



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Rolnictwa i Leśnictwa
Katedra Chemii
pl. Łódzki 4, 10-957 Olsztyn
Prof. Paweł Kafarski



Olsztyn 20.12.2023

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Matusza KOZARSKIEGO
„Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych
w metabolizm końca 5' mRNA”

Praca doktorska Pana mgr Mateusza Kozarskiego została wykonana pod opieką Pani prof. Joanny Kowalskiej w Instytucie Fizyki Doświadczalnej i w Centrum Nowych Technologii na Uniwersytecie Warszawskim. Praca jest realizacją oryginalnego pomysłu a zarazem fragmentem większego projektu badawczego. Widać to wyraźnie z licznych odniesień Doktoranta do prac kolegów z zespołu i korzystanie z wyników ich badań, jak i otrzymanych przez nich związków.

Celem badań podjętych przez Pana dr Mateusza Kozarskiego była synteza nowych analogów kapu 1, modyfikowanego przez N-metylowanie i O-metylowanie nukleotydu, wiążącego się na końcu 5' mRNA. Analogi te posłużyły w badaniu jego nie do końca poznanej roli, szczególnie w procesach translacji mRNA i procesie degradacji mRNA od N-końca. W tym drugim przypadku Doktorant skoncentrował się na poszukiwaniu nowych substratów i inhibitorów jednej z ludzkich nukleaz – nukleazy cN-IIIB. Niejako przy okazji Pan dr Mateusz Kozarski zbadał oddziaływanie tych inhibitorów z eukariotycznym czynnikiem inicjującym translację 4E, jednym z białek, koniecznych do rozpoczęcia zależnej od kapu translacji, uzyskując bardzo interesujące wyniki. Jak widać badania zostały zaplanowane z rozmachem. Jako recenzent mam pewien problem, którym jest włączenie do doktoratu badań przeprowadzonych przed rozpoczęciem studiów doktoranckich i opublikowanych w roku 2018, które Autor nazywa „*badaniami wstępnymi*”. Włączenie to ma sens o tyle, że badania te stanowiły punkt wyjścia i uzasadnienie tematyki doktoratu.

W pierwszym etapie Doktorant zbadał właściwości inhibitorowe 33 związków otrzymanych przez niego samego i Panią dr Dorotę Kubacką, uzupełnionych przez 7 naturalnych nukleotydów. Autor dysertacji nazywa ten zbiór pierwszą biblioteką. Jest to zestaw trzech typów strukturalnych analogów kapu 1, gdzie modyfikacje wprowadzono w obrębie grupy fosforanowej, adeniny jak i rybozy. Można powiedzieć, że biblioteka ta składa się z czterech zbiorów (jeśli policzyć naturalne nukleotydy). Trzy związki wykazały obiecującą aktywność – jednym z nich był związek opisany w pracy będącej wynikiem badań prowadzonych przed doktoratem, a dwa to analogi, w których reszta N-metylowa kapu została zastąpiona benzylową. Te ostatnie stały się

substancjami wiodącymi w dalszych badaniach. Sukcesywnie modyfikując strukturę N-benzylowego analogu kapu i traktując najsilniejsze inhibitory jako wzorce, Doktorant otrzymał nowe biblioteki inhibitorów nukleazy cN-IIIB: drugą liczącą 9 nowych związków i trzecią złożoną z 7 związków. Wśród tych związków zidentyfikowano dwa silne, submikromolowe, inhibitory badanego enzymu zawierające w podstawniku benzylowym obecnym na azocie 7, grupę benzylową podstawioną jednym lub dwoma atomami fluoru. Czwarta biblioteka, złożona z 5 związków, jest jakościowo różna i zawiera reaktywną grupę fluorosulfonową. Związki z tej biblioteki okazały się kowalencyjnymi inhibitorami badanego enzymu, co Doktorant zręcznie udowodnił stosując spektrometrię mas. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem doktoratu jest zdefiniowanie struktury przestrzennej ludzkiego białka cN-IIIB w kompleksie z jednym z najsilniejszych inhibitorów oraz z prostszym inhibitorem jakim jest analogiczna dipodstawiona guanina. Ten ostatni związek również został otrzymany przez Doktoranta i synteza ta okazała się całkiem nietrywialna.

Druga część dysertacji poświęcona jest zastosowaniu analogów kapu 1 jako narzędzia do badania procesu translacji. Aby przeprowadzić te badania Doktorant otrzymał dwanaście tri- i tetra- nukleotydowych analogów końca 5' mRNA stosując tzw. „reakcję click”. To trudne, wieloetapowe syntezы i odnoszę wrażenie, że synteza substratów była dużo trudniejsza niż sama końcowa reakcja. Następnie użyto te analogi do syntezy oligonukleotydów zawierających je w miejsce kapu. Syntezy te wykonała Pani dr Karolina Drażkowska. Analogi te wbudowano ko-transkrypcyjnie do RNA kodującego lucyferazę z widłonoga *Gaussia*. Długie fragmenty RNA, już zawierające tę lucyferazę, otrzymał doktorant osobiście. Zostały one wykorzystane w badaniach translacji, a więc do otrzymywania tego białka, w lizatach komórkowych retikulocytów króliczych oraz w komórkach dendrytycznych JAWS II. Tę serię badań wykonała Pani dr Karolina Drażkowska. Trzeba stwierdzić, że wyniki drugiej części doktoratu są obiecujące i otwierają nowe pola badawcze, z zatem zapewne będą kontynuowane.

Pracę doktorską Pana mgra Mateusza Kozarskiego recenzuje się niełatwo. Główną przyczyną jest niezwykła jak na dysertacje doktorskie wielowątkowość badań, duża liczba danych numerycznych w tekście oraz nakładanie się wyników badań Doktoranta z rezultatami uzyskanymi przez innych członków zespołu badawczego w jakim mu przyszło pracować. Jak duży to zespół mogą świadczyć chociażby podziękowania zamieszczone na początku manuskryptu. Zakres badań i ich rozmach budzi szacunek. Szczególnie wartym podkreślenia jest niezwykle bogata część pracy poświęcona syntezie nowych grup nukleotydów. To niełatwe i pracochłonne syntezы. Realizacja tej pracy wymagała od Doktoranta dobrego opanowania całej gamy technik chemii i fizykochemii organicznej, biochemii i biologii molekularnej. Podsumowując, jest to bardzo dobra praca doktorska. W tym kontekście pewne zdziwienie budzi fakt, że jej wyniki zostały opisane w trzech publikacjach o (licząc pracę sprzed doktoratu) bardzo dobrym, ale nie najwyższym standardzie. Czwarta z obiecanych prac nie pojawiła się jeszcze w internecie.

Praca doktorska Pana mgra Mateusza Kozarskiego ma układ klasyczny i zaczyna się od wprowadzenia czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Ten wstęp napisany jest bardzo dobrze i czytelnie, ładną polszczyzną. Następujące po części literaturowej rozdziały opisujące badania własne oraz część eksperymentalną są bardzo szczegółowe i dobrze pokazują zarówno sposób realizacji badań, jak i ogrom pracy włożony w ich realizację. Nieco gorzej ma się wyrażne rozgraniczenie tych fragmentów badań, bez opisu których nie udałoby się skonstruować rozprawy, a które wykonali współpracownicy Doktoranta. Dobrą opinię o pracy silnie nadwyręża niefrasobliwa edycja tekstu. Liczba błędów edytorskich, nieprecyzyjnych sformułowań czy poziom żargonu naukowego jest ponad normatywną. Takim złym przykładem jest tu fragment paragrafu III.IV.1. za stronie 82, gdzie znalazłem aż 8 takich błędów. Pierwsze błędy pojawiają się już w spisie treści, a można je znaleźć nawet w tytułach paragrafów (np. II.2.1.2.).

W trakcie czytania pracy zanotowałem kilka pytań i uwag, które przedstawiam w porządku chronologicznym:

- W rozdziale III.5.1. ciekawym byłoby zestawienie wartości IC_{50} z podatnością badanych związków na hydrolizę. Spekulacja ma temat zależności struktura-aktywność biorąc pod uwagę jedynie aktywność inhibitorową jest obarczona dużą niepewnością;
- W dyskusji zamykającej paragraf III.5.1. mogłoby trochę pomóc dokonanie klasycznej analizy SAR korzystając z dowolnego i dostępnego niekomercyjnie programu komputerowego. Zdaje sobie sprawę, że próbka do takich badań jest mała, ale omówienie wyników zaprezentowane w tym fragmencie pracy doktorskiej opiera się głównie na intuicji Doktoranta;
- Trochę szkoda, że omówienie sposobu wiązania inhibitorów użytych do określenia struktury krystalicznej (a nie krystalograficznej!) nukleazy cN-III_B nie zostało omówione nieco szerzej, gdyż wyraźnie widać, że fragment guanidynowy obu inhibitorów wiązany jest w różny sposób;
- Obserwowane różnice aktywności związków sufonylowych i sulfinylowych, omówione na stronach 122 i 123, są intrygujące. Czy znana jest różnica szybkości i zdolności reakcji tego typu pochodnych z nukleofilami?
- Rozważania na końcu paragrafu 9.III.1. dobrze byłoby wesprzeć za pomocą modelowania molekularnego;
- Czy Doktorant ma jakiś pogląd, dlaczego związek 4-SO₂F-Bn⁷GMP wiąże się z enzymem kowalencyjnie, a związek 3-SO₃F-Bn⁷GMP chyba nie?
- Zaciekało mnie widmo NMR pokazane na rysunku 97 (str. 135), a właściwie produkty uboczne jakie powstają w wyniku opisanej tam reakcji. Analiza tego widma zdecydowanie jednak wykracza poza zakres doktoratu;
- Czy wiadomo, jak wiążą jony magnezowe (lub manganowe) triazolowe analogi nukleotydów? To dosyć ważne z punktu widzenia ich aktywności biologicznej.

Przywilejem, a nawet obowiązkiem recenzenta jest wskazanie tych fragmentów pracy, które budzą jego wątpliwości. I nie chodzi tu bynajmniej o usterki edytorskie. Nie zamierzam zatem uchylać się od podania kilku uwag krytycznych. I tak:

- Na str. 32, chyba chodzi o grupę aminową, która tworzy fosforamid;
- Na str. 47, chyba lepiej użyć nazwy fosforyn difenyłu, lub H-fosfonian difenyłu;
- Str. 56 – to są nanocząstki, a nie nanocząsteczki;
- Str. 58: fluorek sulfonylu posiada dwa fluory w strukturze;
- Str. 64: „Jednym z badanych enzymów, był ludzki enzym cN-IIIB, który był tematem badań przeprowadzonych...” to typowe „masło maślane”;
- Z grubsza wiem o co chodziło Autorowi w zdaniu „*Pomimo fenomenu trinukleotydowych analogów kapu, dinukleotydowe analogi kapu są wciąż powszechnie eksplorowane.*” (str. 70), ale nie brzmi ono dobrze po polsku;
- Za to nie bardzo rozumiem zdanie „*Przebieg reakcji enzymatycznej był możliwy dzięki różnicy w polarności substratu (5'-monofosforanu nukleozydu) i produktu (nukleozydu) powstałego w czasie trwania reakcji.*” Czy to znaczy, że siłą napędową reakcji enzymatycznej była zmiana polarności? (str. 82);
- Str. 93: przy opisie podstawników dla związków **36**, **37** i **38** lepiej było zastosować notację np. 3-CF₃-C₆H₄CH₂-, gorzej wygląda 3-CF₃-Bn, a z pewnością nie powinno tam być 3CF₃-BnBr;
- Zawady sterycznej się nie tworzy – można ewentualnie ją wprowadzić do struktury cząsteczki albo ona tam po prostu jest;
- Jak rozumiem w dyskusji pod Tabelą 4 (str. 97) raczej chodzi o to, że podstawnik w nieodpowiednim miejscu niekorzystnie oddziałuje z enzymem nie pozwalając na optymalne dla reakcji ułożenie cząsteczki w centrum aktywnym;
- Str. 104, sformułowanie „czynniki mikroptytek” ma swój urok;
- Str. 109. Ma rysunku 76C z pewnością nie widać ruchu, tylko sposób dopasowania się enzymu do inhibitora;
- Str. 118: inhibitory samobójcze enzymu (czasami nazywane substratami samobójczymi) to nie to samo co inhibitory kowalencyjne;
- Str. 119; chodzi chyba o rozpiętość wyników a nie rozbieżność;
- Str. 122: wyniki IC₅₀ podane w Tabeli 7 i w tekście dla 4-SO₂F-Bn-7GMP minimalnie, ale jednak się różnią (to chyba błąd edytorski);
- Słowny opis reakcji na stronie 123 jest chyba nie do końca prawidłowy. Hydroliza daje kwas siarkowy (który od biedy można zapisać jako H₂OxSO₃);
- Hydroliza POCl₃ raczej daje w efekcie kwas fosforowy a nie fosforany. Jakie jest pH roztworu w tej reakcji?
- Nie ma powodu, aby nazwy związków chemicznych pisać dużą literą, a to niekiedy zdarza się w tej pracy.

Powyższe uwagi nie mają żadnego wpływu na moją wysoką ocenę wartości rozprawy Pana mgr Mateusza Kozarskiego. Mają one zwrócić uwagę Doktoranta na to, że opis badań jest równie ważny jak ich wykonanie, a przy okazji mają pokazać, że pracę starałem się przeczytać starannie.

Reasumując, przyszło mi recenzować solidną i ciekawą pracę opisującą realizację innowacyjnego i ważnego pomysłu badawczego, który stanowi wartość dodaną w badaniach prowadzonych w macierzystym zespole. Niestety, wartość tej dysertacji obniża jednak sposób w jaki jest ona napisana. Praca doktorska Pana mgr Mateusza Kozarskiego w pełni spełnia warunki zarówno ustawowe jak i zwyczajowe jakie stawia się dysertacjom doktorskim. Zatem, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie tego Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

