

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „ Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA” mgr. Mateusza Kozarskiego, przygotowanej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Rozprawa doktorska mgr. Mateusza Kozarskiego jest monografią opisującą wyniki badań umieszczonych wcześniej przez Autora w trzech publikacjach i jednym manuskrypcie. Badania dotyczyły tworzenia bibliotek inhibitorów enzymu cN-IIIB biorącego udział w końcowych etapach degradacji końca 5' mRNA oraz syntezy nowych, trinukleotydowych analogów kapu znajdującego się na końcu 5' mRNA. Autor stworzył cztery biblioteki selekcionując za każdym razem cząsteczki o najwyższej stałej równowagi tworzenia kompleksu z enzymem cN-IIIB. W sumie zbadał ponad 60 inhibitorów. Wybrane inhibitory przetworzone w drodze syntezy w pronukleotydy, najprawdopodobniej mogą przenikać przez błonę komórkową do wnętrza komórki, stając się równocześnie markerami enzymów *in vivo*. Autor wytworzył także inhibitor 4-SO₂FbN7GMP kowalencyjnie wiążący się z enzymem, którego stała trwałości kompleksu (~kilkudziesiąt nM) była sto razy większa niż pozostałych inhibitorów. Nie jest znany Autorowi rozprawy, jak również recenzentowi rozprawy, inhibitor o większej stałej trwałości kompleksu z enzymem cN-IIIB. Wysoko oceniam zarówno jakość badań jak i ogrom wykonanej pracy syntetycznej. Warto podkreślić, że pierwsze inhibitory enzymu cN-IIIB zostały opracowane przez mgr. Kozarskiego w roku 2017, czyli raptem sześć lat temu. Sądzę, że w następnych latach może się okazać, że otrzymane inhibitory unieczynnijące funkcję degradacyjną tych enzymów znajdą swoje zastosowanie w medycynie. W drugiej części pracy doktorskiej kandydat do stopnia doktora również wykazał się mistrzostwem prowadzenia badań naukowych. Jak wiemy mRNA pozbawione czapeczki na końcu 5' jest bardzo szybko degradowane w komórkach. Ten fakt powodował, że przez długie lata mRNA nie było rozważane jako kandydat na szczepionkę lub lek. Metody syntez biochemicznych pozwoliły na dołączanie czapeczki do łańcucha mRNA. Co więcej w grupie biofizycznej na Uniwersytecie

Warszawskim rozpoczęto wiele lat temu prace nad modyfikacjami czapeczki mRNA, tak by otrzymany konstrukt był mniej podatny na degradację. Te badania przyniosły Uniwersytetowi Warszawskiemu największą komercjalizację w historii, czyli licencjonowanie stabilnych cząsteczek mRNA ze zmodyfikowaną czapeczką na końcu 5' mRNA dla firmy BioNTech, późniejszego partnera firmy Pfizer w opracowaniu szczepionki na COVID-19. Mgr. Kozarski kontynuował te badania modyfikując czapeczkę mRNA i sprawdzając jaki jest wpływ tych modyfikacji na translację mRNA, czyli przepisanie sekwencji mRNA na sekwencję białka. Proces translacji był badany in vitro jak również w żywych komórkach. W tej części badań do modyfikacji czapeczki mRNA Autor stosował reakcję typu „click chemistry” wymyśloną w 2001 roku przez dwukrotnego Noblistę w dziedzinie chemii Karla Barry Sharplessa. Za „click chemistry” przyznano Mu nagrodę Nobla w 2022 roku. W pracy mgr. Kozarski zaproponował nowe ścieżki syntezy zmodyfikowanych czapek mRNA i wykonał syntezy kilkunastu różnych zakończeń mRNA. Ogólnie badania te miały na celu stworzenie mRNA, które z jednej strony jest odporne na degradację od strony czapeczki czyli końca 5' mRNA a równocześnie wykazujące duże powinowactwo do białka eIF4E, które inicjuje translację mRNA. Jeśli mRNA ze zmodyfikowanym kapem (czapeczką) równocześnie wykazuje bardzo dużą wydajność translacji i nie ulega degradacji, to potencjalnie staje się kandydatem na lek. Niewątpliwie Autor wykonał istotny krok w tym kierunku. Szczegółowe podsumowanie wyników doktoratu znajdują się na stronach 167-173. Na koniec tego krótkiego podsumowania zawartości rozprawy doktorskiej dodam dla porządku, że mgr. Kozarski musiał używać do charakterystyki otrzymanych związków chemicznych wielu metod, które bezpośrednio pochodzą z fizyki takich jak NMR, czy analiza tłumienia fluorescencji. Stąd wynika, że rozprawa doktorska zawiera w sobie zarówno elementy biochemii jak i biofizyki. Podsumowując tę część recenzji: bardzo

wysoko oceniam walory naukowe rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Kozarskiego. Podziwiam ogrom pracy włożonej w badania i przygotowanie 219-to stronicowej rozprawy.

Publikacje Autora znalazły swoje miejsce w dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej: Bioorganic & medicinal chemistry, RSC Advances czy Pharmaceuticals. Mgr Kozarski jest pierwszym lub równoważnym pierwszemu autorem tych publikacji. Dzięki temu recenzent ma pewność, że to mgr Kozarski wykonał większość pracy naukowej opisanej w doktoracie. Nowe wyniki Autora zostały już sprawdzone przez co najmniej trzech redaktorów, sześciu recenzentów, uczestników dziewięciu międzynarodowych konferencji naukowych, na których te wyniki były przedstawiane, sześcioro starszych stopniem koleżanek i kolegów z grupy, oraz Panią promotor dr.hab. Joannę Kowalską i profesora Jacka Jemielitego światowej sławy biochemików i biofizyków specjalizujących się w modyfikacjach mRNA, twórców sukcesu komercyjnego Uniwersytetu Warszawskiego. Dzięki temu praca recenzenta staje się formalnością, a uwaga recenzenta skupia się bardziej na edukacyjnych walorach doktoratu, przejrzystości przedstawienia nowych wyników naukowych oraz poprawności językowej rozprawy.

Z wykształcenia formalnego i sposobu rozumowania jestem fizykiem teoretykiem. Recenzowałem ponad 100 rozpraw z fizyki, chemii i biologii. Logiczność i spójność wywodów przedstawionych w rozprawie stawia ją w 2-3 procentach recenzowanych przeze mnie prac. Chapeau bas dla Autora. Praca zawiera bardzo małą liczbę błędów (literówek) np. słowo nie dawno (w pracy „do nie dawna”) pisze się razem; w tej prac (powinno być pracy), usunięci (powinno być usunięciu). Praca nie ustrzegła się od stosowania slangu naukowego np. określenie „mikromolarny inhibitor” nawiązuje do stałej trwałości kompleksu inhibitora z enzymem. W pracy analiza błędów została potraktowana trochę po macoszemu. Dla

przykładu w podpisie do rys. 112 czytamy „Dane reprezentują wartość średnią $\pm$ SD obliczoną dla dwóch powtórzeń” (sic!). Wreszcie na stronie 154 pod wzorami 4,5 brak opisu wszystkich zmiennych w równaniach i trzeba się ich domyślać.

Mam jedną ważną uwagę merytoryczną. W pracy występuje istotny parametr nazywany „wydajnością translacji”. Niestety nie jest nigdzie zdefiniowany i jest podawany w jednostkach bezwymiarowych. Gdybym miał sam definiować wydajność translacji mRNA to bym podał wielkość w jednostkach 1/min, gdzie min. to minuta, zdefiniowaną jako liczba białek wyprodukowana z jednego mRNA w czasie jednej minuty. Alternatywnie podałbym liczbę białek wyprodukowanych z jednego mRNA w czasie życia (od powstania do degradacji) tego mRNA. Proszę Autora rozprawy, aby na obronie opowiedział o wydajności translacji, podał definicje (własne i te literaturowe) tej wydajności oraz odpowiedział na pytanie: Czy wydajność mRNA w komórce zależy od metody transfekcji? W szczególności czy gdyby mRNA było nastrzyknięte bezpośrednio do komórki lub podane w lipofektaminie, to czy spodziewalibyśmy się różnic w wydajności translacji?

Podsumowując: **rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Mateusza Kozarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Autor rozprawy zaproponował nowe ścieżki syntezy zakończeń mRNA, zsyntezował „najmocniejszy” (na świecie) inhibitor enzymu uczestniczącego w końcowych fazach degradacji końca 5' mRNA. Stworzył cztery biblioteki inhibitorów i kilkanaście zakończeń mRNA, wytyczając nowe kierunki badań biofizycznych mRNA. Jego 219-to stronicowa praca, co już podkreślałem, jest napisana niezwykle przejrzystie i ma ogromny walor edukacyjny. Jestem pewien, że kolejne pokolenia biofizyków Uniwersytetu Warszawskiego będą uczyć się z tej rozprawy doktorskiej jak ze znakomitego podręcznika.

Dodam, że ilość pracy w laboratorium potrzebnej do uzyskania wszystkich wyników naukowych zawartych w rozprawie oceniam grubo ponad przeciętną w Polsce. **Dlatego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Kozarskiego.**

Prof. dr hab. Robert Hołyst



Kierownik Zakładu Fizykochemii Miękkiej Materii

Instytut Chemii Fizycznej PAN

Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

<https://softmatter.ichf.edu.pl/>

rhozyst@ichf.edu.pl