



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116
90-924 Łódź

Tel: (+42) 636-25-42, (+42) 631-31-40

Fax: (+42) 636-55-30

Dr hab. Elżbieta Sochacka, prof. PŁ

elzbieta.sochacka@p.lodz.pl

Łódź, 30 września 2012 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr Jolanty Lepczyńskiej**

**pt. „Fotochemia jedno- i dwuniciowych oligodeoksynukleotydów
zawierających 5-bromouracyl w sąsiedztwie zasad pirymidynowych”**

Przedstawiona Radzie Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Recenzowana praca doktorska mgr Jolanty Lepczyńskiej pt. „Fotochemia jedno- i dwuniciowych oligodeoksynukleotydów zawierających 5-bromouracyl w sąsiedztwie zasad pirymidynowych” została wykonana w Zakładzie Fizyki Chemicznej, pod kierunkiem dr hab. Bohdana Skalskiego, profesora UAM. Rozprawa poświęcona jest badaniom fotochemii 5-bromouracylu - modyfikowanej zasady heterocyklicznej, umiejscowionej w odpowiednio dobranych modelowych układach oligonukleotydowych, zarówno jedno- jak i dwuniciowych. 5-Bromouracyl jako modyfikacja oligonukleotydów jest od lat obiektem szerszego zainteresowania wielu grup badawczych z uwagi na fakt zwiększonej podatności na działanie promieniowania UV, możliwość selektywnego wzbudzenia, a zatem zastosowania w sondach fotochemicznych użytecznych w badaniach struktury i funkcji wielu układów biologicznych.

Biorąc pod uwagę ugruntowane znaczenie sond fotochemicznych w badaniach biologicznych, interesujące i ze wszech miar zasadne są prace podjęte w ramach dysertacji mgr Jolanty Lepczyńskiej, zmierzające do poznania przebiegu reakcji fotochemicznych wybranych modeli oligonukleotydowych zawierających 5-bromouracyl w sekwencyjnym sąsiedztwie uracylu i tyminy. Podjęcie tego typu badań stanowi ważne rozszerzenie wiedzy o fotochemii 5-bromouracylu w układach oligonukleotydowych.

Recenzowana praca ma układ typowy dla tego typu rozpraw i liczy 130 stron. Krótki *Wstęp* poprzedza 28-stronicową część literaturową, nazwaną *Częścią teoretyczną*. Zwięźle sformułowany *Cel pracy* stanowi wprowadzenie do części *Omówienie badań własnych* zawierającej przedstawioną na 56-stronach dyskusję uzyskanych wyników i zakończonej,

zdaniem recenzenta, trochę zbyt lakonicznym *Podsumowaniem*. Resztę stanowi *Część eksperymentalna*, poszerzona o *Aneks widm masowych fotoproduktów* oraz spis cytowanej *Literatury* (114 pozycji), który podany jest, co ważne, z uwzględnieniem tytułów prac oryginalnych.

Część literaturowa jest tym fragmentem rozprawy, który pozwala na wykazanie się znajomości problematyki naukowej związanej z tematyką pracy. Mgr Jolanta Lepczyńska w części referatowej swojej pracy, po krótkim ogólnym przedstawieniu typów reakcji fotochemicznych jakim mogą ulegać naturalne zasady pirymidynowe DNA i RNA, skupiła się na szerszym omówieniu zagadnień związanych z fotoreaktywnością zasad pirymidynowych modyfikowanych atomem halogenu w pozycji 5-pierścienia heterozasady pirymidynowej. Z racji głównego nurtu własnych zainteresowań, Doktorantka szczególną uwagę poświęciła omówieniu dotychczasowych badań nad fotoreakcjami z udziałem 5-bromouracylu, przeprowadzanych zarówno na poziomie modyfikowanej zasady heterocyklicznej, modyfikowanego nukleozydu, jak również w modelowych układach naśladujących oligonukleotydy. Zagadnienia te ściśle wiążą się z tematem prac badawczych zaprezentowanych w rozprawie, i dobrze wprowadzają w lekturę *Badani własnych i omówienia wyników*.

Zastrzeżenia recenzenta co do prezentacji tej części pracy budzi sposób przedstawienia różnorodności reakcji fotochemicznych jakim ulegają 5-halogenouracyle, w tym 5-bromouracyl (Tabela 3, str. 16). Z podpisu Tabeli i umieszczonych wzorów wynikałoby, że obiektem badań jest sama modyfikowana zasada heterocykliczna, podczas gdy większość wymienionych fotoreakcji ma miejsce dopiero wtedy, gdy 5-bromouracyl znajduje się w łańcuchu oligonukleotydowym.

Wykazana na podstawie dokonanego przeglądu literatury znacząca zależność fotochemii oligonukleotydów modyfikowanych 5-halogenouracydami od sekwencji zasad heterocyklicznych i konformacji kwasów nukleinowych, niedostatecznie jak dotąd rozpoznane dla modyfikacji 5-bromouracylem, dostarczają przekonujących argumentów za celowością badań przeprowadzonych w recenzowanej pracy doktorskiej.

Główny cel badań został jasno zdefiniowany już w tytule pracy – poznanie fotochemii jedno- i dwuniciowych fragmentów DNA zawierających 5-bromouracyl umiejscowiony w otoczeniu zasad pirymidynowych. Realizacja tego celu wymagała w pierwszym etapie syntezy szeregu nukleozydowych i nukleotydowych związków wyjściowych, następnie otrzymania zaplanowanych, modelowych oligonukleotydów (pięciu modyfikowanych heksamerów oraz trzech dinukleotydów), a w kolejnym, najważniejszym etapie, badania ich fotochemii oraz przeprowadzenie charakterystyki otrzymanych fotoproduktów.

Realizacja przedstawionych zadań wymagała od Doktorantki dobrego opanowania warsztatu eksperymentalnego, zarówno w syntezie chemicznej monomerów nukleozydowych jak i oligonukleotydów oraz przede wszystkim opanowania metodyki badań fotochemicznych.

Opis badań własnych jest prawidłowo zaplanowany i przejrzyste przedstawiony. Omówienie wyników pierwszej części pracy dotyczącej syntezy modelowych oligonukleotydów modyfikowanych 5-bromouracylem poprzedzone jest opisem syntez niezbędnych substratów nukleozydowych, w tym – 3'-*O*-amidofosforynu 5'-*O*-dimetoksytrytylo-2'-*O*-metylo-5-bromouracyd – jednostki monomerycznej służącej do wprowadzanie modyfikowanego nukleozydu w łańcuch oligonukleotydu. Synteza zaplanowanych pięciu modelowych heksamerów (ODN1-ODN5) zawierających 5-bromouracyl w odpowiednio zróżnicowanym sąsiedztwie zasad pirymidynowych (uracylu i tyminy), trzech heksamerów o sekwencjach komplementarnych oraz synteza trzech modyfikowanych dimerów Up^{Br}U (ODN9), ^{Br}UpU (ODN10), ^{Br}UpT (ODN11) opisana jest na niespełna dwóch stronach. Tak zwarty opis świadczy zapewne o tym, że wprowadzenie modyfikacji 5-bromouracylowej w sekwencje heksamerów metodą automatycznej syntezy na podłożu stałym, jak również synteza modyfikowanych dinukleotydów przeprowadzona w roztworze nie przysporzyły większych problemów, aczkolwiek korzystna byłaby chociaż krótka dyskusja danych spektralnych potwierdzających strukturę otrzymanych oligonukleotydów. W związku z tym mam prośbę o ustosunkowanie się w trakcie publicznej obrony co do poprawności opisu widm ¹H NMR dimerów ODN9 i ODN10 (Część Eksperymentalna, str. 103). Jeśli obowiązuje oznaczenie literą A nukleozydu w położeniu 5' to czy dla dimeru o sekwencji Up^{Br}U (ODN9) sygnał od protonu H6_A może być singletem a dla dimeru ^{Br}UpU (ODN10) dubletem?

Zgodnie z założonym celem pracy, trzon *Badań Własnych* stanowi poznanie fotochemii odpowiednio dobranych, modelowych oligonukleotydów modyfikowanych 5-bromouracylem. W pierwszej części tych badań Doktorantka poddała naświetlaniu promieniowaniem o długości $\lambda=302$ nm otrzymane heksamery, przy czym doświadczenia przeprowadzone zostały dla roztworów jednoniciowych oligonukleotydów jak i dla odpowiednich dupleksów. W każdym przypadku przebieg reakcji obserwowany był spektrofotometrycznie (UV), przeprowadzona została analiza otrzymanych mieszanin fotoproduktów za pomocą HPLC, jak również wykonane zostały ich widma MALDI TOF MS. Doktorantka poświęciła wiele uwagi charakterystyce stabilności fotochemicznej i termicznej otrzymanych produktów, starając się określić ich wzajemne relacje. Ważnym działaniem było również przeprowadzenie trawienia enzymatycznego tych fotoproduktów, które udało się wydzielić w wystarczającej ilości, a następnie przeprowadzenie ich analiz. Chociaż dane uzyskane z badań heksamerów nie pozwoliły na ustalenie w sposób jednoznaczny struktury żadnego z fotoproduktów, to pozwoliły jednak na sformułowanie szeregu wniosków dotyczących kierunku zachodzących przemian fotochemicznych. Przede wszystkim wskazały na tworzenie się jednego dominującego, labilnego termicznie fotoadduktu obejmującego 5-bromouracyl i sąsiadującą w łańcuchu zasadę pirymidynową, przy czym, bazując na formalnej analizie danych z widm MALDI TOF MS można było stwierdzić, że tworzeniu tego produktu towarzyszy utrata atomu bromu i przyłączenie grupy hydroksylowej. Dodatkowo wykazano, że degradacja termiczna każdego głównego fotoadduktu związana jest z utratą cząsteczki wody i prowadzi do podobnych produktów, wykazujących charakterystyczną długofalową absorpcją UV powyżej 300 nm.

Ta część badań wymagała dobrego opanowania przez Doktorantkę metod analitycznych niezbędnych do przeprowadzania badań fotochemicznych. Jedną z nich jest wykorzystanie widm MALDI TOF MS. W związku z tym moje pytanie dotyczy danych zamieszczonych w Tabeli 14 (str. 50) oraz Tabeli 20 (str.63). Proszę o dokładniejszy komentarz jak wykonywane były analizy, ponieważ w tej samej tabeli zamieszczone są dane zarówno dla jonów dodatnich jak i ujemnych.

Dążenie do jednoznacznego ustalenia struktury fotoproduktów wymaga wydzielenia ich w takiej ilości, aby możliwe było wykonanie pomiarów widm ^1H i ^{13}C NMR. Tak więc ważną kontynuacją badań modyfikowanych heksamerów było prześledzenie przez Doktorantkę reakcji fotochemicznych 5-bromouracylu zlokalizowanego w mniejszych układach modelowych - dinukleotydach pirymidynowych zawierających uracyl od strony 5' (ODN9) lub od strony 3' (ODN10) 5-bromopochodnej, jak również dimeru zawierającego tyminę od 3'-końca (ODN11). Jest to najbardziej interesujący fragment badań własnych pracy. Szczególnie ważnych danych dostarczyła analiza mieszaniny fotoproduktów utworzonych po naświetlaniu dinukleotydu $^{\text{Br}}\text{UpU}$. Doktorantka na podstawie analizy widm UV i MALDI TOF MS wykazała, że pierwotnym nietrwałym fotoproduktem jest nieobserwowany dotychczas addukt typu cyklobutanowego z atomem bromu w cząsteczce. Zakończone sukcesem wydzielenie dwóch pozostałych produktów, ich analiza technikami NMR, pozwoliła na określenie struktury jednego z nich jako nietrwałego termicznie adduktu typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowego, a drugiego jako stabilnego adduktu 5,5'-diuracylowego. Analogie strukturalne fotoproduktów tworzących się w wyniku naświetlania pozostałych dinukleotydów, jak również wcześniejsze obserwacje przemian fotochemicznych heksamerów dały podstawę do przedstawienia propozycji mechanizmu reakcji fotochemicznej 5-bromouracylu z sąsiadującymi w łańcuchu oligonukleotydowymi zasadami pirymidynowymi, uracylem lub tyminą. Pierwszym efektem naświetlania takich układów jest utworzenie niestabilnego fotochemicznie i termicznie adduktu cyklobutanowego zawierającego atom bromu, który podlega fotochemicznie indukowanemu hydrolytycznemu otwarciu pierścienia cyklobutanowego z jednoczesnym debromowaniem (addycja wody i eliminacja bromowodoru), prowadząc do adduktu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowego, a ten z kolei ulega termicznej dehydratacji do trwałego układu 5,5'-diuracylowego. Uzyskanie dowodów potwierdzających przedstawiony mechanizm jest bez wątpienia sukcesem Doktorantki, ponieważ dotychczas uważano, że głównym procesem fotochemicznym 5-bromouracylu w układach oligonukleotydowych jest hemolityczny bądź heterolityczny rozpad wiązania C5-Br prowadzący do rodnika C5-uracylowego.

W dotychczasowym dorobku Doktorantka posiada jedną publikację w *Tetrahedron Letters*, która jest wynikiem jej współuczestnictwa w badaniach fotochemicznych azydonukleozydów purynowych, natomiast manuskrypt publikacji obejmujący najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych w pracy doktorskiej badań oligonukleotydów modyfikowanych 5-bromouracylem został wysłany do redakcji *Journal of Organic Chemistry*. Ponadto mgr Lepczyńska jest współautorką jedenastu komunikatów konferencyjnych, w większości prezentowanych na Zjazdach Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Podsumując, omówione osiągnięcia Doktorantki składają się na spójną, dobrze zrealizowaną propozycję badawczą – od syntezy modelowych oligonukleotydów, poprzez wielowątkowe badania fotochemiczne, do finalnej propozycji mechanizmu reakcji fotochemicznej 5-bromouracylu z sąsiadującymi w łańcuchu oligonukleotydowym zasadami pirymidynowymi.

W tym miejscu interesujące byłoby poznanie zdania Doktorantki jak uzyskane przez nią wyniki wpłyną na dalsze kierunki badań fotochemii 5-bromouracylu w układach oligonukleotydowych. Może zasadne byłoby zweryfikowanie dotychczasowej obserwacji o braku wpływu struktury dwuniciowej na przebieg procesów fotochemicznych 5-bromouracylu, w oparciu o badania dłuższych dupleksów, stabilnych w temperaturze pokojowej?

Na zakończenie, spełniając obowiązek recenzenta czuję się zobligowana do wskazania ważniejszych uchybień redakcyjnych oraz niektórych błędów merytorycznych wynikających głównie z zastosowanych „skrótów myślowych” oraz niewłaściwych lub niejasnych sformułowań, często należących do tzw. „żargonu laboratoryjnego”

- Zdaniem recenzenta w rozprawie doktorskiej odnośniki powinny mieć numerację zgodną z kolejnością ich pojawiania się w pracy; tymczasem we *Wstępie* jako pierwszy zacytowany jest odnośnik o numerze 27 (str. 8), a następnie odnośniki 6,8, 11; kolejność numeracji odnośników zachowana jest dopiero w *Części teoretycznej*.
- Zastosowana została nieprawidłowa nomenklatura; w spisie *Stosowanych skrótów nazw i symboli* EDIPEA to etylodiiizopropylamina a nie etylenodiiizopropylamina, DNA to kwas deoksyrybonukleinowy a nie dezoksyrybonukleinowy, chromatografia cienkowarstwowa a nie cieńkowarstwowa, HR MS to wysokorozdzielcza spektrometria mas a nie wysokorozdzielcza spektroskopia mas.
- W nazwach blokowanych nukleozydów i innych tego typu pochodnych nukleozydów atom tlenu prawidłowo oznaczany jest dużą literą *O* pisaną italiem np. 2'-*O*-metylouracydyna.
- Proszę o komentarz do sformułowań – *Wodne roztwory dinukleotydów naświetlano analitycznie... oraz preparatywnie w reaktorze... (str. 78); Widma masowe dinukleotydów i ich fotoproduktów wykonano za pomocą aparatu HR ESI MS firmy Bruker (str.97).*
- Do różnego typu wyrażen niefortunnych stylistycznie można zaliczyć: anglicyzmy w składni zdań np. *fotoreakcja 5-bromouracylu w A-DNA formie występującej w hybrydzie DNA-RNA (str. 28), w syntezie modyfikowanych 5-bromouracylem oligonukleotydów (str. 40); niezbędne do syntezy zawierających 5-bromouracyl dinukleotydów reagenty nukleozydowe otrzymałam (str. 41); sformułowania typu fotoprodukty poddane zostały analizie masowej (str. 80), widmo ¹H NMR ujawniło dwa sygnały.(str. 81); dość liczne wyrażenia należące do tzw. żargonu laboratoryjnego – *po wysuszeniu na pompie olejowej (str. 99); całość po osuszeniu rozpuściłam... (str. 99), w celu oczyszczenia nastrzyknęłam na HPLC... (str. 102),**

oligonukleotydy zostały ... zalane 32% amoniakiem (str. 104), po rozwinięciu (płytki TLC) wyskrobano czysty oligomer... (str. 104)

- Autorka nie ustrzegła się też dość znaczącej liczby nieskorygowanych błędów literowych.

Powyższe uwagi nie podważają końcowego stwierdzenia, że mgr Jolanta Lepczyńska w pełni zrealizowała postawione sobie cele badawcze. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są interesującym wkładem w badania fotochemii 5-bromouracylu w układach oligonukleotydowych. Na podkreślenie zasługuje różnorodność technik zastosowanych do realizacji założonych celów, począwszy od warsztatu eksperymentalnego w syntezie organicznej obejmującej zróżnicowane obiekty – modyfikowane nukleozydy, nukleotydy i oligonukleotydy, poprzez opanowanie metodologii badań fotochemicznych aż do opanowania i zastosowania technik chromatograficznych analizy i oczyszczania produktów i wykorzystania zróżnicowanych technik analizy spektralnej do potwierdzenia struktury otrzymanych fotoproduktów.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt. „Fotochemia jedno- i dwuniciowych oligodeoksynukleotydów zawierających 5-bromouracyl w sąsiedztwie zasad pirymidynowych” spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Jolanty Lepczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Sodalacy