

Warszawa, 23/8/2016

Dr hab. Dariusz Plewczyński, prof. UW
Laboratorium Genomiki Funkcjonalnej i Strukturalnej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
Ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa, Polska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej
mgr Kingi Salus
zatytułowanej

*„Połączenia krzyżowe pochodnych cysteiny z aldehydowymi adduktami
nukleozydów adeninowych”*

wykonanej w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych
Wydziału Chemii, Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem promotora prof. UAM dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki
oraz promotora pomocniczego dr Tomasza Siodło

Rozprawa doktorska mgr Kingi Salus została przygotowana pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki która wskazała doktorantce interesującą tematykę badawczą i wspierała w trybie codziennym realizację jej prac, oraz promotora pomocniczego dr Tomasza Siodło, który pomagał przy wykonywaniu obliczeń kwantowo-chemicznych. Tematyka pracy skupia się na wiązaniach krzyżowych, tj. kowalencyjnych lub koordynacyjnych połączeniach między biocząsteczkami, takimi jak DNA czy białka.

Nie jest moim celem przekonywanie Szacownej Rady Wydziału, jak kluczowym dla zrozumienia problemu naukowego jest łączenie metod doświadczalnych i modelowania molekularnego, szczególnie przy próbie opisu

oddziaływać między DNA, RNA i białkami. Jednak chciałbym zwrócić uwagę na odwagę w postawieniu nietrywialnego pytania o mechanizm biofizyczny mogący prowadzić do powstawania mutacji DNA *in vivo*, oraz w przypadku białek mieć skutki cytotoksyczne, a także pytania oraz próby (moim zdaniem udane) rozwiązania tego problemu przy użyciu różnorodnych metod badawczych. Praca doktorantki jest wartościowym krokiem w kierunku zrozumienia efektów interakcji między białkami i DNA/RNA.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest owocem udanego połączenia badań obejmujących syntezę organiczną i modelowanie molekularne. Jak wskazała to doktorantka: *„celem prowadzonych badań było zbadanie możliwości tworzenia połączeń krzyżowych typu DNA-białko oraz RNA-białko przez aldehydowe addukty nukleozydów adeninowych z pochodnymi cysteiny. Adenina, adenozyne oraz 2'-deoksyadenozyna reagują z aldehydem malonowym i glioksałem oraz odpowiednio metyloglioksałem, tworząc egzocykliczne pochodne, w których pięcioczłonowy, nienasycony pierścień posiada podstawnik dialdehydometylowy. (...) addukty te mogą ulegać reakcjom z biologicznymi nukleofilami, prowadząc do powstania połączeń krzyżowych. Ugrupowanie tiolowe cysteiny uważane jest za najbardziej reaktywną grupę nukleofilową białek.”*

Ten cel nadrzędny wymagał przeprowadzenia badań, jak to formułuje doktorantka: *„reaktywności wymienionych adduktów [adeniny i jej nukleozydowych pochodnych] wobec ugrupowań tiolowych N-acetylocysteiny (NAC) i glutationu (GSH), oraz charakterystyka strukturalna i badania trwałości powstających modelowych połączeń krzyżowych DNA-białko”*.

Wybór celu i obiektu prowadzonych badań jest w pełni uzasadniony z uwagi na fakt, że połączenia krzyżowe typu DNA-białko i RNA-białko z udziałem cysteiny mogą odgrywać dużą rolę w uszkodzeniach kwasów nukleinowych i odpowiadających za ich metabolizm białek.

Najogólniej charakteryzując liczącą 307 stron dysertację, trzeba zauważyć jej szeroki zakres tematyczny, co prowadziło do daleko posuniętej zwięzłości wypowiedzi. Rozprawa przygotowana jest w języku polskim, została podzielona w sposób klasyczny na wprowadzenie (1 str.), część literaturową (50 str.), cel pracy (3 str.), opis badań własnych (65 str.), podsumowanie wraz z najważniejszymi osiągnięciami (7 str.), część eksperymentalną (11 str.) charakterystykę związków (9 str.). Całość poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim abstraktem w języku angielskim spisem stosowanych skrótów, a zakończona listą literatury obejmującej 234 pozycje oraz załącznikami (100 str.).

Aby zrealizować ambitnie sformułowany cel rozprawy, doktorantka wykorzystowała odpowiednio dobrane metody badawcze: chromatograficzne,

chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, spektroskopii UV-Vis oraz magnetycznego rezonansu jądrowego. W toku prowadzonych badań używała metod modelowania molekularnego. Większość obliczeń została wykonana z zastosowaniem teorii funkcyjności gęstości (DFT – Density Functional Theory) przy użyciu popularnych funkcyjności B3LYP oraz M06 w połączeniu z różnymi bazami funkcyjnymi aż do baz rozbudowanych tj.: 6-311++G(2df,2pd) z trójrotnie rozszczepioną powłoką walencyjną i funkcjami polaryzacyjnymi i dyfuzyjnymi.

Aby zasymulować środowisko wodne stosowano model ciągły rozpuszczalnika wodnego (PCM – Polarizable Continuum Model). W niektórych badaniach użyto metodę rachunku zaburzeń Möllera-Plesseta z poprawkami drugiego rzędu. Niestety doktorantka nie przedstawiła wystarczająco klarownie powodów dlaczego w prowadzonych przez nią obliczeniach nie wykorzystywała baz funkcyjnych typu cc-pVDZ (correlation-consistent polarized valence double-zeta), czy cc-pVTZ (correlation-consistent polarized valence triple-zeta). Podejrzewam, że pewnym wyjaśnieniem mogą być wyniki K.B. Wiberga (J. Comput. Chem. 2004,25: 1342), ale czy jedynym – pewien niedosyt pozostawia brak dyskusji w tym względzie.

Tym niemniej cele rozprawy udało się zrealizować. Należy w pełni zgodzić się z doktorantką, iż z sukcesem: ustalono położenie podstawnika dialdehydometylowego w badanych adduktach, zaprzeczając wcześniejszym doniesieniom literaturowym. Dokonano tego łącząc modelowanie molekularne z dwuwymiarowymi technikami 2D NMR. Pokazano, że badania obliczeniowe mogą być bardzo pomocne w określaniu struktury związków, zwłaszcza, gdy widma korelacyjne (w szczególności NOESY), nie są jednoznaczne. Doktorantka porównując dane uzyskane z widm NMR wykonanych dla dyskutowanych związków w różnych rozpuszczalnikach z wynikami obliczeń przeprowadzonych przy użyciu różnych baz funkcyjnych i funkcyjności zidentyfikowała dogodną dla tych związków metodę przewidywania wartości przesunięć chemicznych ^1H , a także ^{13}C NMR.

Jak słusznie zauważa doktorantka: *„Na podstawie wyników badań spektroskopowych, spektrometrycznych oraz obliczeniowych określono strukturę wyizolowanych połączeń krzyżowych typu DNA-białko i RNA-białko (...), zaproponowano mechanizm ich powstawania oraz przeprowadzono badania trwałości w warunkach fizjologicznych. Ustalono, że zgodnie z oczekiwaniami otrzymane związki powstają najprawdopodobniej w wyniku addycji Michaela grupy tiolowej N-acetylocysteiny do α,β -nienasyconego ugrupowania karbonylowego adduktów połączonej z dehydratacją. Przeprowadzone w warunkach fizjologicznych badania trwałości zsyntezowanych połączeń krzyżowych pozwoliły stwierdzić, że ulegają one*

powolnemu rozpadowi, w wyniku czego powstają addukty wchodzące w skład poszczególnych połączeń oraz związki zidentyfikowane jako pochodne tych adduktów i amoniaku (...). W obecności Na-acetylolizyny badane połączenia krzyżowe okazały się być bardzo nietrwałe i ulegały przekształceniu w pochodne Na-acetylolizyny.”

Jako bardzo ważny rezultat przeprowadzonych badań należy uznać hipotezę, iż hydroliza enzymatyczna połączeń krzyżowych białek z DNA powoduje, że jak stwierdza to doktorantka „*nawet jeśli pierwotnie zostały utworzone połączenie krzyżowe, w które zaangażowana jest grupa tiolowa, w procesie trawienia enzymami proteolitycznymi dochodzi najprawdopodobniej do ich przekształcenia i powstania połączeń zawierających reszty aminokwasowe lizyny lub terminalne grupy aminowe*”. Aż prosi się by doktorantka zaproponowała eksperymenty pozwalające potwierdzić bądź zaprzeczyć tej tezie. Sądzę, że taka dyskusja byłaby wskazana w trakcie publicznej obrony.

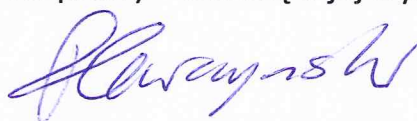
Jako elementy dyskusyjne należy postawić pytania dlaczego nie przeprowadzono badań na organizmach żywych. O ile można zgadywać, że doktorantka koncentrowała się na zagadnieniach chemicznych to jednak badania choćby na organizmach eukariotycznych znacząco podniosłyby wartość naukową pracy. Czy nie warto byłoby zbadać możliwości tworzenia wiązań krzyżowych z peptydami bogatymi w cysteinę szczególnie w świetle doniesień o stosowności znaczników oligo-cysteinowych do immobilizowania białek w chipach proteinowych. (prace T. Ihichary np. *J. Proteome Res.*, **2006**, 5 (9), pp 2144–2151).

Doktoranta w przypadku badań związanych z cysteiną przeprowadziła bardzo szczegółową analizę widm NMR. Niestety w przypadku badań dotyczących glutationu takiej analizy brakuje. Dlaczego?

Rozprawa przedstawiona przez doktorantkę, pomimo drobnych (i niewartych wymienienia) usterek językowych, napisana jest interesująco i świadczy o bardzo dobrym zrozumieniu stawianych zadań badawczych. Doktorantka pokazała, że dobrze rozumie i umiejętnie używa różne metody badawcze, odważnie formułuje hipotezy naukowe i je rygorystycznie weryfikuje tak więc ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki należy ocenić bardzo wysoko. Nie sposób nie zauważyć, że część wyników badań doktorantki było poddane szczegółowej ocenie przez recenzentów wybranych przez edytorów czasopism naukowych. W renomowanych czasopismach, są to zwykle bardzo rygorystyczne oceny.

Ocena końcowa

Podsumowując moją recenzję rozprawy doktorskiej pani magister Kingi Salus stwierdzam, że zaprezentowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej, udane połączenie metod obliczeniowych i eksperymentalnych, a także walory aplikacyjne oceniam rozprawę doktorską mgr Kingi Salus jako ważny wkład w rozwój do naszej wiedzy o chemii. Uważam, że rozprawa ta spełnia zwyczajowe i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, demonstruje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zgłaszam Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie pani magister Kingi Salus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo – biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom naukowy rozprawy – wnoszę o jej wyróżnienie.



Dr hab. Dariusz Plewczynski, prof. UW