



Wydział Chemiczny W3
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania K15

Wrocław, 30.09.2023 r.

Dr hab. inż. Marcin Poręba, prof. uczelni

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej

Na Grobli 13/15, L1, 336, 50-421 Wrocław

Tel: 795 350 888; email: marcin.poreba@pwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„Synteza i biofizyczna charakterystyka modyfikowanych fragmentów ogona poli(A)
jako narzędzi do manipulowania metabolizmem mRNA”**

autorstwa Pani mgr Olgi Perzanowskiej

Recenzja została sporządzona dla Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne
Uniwersytetu Warszawskiego.

Praca doktorska Mgr Olgi Perzanowskiej, zatytułowana "Synteza i biofizyczna charakterystyka modyfikowanych fragmentów ogona poli(A) jako narzędzi do manipulowania metabolizmem mRNA" została zrealizowana w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW oraz w zakładzie Biofizyki IFD, Wydziału Fizyki UW. Pod kierunkiem prof. Jacka Jemielitego oraz dr hab. Joanny Kowalskiej, praca nie tylko eksploruje skomplikowane aspekty syntezy i stabilności modyfikowanych oligonukleotydów, ale także umiejętnie ukazuje ich znaczenie w kontekście projektowania nowych związków terapeutycznych.

Praca obejmuje 192 strony i jest podzielona na sześć głównych rozdziałów: Cel pracy, Część literaturową, Badania własne, Podsumowanie, Część eksperymentalną oraz Bibliografię. Dodatkowo zawiera sekcje dotyczące wykazu skrótów, dorobku naukowego, oraz streszczenia. Praca zawiera 95 rysunków oraz 2 tabele. Bibliografia składa się z aż 406 pozycji, z przewagą publikacji z międzynarodowych czasopism naukowych, wydanych w ostatnich latach. Należy jednak podkreślić, że wśród bibliografii znalazły się także klasyczne cytowania dotyczące maszyneryi mRNA. Źródła bibliograficzne zostały zatem starannie dobrane do tematyki pracy doktorskiej.

Do tej pory powstała jedna publikacja naukowa, która jest bezpośrednio związana z tematyką pracy doktorskiej (praca w „Chemistry – A European Journal”), natomiast druga publikacja jest w przygotowaniu. W obu pracach Autorka jest/będzie pierwszym autorem. Wyniki pracy były przedstawione przez Autorkę na 10 konferencjach naukowych w postaci



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



posterów lub wystąpień ustnych. Dorobek naukowy uzupełniają dwie prace opublikowane w Scientific Reports oraz Nature Chemistry.

Praca doktorska miała na celu opracowanie metod modyfikacji końca 3' mRNA w celu regulacji jego stabilności i zdolności translacyjnych. Badania rozpoczęto od analizy wpływu różnych modyfikacji chemicznych i strukturalnych na koniec 3' mRNA oraz na interakcje z białkiem PABP (ang. polyA-binding protein). Wyniki tych eksperymentów posłużyły do opracowania metody modyfikacji cząsteczek mRNA, które miały na celu zwiększenie ich stabilności i potencjału translacyjnego, co jest istotne w kontekście potencjalnego wykorzystania terapeutycznego. W pracy skoncentrowano się na identyfikacji modyfikacji chemicznych w ogonie poli(A) mRNA, które mogą być wykorzystane do produkcji cząsteczek mRNA o zwiększonym powinowactwie do celu molekularnego oraz zwiększonej stabilności enzymatycznej.

Cel pracy (**Rozdział I**) stanowi wprowadzenie do tematyki doktoratu i informuje czytelnika, że rozprawa składa się z dwóch głównych części: przeglądu literatury i badań własnych. W pierwszej części omówiono budowę i metabolizm mRNA oraz potencjalne zastosowania terapeutyczne tej cząsteczki. Omówiono także metody syntezy i modyfikacji RNA oraz wprowadzono czytelnika w technologię termoforezy mikroskalowej MST, która była jednym z podstawowych narzędzi pracy Autorki. Druga część zawiera opis badań przeprowadzonych w ramach projektu. Przedstawiono proces syntezy wybranych oligonukleotydów, oraz proces opracowania i optymalizacji metody wykorzystującej termoforezę mikroskalową do badania interakcji między białkiem PABP a modyfikowanymi oligonukleotydami poli(A). Dodatkowo, omówiono nową metodę chemoenzymatycznej modyfikacji końca 3' mRNA i zbadano właściwości modyfikowanych cząsteczek mRNA w różnych układach komórkowych. Rozdział ten pozwolił czytelnikowi zrozumieć kontekst badań i nabrać odpowiedniej perspektywy w dalszym czytaniu.

Część literaturowa pracy doktorskiej (**Rozdział II**) rozpoczyna się od wprowadzenia do roli mRNA jako kluczowej biomolekuły w organizmach żywych, w szlaku przekazywania i wykorzystania informacji genetycznej. Rozdział ten jest bardzo przemyślany i należy tu podkreślić bardzo szeroką i dogłębną wiedzę Autorki na temat podjętej tematyki badawczej rozpoczynając od syntezy organicznej aż po badania *in vivo* i immunoterapie. Autorka skupia się na opisie struktury i funkcji mRNA, zwłaszcza końca 3', który zawiera ogon poli(A), pełniący istotną rolę w metabolizmie mRNA. Ogon ten jest bowiem miejscem interakcji z różnymi białkami, co wpływa na stabilność i potencjał translacyjny mRNA. Następnie omówiono znaczenie modyfikacji nukleotydowych w komórkowych procesach związanych z mRNA, a także zastosowanie oligonukleotydów



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



w medycynie i biosensorach. Warto zwrócić uwagę na opis technologii terapeutycznych oligonukleotydów i ich rosnące znaczenie w medycynie. Dalsza część pracy koncentruje się na syntezie cząsteczek mRNA i ich zastosowaniach w zakresie terapii genowej i medycynie regeneracyjnej. Szczególną uwagę Autorka poświęciła szczepionkom mRNA w terapiach antynowotworowych oraz antywirusowych. W tym rozdziale Autorka umiejętnie łączy opis struktury i mechanizmu działania tych terapeutyków z opisem mechanizmów immunologicznych, które determinują działanie takich farmaceutyków.

W dalszej części Autorka omawia również dotychczasowe metody modyfikacji ogona poli(A) syntetycznych mRNA oraz techniki syntezy RNA, co ma ogromne znaczenie w kontekście realizowanej pracy doktorskiej. Pod koniec wstępu Autorka wprowadza czytelnika w temat termoforezy mikroskalowej, przedstawiając jej podstawy fizykochemiczne i zastosowania w badaniach molekularnych, skupiając się na badaniach oddziaływań między białkiem PABP a modyfikowanymi analogami ogona poli(A). Wszystkie te elementy tworzą solidny kontekst dla badań przeprowadzonych w ramach projektu doktorskiego, co pozwala czytelnikowi zrozumieć znaczenie i celowość tego projektu. Ponadto, kluczowe informacje, zwłaszcza te dotyczące skomplikowanych mechanizmów działania i metabolizmu mRNA, wizualizowane są kolorowymi rycinami, które dodatkowo pomagają zrozumieć czytelnikowi najważniejsze aspekty pracy doktorskiej.

Kolejny rozdział (**Rozdział III**) to badania własne, które Autorka rozpoczyna od przedstawienia ich planu. Autorka bardzo dokładnie przedstawia wybór układu pomiarowego oraz strategię otrzymywania reagentów do badań, które stanowiły o sile warsztatu badawczego dla osiągnięcia celów badawczych i weryfikacji postawionych hipotez. Plan badań uzupełnia bardzo starannie wykonany abstrakt graficzny, który podsumowuje cztery główne obszary badań podjętych przez Autorkę: badanie oddziaływania PABP-poli(A), ewaluacja stabilności enzymatycznej, badanie inhibicji translacji oraz modyfikacja mRNA. Łącznie Autorka przeprowadziła syntezę 29 analogów poli(A), poddając je różnym modyfikacjom chemicznym, tj. metylując grupę 2'-OH (analogi **A_m1-A_m7**), wprowadzając grupy tiofosforanowe (analogi **A_p1-A_p10**), wymieniając grupę 2'-OH na atom fluoru (analogi **A_f1-A_f3**), metylując adenozyne w pozycji 6 (analogi **m⁶A1-m⁶A3**), wymieniając adeninę na guaninę (analogi **G1-G3**), czy w końcu stosując niemodyfikowane analogi o różnej długości (**A11-A13**). Zasadność wprowadzenia każdej ze zmian została częściowo uargumentowana dostępnymi danymi literaturowymi, choć należy również zaznaczyć, że część z tych zmian miała charakter pionierski w celu zbadania nowych oddziaływań pomiędzy analogami poli(A) a białkiem PABP. Do tych badań została



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



wykorzystana termoforeza mikroskalowa z wykorzystaniem sond znakowanych fluorescencyjnie. Ta technika charakteryzuje się wysoką czułością i umożliwia dokładne określenie stałych dysocjacji w szerokim zakresie stężeń, od wartości pikomolarnych do milimolarnych, co jest istotne w badaniach silnych oddziaływań białko-ligand. Natomiast same sondy, również poddano wstępnej analizie, by zdecydować, która z nich jest najlepsza do pomiarów kompetycyjnego wiązania modyfikowanych analogów poli(A) do PABP. Wyniki pomiarów wykazały, że istnieją wyraźne zależności między strukturą oligonukleotydów a ich powinowactwem do białka PABP¹⁻¹⁹⁰. W zakresie lokalizacja danej modyfikacji Autorka wykazała wyraźną korelację między umiejscowieniem modyfikacji w łańcuchu oligonukleotydu a jego zdolnością do oddziaływania z białkiem. Oligonukleotydy zawierające modyfikacje w środkowej części sekwencji wykazywały słabsze powinowactwo niż te zawierające analogiczne modyfikacje na końcach łańcucha. W kontekście liczby modyfikacji stwierdzono, że w miarę ich zwiększania, powinowactwo oligonukleotydów do białka PABP¹⁻¹⁹⁰ maleje. Oligonukleotydy z licznymi modyfikacjami, takie jak **A_m4**, **A_m6/SPOT-ON**, **A_p10**, wykazywały słabsze oddziaływanie z białkiem w porównaniu do niemodyfikowanych analogów oraz tych z pojedynczymi punktowymi modyfikacjami. Ciekawym wnioskiem było m.in. to, że analogi zawierające modyfikacje tiofosfodiesterowe nie wykazywały wyraźnej zależności między lokalizacją i liczbą modyfikacji, a ich zdolnością do oddziaływania z białkiem PABP. Wszystkie modyfikowane analogi wykazywały nieco słabsze powinowactwo do białka w porównaniu do analogu niemodyfikowanego. Zebrane obserwacje mają duże znaczenie w zrozumieniu specyfiki oddziaływań między oligonukleotydami ogona poli(A) a białkiem PABP, co może mieć wpływ na rozwijanie terapeutycznych strategii z wykorzystaniem modyfikacji mRNA.

W kolejnym etapie Autorka przeprowadziła badania podatności otrzymanych analogów na degradację enzymatyczną z udziałem enzymu CNOT7. Autorka wykazała istnienie silnej zależności między rodzajem modyfikacji i jej umiejscowieniem w sekwencji oligonukleotydu a podatnością na enzymatyczną degradację. Modyfikacje takie jak 2'-O-metyloadenozyna, 2'-fluoroadenozyna oraz wiązanie tiofosfodiesterowe całkowicie hamowały aktywność enzymu CNOT7, zapewniając odporność na degradację. Oligonukleotydy zawierające te korzystne modyfikacje w pobliżu końca 3' były szczególnie odporne na degradację enzymatyczną. W przypadku oligonukleotydów z modyfikacjami oddalonymi od końca 3', obserwowano stopniową degradację, aż do napotkania przez enzym modyfikowanej podjednostki. Modyfikacje takie jak m⁶A oraz guanozyna, jak również niemodyfikowane oligonukleotydy, ulegały szybkiej degradacji przez enzym CNOT7.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Badania te jednoznacznie pokazały, że celowane modyfikacje oligonukleotydów mogą znacząco wpłynąć na ich stabilność chemiczną.

Autorka zbadala również otrzymane analogi jako potencjalne inhibitory translacji. Badane te wykazały zdolność do skutecznego obniżania poziomu produkcji białka reporterowego w stopniu większym niż znany inhibitor translacji, SPOT-ON. Wyraźnie zauważono korelację między powinowactwem badanych analogów poli(A) do rekombinowanego PABP a ich aktywnością jako inhibitorów translacji. Sugeruje to, że metoda badania powinowactwa kompleksów PABP z analogami poli(A) pozwala na efektywną identyfikację modyfikacji chemicznych i ich lokalizacji, które nie zakłócają oddziaływania z PABP. Co więcej, Autorka pokazała, że badane inhibitory oddziałują z pełnymi cząsteczkami PABP niezależnie od inhibitora specyficznego blokującego aktywność białka eIF4E. To wskazuje na specyficzną rolę oligonukleotydowych inhibitorów przez wiązanie cząsteczek PABP i ograniczenie ich roli w procesie inicjacji translacji. Autorka podkreśliła jednak, że przy interpretacji tych wyników, należy uwzględnić ograniczenia związane z wykorzystaniem systemu lizatów retikulocytów króliczych (RRL) w badaniach translacji, który jest uproszczonym modelem i nie odzwierciedla w pełni złożoności procesów translacyjnych zachodzących w komórkach *in vivo*. Podsumowując, wyniki eksperymentów wydajności translacji wraz z analizą potencjalnych inhibitorów PABP dostarczyły cennych informacji dotyczących aktywności tych inhibitorów i potencjału ich wykorzystania jako narzędzi badawczych. Wskazują również na możliwość wykorzystania opracowanej metody badania powinowactwa PABP do identyfikacji korzystnych modyfikacji chemicznych w oligonukleotydach poli(A) celem maksymalizacji efektów stabilizacyjnych inhibitorów przy zachowaniu ich powinowactwa do PABP. To innowacyjne podejście pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących stabilność i potencjał translacyjny mRNA oraz stanowi istotny wkład w dziedzinę badań nad terapeutycznymi modyfikacjami mRNA.

Druga część pracy eksperymentalnej zawartej w **Rozdziale III** dotyczyła opracowania i walidacji metody chemo-enzymatycznej modyfikacji cząsteczek RNA. Pierwszym zadaniem tej części projektu była synteza chemicznie modyfikowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów, które różniły się rodzajem zasady azotowej (A lub G) oraz rodzajem modyfikacji chemicznych (2'-O-metylacja lub wiązanie tiofosfodiesterowe). Kolejne zadanie to chemo-enzymatyczne modyfikacje końca 3' oligonukleotydów RNA oraz mRNA, gdzie Autorka zoptymalizowała metodę przyłączania zsyntezowanych 5'-monofosforanów dinukleotydów do końca 3' RNA za pomocą ligacji enzymatycznej. Metodę tę zastosowano następnie do modyfikacji zarówno krótkich oligonukleotydów



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
www.pwr.edu.pl

REGON: 00001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



poliadenylowych, jak i mRNA kodującego białko reporterowe lucyferazę Gaussia. Ostatni punkt dotyczył badania ekspresji modyfikowanych mRNA. Przeprowadzono eksperymenty wydajności translacji w układzie retikulocytów króliczych (RRL) oraz badania *in cellulo* na trzech różnych liniach komórkowych (A549, JAWS II, HEK 293). Celem tych badań było zbadanie wpływu modyfikacji chemicznych na ekspresję mRNA. W tym zadaniu Autorce udało się zidentyfikować modyfikacje końca 3' transkryptów o najkorzystniejszym wpływie na ich potencjał translacyjny.

Rozdział IV stanowi podsumowanie otrzymanych wyników, w którym Autorka jeszcze raz prezentuje najważniejsze obserwacje. Po pierwsze, opracowano nową metodę badania opartą o termoforezę mikroskalową, która pozwala na zrozumienie, jak modyfikacje w oligonukleotydach poli(A) wpływają na ich oddziaływanie z białkiem PABP, co może pomóc w identyfikacji potencjalnych inhibitorów translacji. Po drugie, opracowano skuteczną technikę modyfikacji RNA, co umożliwiło uzyskanie bardziej stabilnych i lepiej translowanych cząsteczek mRNA. Autorka planuje prowadzić dalsze badania na organizmach modelowych w celu potwierdzenia użyteczności tej metody w terapii genowej, produkcji terapeutycznych przeciwciał i szczepionek przeciwko chorobom wirusowym i nowotworowym. W mojej ocenie wysoka wartość tych osiągnięć wynika z ich potencjalnego wpływu na rozwijanie skuteczniejszych terapii i leków.

Ostatnim akordem pracy doktorskiej jest część eksperymentalna (**Rozdział V**). Autorka przedstawia w nim dokładne przepisy preparatywne dotyczące syntezy oligonukleotydów oraz ich analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas. Rozdział zawiera także dokładne informacje na temat białek wykorzystanych do badań biologicznych oraz przepisy dotyczące prowadzonych reakcji enzymatycznych, pomiarów z wykorzystaniem mikroskalowej termoforezy i w końcu badania wydajności procesu translacji *in vitro* oraz *in cellulo*.

W mojej ocenie praca doktorska Pani Olgi Perzanowskiej jest doskonale zaprojektowanym i ciekawym projektem badawczym, który koncentruje się na dwóch istotnych aspektach: badaniu powinowactwa modyfikowanych oligonukleotydów poli(A) do białka PABP oraz opracowaniu skutecznej metody modyfikacji RNA. To podejście jest nie tylko nowatorskie, ale także starannie przeprowadzone, z głębokim zrozumieniem tematyki badawczej. Moim zdaniem wszystkie obserwacje w pracy zostały trafnie zinterpretowane, a uzyskane rezultaty stanowią istotny wkład w badaną dziedzinę. Należy tutaj również podkreślić interdyscyplinarność projektu, gdyż badania te łączą chemię organiczną, biochemię, biologię molekularną i inżynierię genetyczną. Ponadto badania posiadają duży potencjał aplikacyjny, gdyż opracowane metody mogą znaleźć zastosowanie w terapii



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



genowej, produkcji terapeutycznych przeciwciał i szczepionek przeciwko chorobom wirusowym i nowotworowym. Warsztat badawczy prezentowany w pracy jest solidny, a eksperymenty zostały przeprowadzone z dbałością o szczegóły i dokładność.

Oceniając pracę w warstwie edytorskiej chciałbym podkreślić, że praca jest bardzo atrakcyjna i z przyjemnością się ją czyta. Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych potknięć, które z obowiązku recenzenta wymienię poniżej.

1) Na stronie 19 Autorka wśród zasad heterocyklicznych z grupy pirymidyn wymienia cytydynę, a powinna napisać cytozyną, gdyż cytydyna to oczywiście nukleozyd.

2) Na stronie 21 przy opisie Rysunku 3 (oraz w tekście) zabrakło wyjaśnienia skrótów 5' UTR oraz 3' UTR. Wyjaśnienia te znalazłem dopiero w wykazie skrótów (jako fragment sekwencji mRNA nieulegający translacji).

3) Jak już wcześniej wspomniałem, w przeglądzie literaturowym, wszystkie informacje w tekście są wizualizowane kolorowymi rycinami. Szkoda jednak, że Autorka nie zdecydowała się samodzielnie sporządzić tych rysunków i podpisać je w języku polskim, co byłoby spójne z rysunkami zawartymi w części eksperymentalnej.

4) Zwróciłbym także uwagę na fakt, że przy sporządzaniu wykresów, argumenty funkcji (na osi odciętych, x) powinny być zapisywane następująco – nazwa jednostki miary w nawiasie kwadratowym i jej wymiar już bez nawiasu, czyli np. [czas], min. Zgodnie bowiem z zasadami metrologii, nawias kwadratowy jest operatorem, który przekształca jednostkę miary pokazując jej wymiar. Poprawny zapis Autorka zastosowała m.in. na Rysunkach 59-61 ([ligand] nM), ale zaczynając już od Rysunku 68, tę notację należałoby poprawić (czas [min]).

W warstwie merytorycznej pracę doktorską również oceniam bardzo wysoko, co kilkakrotnie podkreśliłem wcześniej. Jednak korzystając z przywileju recenzowania pracy chciałbym podzielić się kilkoma obserwacjami oraz zadać Autorce kilka pytań dotyczących prowadzonych badań.

1) Na stronie 122 Autorka pisze: „Jednym z potencjalnych zastosowań cząsteczek, które **specyficznie** oraz z **wysokim powinowactwem** wiążą konkretne cele molekularne...”. Czy słowo „specyficznie” nie jest tożsame z wyrażeniem „wysokie powinowactwo”. W enzymologii bardzo często słowo „specyficzne” oznacza wysoką wydajność hydrolizy, dużą szybkość katalizy etc. Czy w tym przypadku to słowo nie powinno być zastąpione wyrazem „selektywne”, co oznacza, że dany związek (tutaj badany oligonukleotyd) wiąże się tylko z jednym celem molekularnym.

2) Inwersja krzywych wiązania oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych do PABP w zależności od użytego fluoroforu jest bardzo ciekawa (Rysunek 60). Autorka



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



podjęła również próbę wyjaśnienia tego zjawiska. A czy w literaturze również zaobserwowano ten efekt, dotyczący oczywiście innych par sonda-białko, ale z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej? Karboksylfluoresceina oraz cyjanina 5 są bardzo popularnymi znacznikami fluorescencyjnymi, więc może takie efekty zostały wcześniej opisane?

3) Co oznacza stwierdzenie że sonda **A₀-2** jest niestabilna (*strona 106*)? Czy Autorka miała na myśli stabilność fotochemiczną czy chemiczną? W jaki sposób stwierdzono rozpad (utrata właściwości) tego związku?

4) Czy istnieją inne doniesienia literaturowe, które opisują wykorzystanie termoforezy mikroskalowej do badania oddziaływań modyfikowanych fragmentów ogona poli(A) z białkiem PABP?

5) Dodanie detergentu do buforów w pomiarach *in vitro* zazwyczaj pozwala wyeliminować niespecyficzne wiązania pomiędzy ligandem a receptorem, jednak z drugiej strony osłabia również te oddziaływania, które są przedmiotem analiz. Czy zasadne byłoby także przeprowadzenie badań w buforze bez obecności Tween 20?

6) Na *stronie 95* Autorka napisała, że struktura otrzymanych związków nie została potwierdzona za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, gdyż związki są długie i mają skomplikowaną strukturę. Oczywiście brak tych widm nie jest żadną wadą prowadzonych prac eksperymentalnych, gdyż Autorka syntetyzowała swoje związki na podłożu stałym w schemacie syntezy blokowej i wykorzystując komercyjnie dostępne bloki budulcowe, co minimalizuje możliwość popełnienia błędu. Jednak czy w literaturze oligonukleotydy o takiej (lub podobnej) długości są analizowane za pomocą ¹H NMR?

7) Czy w procesie poszukiwania nowych oligonukleotydów wiążących się z wysokim powinowactwem np. do białka PABP zasadne byłoby wykorzystanie kombinatorycznych bibliotek takich związków – podobnie, jak jest to wykorzystywane w przypadku bibliotek peptydów analizowanych względem danych enzymów? Czy takie rozwiązanie jest może praktykowane w poszukiwaniu optymalnych sekwencji mRNA do celów diagnostycznych lub terapeutycznych? Czy możliwa jest synteza a następnie dekonwolucja takich bibliotek?

8) W pracy kilkakrotnie wybrzmiało, że aby mRNA miało duży potencjał terapeutyczny musi być odpowiednio stabilne w komórce. Temu zagadnieniu poświęcono zresztą dużą część badań i pokazano wprost, że większa stabilność silnie koreluje z większą ekspresją białek. A czy istnieje górna granica takiej stabilności? Jakie są potencjalne (teoretyczne) zagrożenia wprowadzenia do komórki ultra-stabilnych mRNA?



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Politechnika Wrocławska

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska w świetle obowiązujących przepisów spełnia wszystkie wymagania, by na jej podstawie dopuścić Panią mgr Olę Perzanowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co uprzejmie proszę Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego. Jednocześnie, w związku z dużą wartością naukową pracy doktorskiej, wynikającą z przeprowadzenia interdyscyplinarnych badań i uzyskania bardzo ciekawych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym, wnoszę o jej wyróżnienie.

Z poważaniem,

Marcin Poręba



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434