

Recenzja pracy doktorskiej mgr Ewy Rajczak zatytułowanej „*Oddziaływanie nowych pochodnych karbazolu i eterów metalokoronowych z G-kwadrupleksami DNA*”

Mgr Ewa Rajczak ocenianą pracę doktorską wykonała w Pracowni Chemii Bioanalitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. Bernarda Juskowiaka. Dotyczy ona zagadnień, którymi prof. Juskowiak interesuje się od lat. Ponadto, przeprowadzone badania były częścią grantu NCN Preludium, którego kierowniczką była doktorantka.

Najogólniej, celem pracy doktorskiej było poszukiwanie nowych ligandów oddziałujących z kwadrupleksami DNA. Sprowadzało się to do syntezy i charakterystyki spektroskopowej nowych ligandów oraz badania ich oddziaływań z kwadrupleksami DNA.

Praca doktorska ma klasyczną postać i zawiera wszystkie części wymagane odpowiednimi przepisami prawnymi. Jest pracą obszerną, bo zajmuje 276 stron, samych rysunków jest 168. Praca napisana jest dobrym językiem, jej treść sformułowana jest w sposób zrozumiały i mimo swojej obszerności czyta się ją z zainteresowaniem. Praca zaczyna się od kilku podziękowań opatrzonych cytatami i podziękowanie dla profesora Juskowiak, wsparte cytatem muzyka rockowego Franka Zappy („*A mind is like a parachute. It doesn't work if it is not open*”) jest głęboko prawdziwe i naprawdę wzruszające.

W części literaturowej, mgr Rajczak pisze o DNA i jego strukturach wyższego rzędu. Główny fragment tej części literaturowej dotyczy oddziaływań DNA z szeroko rozumianymi ligandami. Praca doktorska mgr Rajczak nawiązuje właśnie tego zagadnienia, więc opisanie tego typu oddziaływań jest jak najbardziej właściwe i pomocne. Ponieważ kwadrupleksy DNA są obiektem badań, autorka opisuje ich strukturę, oddziaływania zaangażowane w ich tworzenie oraz ich funkcje biologiczne. Podstawowymi ligandami, którymi zajmowała się doktorantka były pochodne karbazolu i eteru metalokoronowe, więc oczywistym jest, że zostały one szczegółowo opisane w części literaturowej. Sądzę, że autorka mogłaby opuścić w tej części opis dotyczący nukleozydów, nukleotydów, gdyż część literaturowa i tak została przedstawiona na 56 stronach.

Kolejny fragment to część eksperymentalna i zawiera ona szczegółowy opis syntez związków pośrednich, które w dalszej kolejności posłużyły do otrzymania docelowych pochodnych karbazolowych i eterów metalokoronowych. W pewnej części swoich badań autorka posilkowała się procedurami opisanymi wcześniej, ale znaczna część to syntezy nowych związków chemicznych. Opis procedur jest staranny i pozwala na ich powtórzenie przez osoby trzecie. Widma  $^1\text{H}$  NMR nie są często zamieszczane w części eksperymentalnej, ale są na pewno pomocne w przypadku powtarzania syntez przez inne osoby. Zastanawiałem się czytając ten fragment dysertacji, dlaczego w wielu przypadkach doktorantka pozostawiała mieszaninę po przerobieniu „do powolnego zagęszczania”? Tradycyjnie też muszę zaprotestować, gdy doktorantka używa sformułowania „sekwencja” w znaczeniu, na przykład, „sekwencje DNA zostały zakupione...” (strona 116). Według definicji encyklopedycznej „sekwencja to uporządkowany ciąg znaków, symboli stanowiący strukturę układu, systemu”. Oznacza to, że doktorantka dokonała zakupu i używała do badań oligonukleotydów o określonej sekwencji. Za bardzo także nie rozumiem, dlaczego do obliczenia stężeń badanych DNA doktorantka nie stosowała zależności wynikających z prawa Lamberta-Beera.

Jak zawsze najciekawsza część pracy doktorskiej dotyczy dyskusji uzyskanych wyników. Jak cała praca doktorska, również ta część jest bardzo obszerna, bo zawarta jest na 119 stronach. Ogólnie rzecz ujmując, doktorantka zajmowała się badaniami dwóch pochodnych karbazolu oraz ośmiu eterów metalokoronowych. W przypadku ligandów metalokoronowych kryterium wyboru była ich trwałość w wodnym buforze przez czas wymagany do przeprowadzenia badań (około 3 godziny). Natomiast modelowymi DNA były cztery oligonukleotydy, z których trzy tworzyły kwadrupleksy, a jeden z nich, będący układem referencyjnym, tworzy dupleks. Użyte do badań DNA są skorelowane z procesem wydłużania telomerowego DNA, a taka zwiększona aktywność telomerazy jest obserwowana w przypadku procesu nowotworzenia. Już to wskazuje, że doktorantka

bada bardzo ważny biologicznie proces. Jej celem jest opracowanie metody inhibicji telomerazy, a tym samym procesu nowotworzenia.

Autorka bardzo skrupulatnie przeprowadziła analizę spektralną wszystkich ligandów, które zamierzała wykorzystać w badaniach. Na podstawie analiz dokonała także wyboru eterów metalokoronowych. Charakterystyka spektralna była o tyle ważna, że stanowiła rodzaj referencji do badań oddziaływań modelowych DNA i ligandów. Dla całej grupy (ośmiu) eterów metalokoronowych są to badania podobnego typu i osobie stojącej trochę na uboczu biofizyki łatwo się w nich pogubić.

Dla mnie szczególnie ciekawa była ta część badań, w których doktorantka skupiła się na oddziaływaniach ligandów i modelowych DNA. Do badań oddziaływań mgr Rajczak wykorzystywała zmiany w widmach dichroizmu kołowego DNA po dodaniu do nich stopniowo rosnących ilości eterów metalokoronowych. Na podstawie widm różnicowych doktorantka stwierdza, że zwiększenie stężenia metalokoron prowadzi do destabilizacji struktury kwadrupleksów DNA. Przy czym proces jest zależny od typu eteru metalokoronowego i jonów metali, które go budują. O braku strukturalnej selektywności oddziaływania eterów metalokoronowych z kwadrupleksami DNA świadczy obserwacja, że podobne zaburzenie struktury doktorantka obserwowała także dla referencyjnego dupleksu DNA.

Doktorantka przeprowadziła również obszerne badania termodynamiczne dotyczące temperatur topnienia modelowych DNA w obecności eterów metalokoronowych. Zwykle równomolowe lub dwukrotnie większe stężenie eteru metalokoronowego nie zmienia temperatur topnienia modelowego DNA. Koniecznym było dodanie 6-10 krotnego nadmiaru eteru metalokoronowego, aby zaobserwować zmianę temperatury topnienia. Gdyby doktorantka dokonała pomiarów trwałości termodynamicznej dla kilku stężeń DNA to być może można byłoby także powiedzieć więcej o strukturze badanego DNA. Autorka przeprowadziła także analizy widm CD wykonanych w różnych temperaturach i na tej podstawie, obserwując zmianę pasma przy 295 nm, stara się określić zmiany w strukturze modelowego kwadrupleksu. Z wszystkich eterów metalokoronowych szczególnie obiecujący wydaje się być eter oznaczony symbolem Cu 12-MC-4, gdyż prowadzi on do częściowej zmian struktury kwadrupleksu GQ 22Htel podczas dodawania kolejnych porcji eteru. Podobne zmiany strukturalne wywoływało topnienie kwadrupleksu w obecności tego eteru metalokoronowego, a zmiany obserwowane były z wykorzystaniem widm CD.

Obserwacje te sugerują, że obecność niektórych eterów metalokoronowych może prowadzić do rearanżacji strukturalnych kwadrupleksów w formy, które są termodynamicznie bardziej stabilne. Ciekawym musi być mechanizm takiej rearanżacji. Czy doktorantka sądzi, że następuje rozplecenie wszystkich czterech nici i złożenie kwadrupleksu w nowym ułożeniu izomorficznym czy raczej kwadrupleks rozdysocjowuje na dwa dupleksy, które łączą się ponownie w odmiennie kwadrupleks?

Doktorantka przeprowadziła także szereg eksperymentów spektralnych polegających na wypieraniu z kwadrupleksu DNA oranżu tiazoliowego przez badane etery metalokoronowe. Pozwoliło to określić wartości stałych wiązania dla każdej z metalokoron i jednocześnie skorelować ich wartości z badaną wcześniej trwałością termiczną struktury G-kwadrupleksu przez te same metalokorony.

Trochę odmienny element badań dotyczył przydatności eterów metalokoronowych do chemicznej degradacji DNA. Do analizy stabilności DNA doktorantka stosowała elektroforezę na żelu agarozowym a modelowym DNA był plazmid pBR322. Trochę mnie dziwi, że doktorantka użyła DNA zawierający ponad 4200 par zasad. Jedynym wytłumaczeniem może być fakt, że forma liniowa tego kołistego DNA migruje na żelu agarozowym inaczej. Osobiście do takich badań użyłbym znacznie krótszych modeli DNA i wtedy analizę stabilności DNA można byłoby prowadzić za pomocą HPLC, TLC czy elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (PAGE). W przypadku oligonukleotydów doktorantka miałaby możliwość śledzić jedynie stabilność chemiczną DNA a nie także jego rearanżacji strukturalnych, jak to ma miejsce w przypadku plazmidowego DNA.

Autorka obserwowała degradację plazmidowego DNA, którego stopień wzrastał wraz z rosnącym stężeniem kationu miedzi. Podobne degradacje autorka obserwowała działaniem kilku eterów metalokoronowych zawierających różne kationy metali o podobnym, co referencyjny kation miedziowy,

stężeniu. Ten proces zachodzi dla niektórych eterów metalokoronowych i jest uwarunkowany stężeniem eteru i  $H_2O_2$ . Dla kilku eterów metalokoronowych ich obecność nie powoduje degradacji kołistego DNA, ale jego transformację do struktury bardziej rozplecionej. Właśnie możliwość dwoistej funkcji eterów metalokoronowych, czyli zmiany struktury oraz degradacji plazmidowego DNA sprawia, że nie jest on optymalnym modelowym DNA do tego typu badań.

Mgr Rajczak mniej miejsca poświęciła badaniom dwóch ligandów karbazolowych. Dla obu ligandów badała proces ich fotoizomeryzacji, chociaż ze względu na warunki izomeryzacji (naświetlanie próbki przez godzinę przy 272 nm) uzasadnienie wartości biologicznej takiego procesu jest wątpliwe. Ponadto, autorka proces fotoizomeryzacji badała w roztworach organicznych, co również pozwala wątpić w możliwość przeprowadzenia takiego procesu w komórkach. Proces fotoizomeryzacji analizowała śledząc zmiany widm UV-Vis, dichroizmu kołowego wspomagając się podczas analizy spektrometrią mas. Przeprowadziła także obszerne badania wiązania się obu ligandów karbazolowych do modelowych kwadrupleksów DNA oraz wykazała, że DNA i ligand wiążą w ilościach równomolowych, a wiązanie następuje poprzez oddziaływania warstwowe obu składników kompleksu.

Praca doktorska mgr Ewy Rajczak jest bardzo obszerna i interesująca. Widać w niej, że doktorantka włożyła ogrom pracy w przeprowadzone badania. Moim zdaniem badania są za obszerne i z części z nich można byłoby zrezygnować, na przykład z tego fragmentu, który dotyczył degradacji plazmidowego DNA działaniem eterów metalokoronowych. Rozumiem, że celem przeprowadzonych badań była modulacja aktywności biologicznej kwadrupleksowego DNA związanego z procesem nowotworzenia za pomocą wybranych ligandów. W pracy zabrakło mi pewnych typów badań, które można byłoby przeprowadzić na wstępie i w ten sposób ograniczyć grupę badanych ligandów. Mam na myśli następujące badania:

1/ cytotoksyczności ligandów na liniach komórkowych, na przykład *HeLa*. Jeśli ich cytotoksyczność jest wysoka to ogranicza/eliminuje to przydatność takiego ligandu.

2/ przenikalności przez błony komórkowe. Jest to może trudne zagadnienie badawcze, ale jeśli ligand nie przeniknie przez błony komórkowe to jego przydatność jest także ograniczona. Etery metalokoronowe są obdarzone wieloma ładunkami i może to stanowić duży problem podczas przenikania eterów przez błony komórkowe. Dodatkowo, nie wiadomo czy strukturalnie złożony eter zachowa swoją strukturę wchodząc do komórki.

3/ z pracy doktorskiej widać, że badania fizykochemiczne są ulubionymi doktorantki. Należy jednak pamiętać, że jeśli dwa składniki oddziałują ze sobą, w tym przypadku DNA i ligand, to należałoby się pochylić także nad tym, co się dzieje z DNA podczas takiego oddziaływania. Doktorantka prawie wyłącznie obserwuje zmiany ligandów. To prawda, że dichroizm kołowy informuje w pewnym stopniu o strukturze DNA, ale metoda ta nie daje „twardych informacji” o strukturze. Być może wykonanie żeli poliakrylamidowych w warunkach natywnych dałoby informacje o rearanżacjach strukturalnych modelowych DNA. Czy doktorantka ma pewność, że użyty do badań kwadrupleks DNA występował w jednej tylko izoformie strukturalnej?

Prosiłbym bardzo doktorantkę, aby do tych uwag odniosła się podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

Reasumując, uważam, że mgr Ewa Rajczak przeprowadziła ogromną ilość wartościowych badań. O tym świadczyć mogą trzy prace, które dotychczas na temat przeprowadzonych badań opublikowała. Są to wyniki, które zapewne w przyszłości pozwolą grupie profesora Juskowiaka i innym badaczom w świecie efektywniej prowadzić badania dotyczące inhibicji procesów nowotworzenia wybierając za cel kwadrupleksy DNA.

Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Ewy Rajczak spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Ewy Rajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Chemii UAM o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Ewy Rajczak. Obszar przeprowadzonych przez doktorantkę badań jest bardzo rozległy, a ich poziom naukowy bardzo wysoki. W dużej części są to badania nowatorskie, z dużymi szansami zastosowania w terapii schorzeń nowotworowych lub przynajmniej stwarzające solidne podstawy do prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Ryszard Kievel