



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Łódź, dn. 09.01.2024



Instytut Chemii Organicznej
Politechniki Łódzkiej

Dr hab. inż. Katarzyna Błazewska, prof. uczelni
Instytut Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANA MGR. MATEUSZA
KOZARSKIEGO PT. „MODYFIKOWANE NUKLEOTYDY JAKO NARZĘDZIA
DO BADANIA BIAŁEK ZAANGAŻOWANYCH W METABOLIZM KOŃCA 5’
mRNA”**

Pan mgr Mateusz Kozarski wykonał pracę doktorską pod opieką dr hab. Joanny Kowalskiej w Laboratorium Chemii Biofizycznej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki oraz w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Zasadność podjętej tematyki

Informacyjne mRNA zyskuje w ostatnich latach na znaczeniu, co dobitnie pokazuje zeszłoroczna nagroda Nobla przyznana Katalin Karikó i Drew Weissmanowi. Terapeutyczny potencjał mRNA wzrósł wraz z odkryciem pewnych cech strukturalnych tej cząsteczki i możliwości takiej ich modyfikacji, by cząsteczka o niskiej trwałości i wysokiej immunogenności zyskała cechy kwalifikujące ją jako terapeutyk. Poszukiwanie nowych modyfikacji, zmierzających do przystosowania właściwości mRNA do nowych zastosowań, również jako narzędzi do badania procesów związanych z mRNA, jak i wysiłki zmierzające do zwiększania syntetycznej dostępności takich związków, stanowi ważny element dzisiejszej nauki, nie tylko akademickiej, ale również związanej z przemysłem farmaceutycznym. Praca Doktoranta doskonale wpisuje się w ten ważny dział badań.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Praca liczy 218 stron i ma klasyczny układ prac doktorskich, obejmujący część literaturową, badania własne, część eksperymentalną i podsumowanie. W pracy wyodrębniono również spis publikacji i doniesień konferencyjnych Autora, wprowadzenie i podsumowanie oraz spis literatury, przy czym na ten ostatni składa się 199 odnośników. Autor zawarł w pracy około 10 tabel i 117 grafik. Wszystkie te elementy złożyły się na interesującą, klarownie napisaną rozprawę doktorską.

ul. Żeromskiego 116, 90-543 Łódź, budynek A27
tel. +48 42 631-31-40, w3i32@adm.p.lodz.pl
Adres do korespondencji:
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

Część literaturowa to świetna kompilacja wiedzy z różnych dziedzin związanych z badaniami nad mRNA, a szczególnie z tematyką związaną z procesem transkrypcji i translacji oraz degradacji tych cząsteczek. Zaprezentowane treści są bardzo dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i podsumowującej pracę dyskusji wyników. Autor umiejętnie przechodzi od ogólnych informacji do bardziej szczegółowych, związanych z enzymem z rodziny 5'-nukleotydaz, cN-IIIB, dla którego podjął się zaprojektowania i syntezy potencjalnych inhibitorów wywodzących się z kapu. Autor opisuje również inne białka, eIF4E (eukariotyczny czynnik inicjujący translację E4) i DcpS (ang. Scavenger decapping enzyme), względem których badań selektywność działania opisanych inhibitorów. Rola tych enzymów w stanach patologicznych została również opisana, wskazując na ich potencjalne terapeutyczne znaczenie.

Drugi element części literaturowej stanowi zwięzły opis strategii syntetycznych służących syntezie nukleotydów i kwasów nukleinowych. Autor opisał również koncept *pronukleotydów*, uprzedzając swoje badania wykorzystujące tę strategię. W części bardziej syntetycznej Autor poświęcił znaczący fragment przybliżeniu reakcji typu „click”, w tym reakcje CuAAC, SPAAC i SuFEx, i ich zastosowań w chemii nukleotydów i kwasów nukleinowych. Trzeci fragment części literaturowej to opis wybranych przykładów użycia modyfikowanych nukleotydów jako narzędzi do badania mRNA. Część literaturową Autor zamyka ciekawymi podrozdziałami dotyczącymi wyzwań i przyszłości terapii opartych na wykorzystaniu mRNA. Cieszy mnie szacunek jaki Autor wykazuje względem takich pojęć jak *narzędzie*, a nie tylko *terapeutyk*.

Odnosnie wstępu teoretycznego proszę o skomentowanie następujących uwag:

- Podrozdział II.8 wprowadza pewne zamieszanie. Niektóre informacje są w sposób niewystarczająco ścisły przytoczone. Jak wnioskuję z pracy, słowo *pronukleotydy* ma być tożsame z określeniem *ProTide* (str. 44), a jednocześnie to pierwsze określenie ma służyć opisowi innych proleków. Jednak określenie *ProTide* zostało wprowadzona przez Profesora Chrisa McGuigana dla strategii przez Niego zaproponowanej i nie była to pierwsza strategia prolekowa dla nukleotydów, jak można by wnioskować z treści przedstawionej rozprawy. Z tą uwagą wiąże się też uwaga do nazwy jednego z prolekowych analogów, *Protide-Trp S37*, którą uważam za niewłaściwą, bo nie jest to analog typu *ProTide*.
- Ze stwierdzenia na str. 48-49 wynika, że za ostatni etap uwalniania nukleotydu z *ProTide* jest odpowiedzialna fosfoamidaza, podczas gdy mechanizm uwalniania proleków Wagnera jest inny, bo przebiega poprzez hydrolizę z udziałem enzymu HINT-1. Jakie fosfoamidazy biorą udział w uwalnianiu *ProTide*?

Przejdę teraz do kluczowej części dysertacji, czyli Badań własnych. Część ta obejmuje dwa spójne, rozwinięte projekty badawcze. Doktorant jako cel postawił sobie syntezę i optymalizację nowych analogów nukleotydów, które miały służyć jako narzędzia do badania translacji mRNA i degradacji metabolitów końca 5' mRNA.

W pierwszym projekcie Autor skoncentrował się na poszukiwaniu inhibitorów enzymu cN-IIIB, katalizującego defosforylację 5'-monofosforanu 7-metyloguanizyny. Projekt ten stanowi kontynuację badań rozpoczętych już podczas studiów magisterskich i stanowi imponującą całość, ponieważ Autor nie tylko uczestniczył w syntezie docelowych związków, przebadał bibliotekę potencjalnych inhibitorów, ale również zastosował alternatywne metody zwiększenia aktywności związków wiodących, przez zastosowanie strategii prolekowej, która miała zwiększyć bioprzyswajalność tych związków oraz przez zaprojektowanie analogów kowalencyjnych, by zwiększyć siłę ich oddziaływania z enzymem. Przyznaję, że bardzo dobrze się czyta tę historię. Autor przedstawia logiczny ciąg myślowy, pokazujący drogę od pierwszej do trzeciej biblioteki. Badania te są wspierane przez badania biofizyczno-biochemiczne, które pozwalają na selekcję najlepszych kandydatów z każdej puli do dalszych modyfikacji. Autor badał właściwości substratowe i inhibitorowe otrzymanych związków względem celowanego enzymu cN-IIIB, jak również selektywność względem wybranych enzymów albo znanych z tego, że oddziałują z m⁷GMP, albo z tego, że są homologami cN-IIIB. Na tej podstawie Autor dokonał wyboru najciekawszych związków do dalszych badań, S36 i S37, co jest dobrze uzasadnione również wynikami badań strukturalnych. Co ciekawe, Autor pod wpływem wyników badań krystalograficznych zbadał również możliwość użycia prostszych związków, tj. benzyłowych analogów guaniny. Niestety ten trop nie doprowadził do analogów o oczekiwanej aktywności.

Kolejną część badań stanowiła synteza (wykonana przez innego członka grupy) tzw. SuFEX-owych analogów, w celu zwiększenia aktywności otrzymanych analogów, przez umożliwienie ich kowalencyjnego wiązania z docelowym enzymem. Uważam za bardzo cenny ten element pracy, tym bardziej, że w ten sposób otrzymano najsilniejszy z dotychczas opisanych inhibitorów cN-IIIB. Oczywiście wymagane są dalsze badania, w tym ocena selektywności jego działania, ale nie było to przedmiotem tej dysertacji.

W części drugiej Doktorant podjął się syntezy analogów końca 5' mRNA z modyfikacją triazolową w obrębie mostka trifosforanowego albo wiązania fosfodiesterowego. Zadanie to zostało uwiecznione badaniami określającymi wpływ tych modyfikacji na procesy związane z syntezą i translacją mRNA, z zastosowaniem odpowiednich modeli i dobrze zaplanowanych, spójnych eksperymentów. Otrzymane związki poddano badaniom na wydajność procesu kapingu. Najłatwiej wbudowywane były związki z triazolem w mostku 5',5'-trifosforanowym. Znacznie gorszą wydajność obserwowano dla związków z modyfikacją triazolową w obrębie mostka 3',5'-fosfodiesterowego. Procesy translacji badano w dwóch modelach, lizacie z retikulocytów króliczych oraz w komórkach dendrytycznych linii JAWS II. W obydwu przypadkach najlepszy wynik uzyskano dla związku **9**, dla którego translacja przebiegała porównywalnie jak dla m⁷GpppA_{mp}G-RNA. Kolejne badania pokazały, że prawie wszystkie badane analogi mają podobne powinowactwo do eIF4E, przy czym związek **9** ma najwyższe powinowactwo do białka eIF4E, ze stałą dysocjacji niższą niż dla kapu 1. Stabilność analogów mRNA badano wykorzystując kompleks hDcp1/Dcp2, odpowiedzialny za degradację mRNA od 5' końca. Okazało się, że analog **9** jest mniej odporny na rozpad katalizowany kompleks hDcp1/Dcp2 niż niemodyfikowany analog kapu. Ostatnim zadaniem syntetycznym była

syntezy analogów łączących triazolową modyfikację w obrębie kapu (modyfikacje zwiększające wydajność translacji) oraz modyfikację w pozycji N6 adenozyiny, pierwszego transkrybowanego nukleotydu.

Odnosnie Badań własnych proszę o skomentowanie następujących uwag:

- Choć w całej pracy Autor sumiennie zaznacza i określa udział innych osób w opisywanych badaniach, zabrakło mi informacji na temat udziału Autora w syntezie pierwszej biblioteki związków. Proszę o doprecyzowanie.
- Związek $m^7GpppTr-C_2H_4-pA_{mp}G$ (9) jawi się jako dobry mimetyk naturalnego kapu, przy czym jego synteza jest znacznie szybsza. Czy poza czasem reakcji są inne walory syntetyczne tego podejścia i stosowania związku 9?
- Autor stawia znak równości pomiędzy „inhibitorami kowalencyjnymi” a „inhibitorami samobójczymi” (stwierdzenie ze str. 118-119). Uważam takie ujęcie za nieprecyzyjne, jako że inhibitory samobójcze stanowią tylko podklasę inhibitorów kowalencyjnych. Czy inhibitory zsyntezowane przez Doktoranta są inhibitorami samobójczymi, jak twierdzi w podsumowaniu?
- Trudno mi się zgodzić ze stwierdzeniem, że „jednym z przykładów takiej reakcji chemicznej (używanej do projektowania inhibitorów kowalencyjnych, przypis Recenzentki) jest reakcja typu *click* (str. 119). Jak Autor sam pisze, zastosowanie reakcji *click* wymagałoby uprzedniej modyfikacji białka, które miałoby być połączone wiązaniem kowalencyjnym z inhibitorem. Dlatego inhibitory kowalencyjne z reguły wyposażone są w inne grupy zdolne do modyfikacji naturalnych reszt obecnych w łańcuchach bocznych peptydów. W trakcie obrony proszę o pokazanie przykładów takich grup, które już teraz są obecne w terapeutykach. I tu pojawia się pytanie: co kierowało Autorem by w swojej pracy użyć strategii SuFEX?
- Ponieważ w części eksperymentalnej znajduję dane tylko dla jednego analogu prolekowego, proszę o uzupełnienie tych informacji przynajmniej dla analogu Protide-Trp S37, z uwzględnieniem informacji na temat warunków oczyszczania, które mogły się przyczynić do niskiej wydajności syntezy tego analogu.
- Badanie stabilności i właściwości inhibitorowych, str. 107-108. Proszę o bardziej szczegółowe opisanie tych eksperymentów. Jak były one wspomagane przez spektrometrię mas?

Pan Kozarski nie ustrzegł się błędów edytorskich i nieścisłości, który z powinności recenzenta przytaczam poniżej.

- str. 35: Autor twierdzi, że „Aktywatorem w reakcji sprzęgania jest roztwór 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazolu [...]”. Natomiast na Rys. 16 znajduje się tetrazol. Na tym samym rysunku wkraśl się błąd w przedstawieniu mechanizmu (punkt C);
- str. 46, „tryptaminowe pronukleotydy, dzięki zamaskowaniu ujemnego ładunku, [...]” raczej „częściowemu zamaskowaniu”

- w kilku miejscach, w tym na str. 49 i 51, Autor nazywa Noblistę 2022 „Moedalem”, podczas gdy nazywa się on Morten Meldal.
- niejednorodna numeracja związków [numeracja czasem jest obecna, czasem jej brakuje (stosowane są opisowe, dość jasne skróty), czasem jest prawdopodobnie zaczerpnięta z publikacji]. Czasem zakłóca to odbiór pracy. Np. str. 65, rys. 47: czym są związki **20** i **23**, **7**, **2**?
- str. 75, rys. 56: niepełny opis, brakuje legendy definiującej CDS, 3'UTR, Nm;
- str. 89: dwa razy użyto symbolu S20, dla dwóch różnych związków;
- str. 95, Tabela 3: mylący podpis ostatniej kolumny „Inhibicja hydrolizy m⁷GMP przy stężeniu 100 μ M (%)”: np. najbardziej aktywny związek **S37** ma wartość 2%, co, jak wynika z tekstu, wyraża ilość m⁷GMP, która uległa hydrolizie.
- str. 107: błędnie przypisany numer Rys. 74C-D. Powinien być 75C-D.
- jakość rysunków, np. 10, 42, 48;
- Str. 152: komórki dendrytyczne - komórki *reprezentujące* antygen.
- Str. 165, 171: użycie określenia grupy „alkilowe” zamiast „alkinowe”;
- Autor popełnia szereg drobnych błędów stylistycznych i typograficznych, których nie będę tu wymieniać ze względu na ich ilość. Co ciekawe, nie wpływają one na czytelność pracy. Autor rzadko stosuje żargon (np. str. 52: „wolna para elektronowa Nu *przeprowadza atak* na atom siarki”), co jest zaletą pracy.

Chcę podkreślić, że moje uwagi krytyczne i komentarze nie podważają bardzo pozytywnej oceny wartości naukowej pracy.

Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca zawiera niezwykle bogaty materiał eksperymentalny, stanowiący interdyscyplinarny projekt, w którym Autor zajmował się nie tylko syntezą pochodnych końca 5' mRNA ale również ich charakterystyką z wykorzystaniem testów biofizyczno-biochemicznych i biologicznych. Wyniki tych badań są bardzo wartościowe, a szczególne uznanie budzi przeprowadzenie badań od podstaw, czyli od naturalnego substratu enzymu cN-IIIB, i znalezienie silnego, selektywnego inhibitora tej 5'-nukleotydazy. Stwierdzam, że Doktorant trafnie wybrał tematykę badań, jasno sformułował cel pracy, dobrze zaplanował i wykonał doświadczenia, wykazał się umiejętnością interpretacji i dyskusji wyników, a także umiejętnie sformułował podsumowanie pracy. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy.

K. Międzyk