniki zebrane przez mgr Karolinę Piecyk pragnę stwierdzić, że są one bardzo ciekawe. Najwyżej cenię w badaniach mgr Piecyk ich różnorodność, bo oprócz chemicznej syntezy różnego typu modelowych cząsteczek kap prowadziła ona z powodzeniem badania fizykochemiczne i biologiczne. Chociaż uważam to za zbędne, podjęła się także chemicznej syntezy sporych rozmiarów peptydu MPS. W tym momencie uzyskane wyniki inhibicji translacji są umiarkowane, ale optymistyczne, gdyż wiele związków jest w dalszym ciągu badanych przez doktorantkę lub współpracujące zespoły

badawcze. Godna pochwały, oprócz różnorodność prowadzonych badań, jest staranność ich prowadzenia oraz wyraźnie widoczna dociekliwość naukowa mgr Karoliny Piecyk.

Nie mam większych zastrzeżeń do prowadzonych przez mgr Piecyk badań. Oczywiście niektóre syntezy czy przeprowadzone badania można byłoby zrobić inaczej, ale te, które wykonała kandydatka są prawidłowe. Prowadząc syntezy testowała ona różne podejścia, wybierając to, które dawało najlepsze wyniki. Jest to bardzo cenna cecha młodego naukowca.

Sama rozprawa doktorska mgr Piecyk jest napisana dobrze, czyta się ją z zaciekawieniem. Jest szereg starannie wykonanych ilustracji, schematów syntez czy tabel, które są bardzo przydatne podczas czytania rozprawy. Z drobnych rzeczy, które można byłoby zmienić to, na przykład, nie napisałbym, że translacji ulegają organizmy eukariotyczne tylko ich mRNA (strona 39). Sądzę, że użycie określenia „struktura” dla nazwania określonej pochodnej nie jest najlepsze (strona 40 i w kilku innych miejscach rozprawy). Ponadto, grupy ochronne z nukleozydów czy nukleotydów się raczej odblokowuje czy usuwa a nie „odbezpiecza” (strona 51). Być może jest to wynik mojego osobistego uczulenia na różnorodność odstępów pomiędzy poszczególnymi wyrazami w zdaniu (chodzi mi o ilość odbić pomiędzy wyrazami), ale w pracy doktorskiej bardzo często są one różne, co świadczy o pośpiechu w pisaniu rozprawy doktorskiej albo pewnej nieuwadze doktorantki.

Podsumowując swoją recenzję pragnę stwierdzić, że dorobek badawczy mgr Karoliny Piecyk jest znaczący. Najwyżej cenię w rozprawie doktorskiej kompleksowy sposób prowadzenia badań, ich interdyscyplinarny charakter. Fakt, że jest współautorką kilku publikacji bardzo dobrze świadczy o mgr Piecyk i wysokim poziomie badań, jakie prowadzi.

Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Karoliny Piecyk spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Piecyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ryszard Kienel

