



Opole 4 września 2018

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Malwiny Muńko,
pt.: „Modyfikacje strukturalne zasad DNA i aminokwasów powstające pod wpływem
działania dwufunkcyjnych związków karbonylowych ”
wykonanej w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych
Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki
oraz dr hab. Anny Szwajcy

Rozwój stosownych metod badawczych pozwala na coraz bardziej wnikliwe analizowanie mechanizmów zaburzeń funkcjonowania organizmów, zachodzących na poziomie przemian chemicznych określonych metabolitów. W naturalny sposób wiele prac związanych z tą tematyką dotyczy przemian najistotniejszych makrobiomolekuł, wśród których znajdują się kwasy nukleinowe i białka oraz ich mery. Udział aminokwasów, jako substratów w biosyntezie nukleotydów, a z drugiej strony kluczowa rola mRNA, tRNA i rRNA w biosyntezie białek, nierozzerwalnie wiążą szlaki metaboliczne obu wspomnianych grup biopolimerów. Dlatego też przemiany chemiczne, które w niekontrolowany sposób prowadzą do zmiany struktur nukleozydów i aminokwasów, a przez to dezorganizują biosyntezę kwasów nukleinowych i białek, są istotnym obszarem badań naukowych związanych z chemicznymi podstawami życia na poziomie komórki.

Tok badań Pani mgr Malwiny Muńko, omówiony w dysertacji doktorskiej przedstawionej mi do oceny, znakomicie mieści się w tym obszarze, eksponując naturę mechanizmów reakcji tworzenia i rozpadu adduktów nukleozydów DNA i wybranych aminokwasów z modelowym oksoenalem; 5,5-dietoksy-4-oksopent-2-enalem (DOPE). Substancja ta reprezentuje grupę metabolitów; produktów peroksydacji lipidów, produktów przemian wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i karotenoidów oraz produktów reakcji zachodzących pomiędzy białkami i cukrami redukującymi. Szczególnie często wymienianym przedstawicielem tej grupy jest furan, zaliczany do substancji potencjalnie kancerogennych ze względu na specyficzną reaktywność chemiczną swojej pochodnej; *cis*-2-buten-1,4-dialu

(*cis*-BDA), powstającego w wyniku przemian katalizowanych przez enzymy należące do nadrodziny cytochromu P450 (CYP). Przedmiotem studiów przeprowadzonych przez Autorkę były addukty powstające w reakcjach związku modelowego DOPE oraz *cis*-BDA z nukleozydami DNA oraz addukty tych oksoenali z wybranymi aminokwasami. Cechą charakterystyczną substratów nukleozydowych: 2'-deoksycytydyny, 2'-deoksyadenozyny i 2'-deoksyguanozyny jest obecność egzocyklicznej grupy aminowej, natomiast dobór aminokwasów: *N*-acetylocysteiny (NAC) oraz *N*^α- i *N*^ε-acetylolizyny (NAAL; NEAL) wynikał ze szczególnych skłonności cysteiny i lizyny do tworzenia modyfikacji strukturalnych, określanych jako białkowe wiązania krzyżowe (ang. *protein cross links*).

Relacja toku badań, poprzedzona omówieniem stanu wiedzy w zakresie głównych wątków problemu, tworzy klasyczną w swoim układzie dysertację doktorską liczącą 171 stron. Na tak obszerny zbiór informacji składają się: wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń; streszczenie (w języku polskim i angielskim); wprowadzenie, w którym Autorka syntetycznie ujmuje naukowe przesłanki swoich studiów; sformułowany odrębnie cel badań; rozbudowana, ułożona logicznie i dobrze udokumentowana odpowiednimi odnośnikami część literaturowa, zawierająca wybrane dane dotyczące problematyki pracy; omówienie wyników; opis stosowanych metod i procedur badawczych; podsumowanie wraz z wnioskami; spis cytowanej literatury oraz załącznik zawierający szczegółowe dane spektroskopowe (NMR) i spektrometryczne (MS). Na uznanie zasługuje jakość składu i estetyka dysertacji, ułatwiająca jej lekturę, mimo znaczącej liczby danych liczbowych i szczegółowych opisów rozwiązania struktur produktów prowadzonych reakcji. Analizę ważniejszych danych liczbowych ułatwia ich zestawienie w formie dziewięciu (9) tabel (łącznie z umieszczonymi wśród załączników). Z kolei osiemdziesiąt dwa (82) rysunki (razem z załącznikami) zawierające wzory struktur substancji, widma i chromatogramy oraz trzydzieści cztery (34) schematy graficzne opisujące przebieg i mechanizmy reakcji, dobrze wizualizują i uzupełniają tok narracji zaproponowany przez Autorkę

Mocną stroną przekazu jest jego klarowność, kluczowa wobec niezwykle skrupulatnie zrelacjonowanych badań strukturalnych, w wyniku których, dzięki zestawieniu danych uzyskanych w toku eksperymentów ¹H oraz ¹³C NMR, przeprowadzonych z zastosowaniem różnych technik oraz informacji uzyskanych w toku analiz spektrometrycznych, ustalono skład i kompozycję przestrzenną molekuł otrzymanych adduktów. Warto podkreślić, iż Autorka nie ograniczyła się do jedynie syntezy tych pochodnych, ale zajęła się, co ważne z sukcesem, badaniem mechanizmów ich tworzenia, a także trwałością w warunkach zbliżonych do warunków fizjologicznych.

W kontekście trwałości adduktów, bardzo interesującym wynikiem doświadczeń Doktorantki jest wykazanie, że jednym z produktów degradacji połączeń DOPE-DC-1A i 1B,

może być 2'-deoksyurydyna – nukleozyd zawierający zasadę azotową tworzącą struktury kwasów RNA. Nukleozyd ten zidentyfikowano także jako główny produkt rozpadu adduktów *cis*-2-buten-1,4-dialu z 2'-deoksytydyną (BDA-DC-1A i 1B). Trudno jednak, w świetle dostępnej wiedzy w tym zakresie, zgodzić się ze stwierdzeniem Autorki sformułowanym we wniosku 4, iż proces ten (degradacja adduktu) „... może mieć istotne znaczenie biologiczne związane ze zmianami sekwencji zasad w DNA.” Możliwe natomiast, że pod wpływem pochodnych furanu wzrasta stężenie zasad, tworzących specyficznie RNA, a równocześnie zmniejsza się pula nukleozydów niezbędnych do biosyntezy DNA. Wynik ten jest zatem istotny z punktu widzenia regulacji procesów biosyntezy nukleotydów pirymidynowych, która ma charakter sprzężenia zwrotnego.

Wspominając o mechanizmach badanych przemian, warto podkreślić umiejętne wykorzystanie przez Doktorantkę metod obliczeniowych, dzięki czemu proponowane mechanizmy tworzenia adduktów DOPE z deoksytydyną zyskują potwierdzenie z punktu widzenia termodynamiki tych procesów.

Niemniej jednak, niektóre poruszane w treści rozprawy kwestie wymagają, w moim przekonaniu, komentarza, czasem wyjaśnienia. I tak:

- Str. 20 - Schemat 1 Z formalnego punktu widzenia, w strukturze pierwszego produktu degradacji adduktu DOPE-DC-1A i 1B, liczba atomów każdego rodzaju nie odpowiada liczbie atomów wnoszonych do tego połączenia. Warto zaznaczyć, o czym Autorka pisze na str. 90, że niezbędny w tym procesie jest udział wody (wspomniany atak nukleofilowy). Natomiast wśród produktów kolejnego etapu procesu degradacji brakuje molekuly zawierającej układ dietoksylowy, będący być może częścią struktury α,β -nienasyconego ketoaldehydu, wspomnianego na str. 90. Czy oznacza to, że odtwarza się DOPE ? Bardzo proszę o wyjaśnienie tej kwestii.
- Str. 57 – podrozdział 3.5.2; niejednoznaczny przekaz stwierdzenia: "Obecność w DNA reaktywnej pochodnej dialdehydowej" które wzbudza wątpliwości co do tego, że BDA także jest "dialdehydem" i znacząco różnicuje role "dialdehydu" i BDA. Proszę o wyjaśnienie.
- Str. 64 - Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem Autorki: "Przytoczone wyniki badań sugerują, że BDA-1-4-GSH ...", gdyż z przedstawionych wcześniej informacji wynika, że GSH wiąże się skutecznie z produktem przemian furanu, a przedstawiony schemat sugeruje zachodzenie tego typu reakcji niezależnie od obecności GSH, o czym Autorka pisała wcześniej. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie czy naprawdę i w jaki sposób glutation przyczynia się do „ogólnych właściwości toksycznych” furanu.

- Str. 71 - Rysunek 17; Wydaje się mało prawdopodobne, że wartość przesunięcia sygnału jednego z protonów pierścienia furanowego FDA wynosiła 7.35, czyli dokładnie tyle, ile wartość przesunięcia sygnału jednego z protonów olefinowych DOPE. Wskazuje na to także odniesienie widma substratu do podanej skali. Czy identyczne wartości to kwestia kopiowania danych liczbowych, czy też w tym przypadku te wartości są identyczne? Jeżeli tak jest to jakie może być wyjaśnienie?
- Str. 93 - Czy Autorka mogłaby wyjaśnić na podstawie jakich charakterystycznych widm UV zidentyfikowała powstające produkty reakcji DOPA z mieszaniną nukleozydów? Czy udało się skutecznie rozdzielić powstające produkty, czy raczej mniejsza, od sygnałów dG i dA, intensywność sygnału dC po dłuższym czasie, była podstawą tego stwierdzenia?
- Str. 110 - Schemat 30 - Zaproponowany mechanizm tworzenia DOPE-NAC-NAAL-2 obejmuje hydrolizę grupy acetalowej zachodzącą w warunkach, w których nie obserwowano tego zjawiska w przypadku tworzenia adduktów DOPE z nukleozydami. Ponadto, zgodnie z informacjami podanymi w podrozdziale 4.4.1.4.1., kiedy pierwszym reagującym aminokwasem była N^α-acetylolizyna, powstające addukty DOPE-NAAL-1 oraz DOPE-NAAL-2 także zawierały grupę acetalową. Czy zatem, można wskazać czynniki, które promują, albo ograniczają proces hydrolizy tego ugrupowania w zależności od struktury tworzonego adduktu?

Lektura dysertacji skłania także do bardziej ogólnych pytań dotyczących powstawania adduktów oksoenali z różnymi formami RNA, występującymi również poza obszarem jądra komórkowego, wobec czego łatwiej dostępnymi dla pochodnych furanu. Czy znane są jakiegokolwiek addukty oksoenali lub dialdehydów z fragmentami RNA, bądź DNA ?

W ocenianej, bardzo starannie zredagowanej pracy, zauważyłem nieliczne potknięcia edytorskie, które przytaczam wyłącznie z obowiązku recenzenta:

- w wykazie stosowanych skrótów i oznaczeń znalazły się odrębne oznaczenia: „A”, „B”, „C” oraz „D”, opisane identycznie jako: „produkt powstający w reakcji DOPE z N-acetylocysteiną oraz lizyną”. Chociaż uważam za niepotrzebne włączenie oznaczeń porządkowych do wykazu skrótów to, jeżeli Autorka naprawdę chciała umieścić tego typu informacje w tej części pracy, należało wprowadzić opis w rodzaju: „A, B, C, D – produkty powstające w reakcji DOPE z N-acetylocysteiną oraz lizyną”. Podobna uwaga dotyczy oznaczeń „D” oraz „F”.

Str. 36 - Schemat 4; We wzorze powstającego HNE-dG brakuje atomu N3 azotu, obecnego w pierwotnym, sześciocłonowym pierścieniu 2'-deoksyguanozyny

Str. 57 – źle oznaczony jon hydroksylowy w siódmym wierszu podrozdziału 3.5.2.

Str. 73 - Rysunek 20; wartości przesunięć chemicznych protonów metinowych H3a oraz H3b nie odpowiadają tym, które w opisie podano jako charakteryzujące formy *cis* i *trans* hydratów.

Str. 75 - W zdaniu "Związki z pary eluującej ..." poprawna forma powinna brzmieć "związki z pary eluowanej"

Str. 82-83 – Rys.25 -Wartości energii podanej na diagramach B1 oraz A2, różnią się od tych podanych w Tabeli 3. Czy zatem poprawnie wskazano preferowane mechanizmy tworzenia adduktów ?

Str. 89 - Rys. 33 – Czas reakcji wyrażony liczbą dni wynosi: siedem (7) w opisie chromatogramu, natomiast dziesięć (10) w tekście opisującym eksperyment. Która wartość jest właściwa?

Str. 90 - Rys. 34 - Czy temperatura w opisie rysunku nie powinna wynosić 50° C, a czas 10 dni - jak podano w odpowiednim akapicie tekstu ?

Str. 103 - Rys. 45 - Podana wartość m/z fragmentu 255.0798 nie odpowiada masie odpowiedniego fragmentu struktury molekuly. Wartość m/z tego fragmentu powinna wynosić ok. 269, co znajduje potwierdzenie w prezentowanym widmie.

Pomimo ich umieszczenia w recenzji, chciałbym stwierdzić, że sformułowane wcześniej komentarze, prośby o wyjaśnienie pewnych kwestii, czy uwagi techniczne, nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Malwiny Muńko. Całość opracowania stanowi bowiem niezwykle skrupulatną relację dobrze przemyślanego toku badań: od wskazania problemu naukowego, poprzez sformułowanie hipotezy opartej na racjonalnych, dobrze udokumentowanych przesłankach i przeprowadzeniu licznych eksperymentów, po wnikliwą interpretację i dyskusję oryginalnych wyników. Doceniając walory przedstawionej mi do oceny dysertacji, chciałbym zauważyć, że opracowanie to dostarcza wartościowych naukowo, nowych informacji dotyczących możliwości i mechanizmów tworzenia adduktów oksoenali z nukleozydami DNA zawierającymi egzocykliczną grupę aminową oraz dokumentuje możliwość tworzenia nieznanych wcześniej połączeń krzyżowych, powstających w warunkach fizjologicznych, w reakcjach *cis*-2-buten-1,4-dialu z N-acetylocysteiną i N^α- lub N^ε-acetylolizyną. Kolejnym wartym podkreślenia osiągnięciem Doktorantki jest udowodnienie, że w wyniku niekatalizowanych enzymatycznie przemian adduktów oksoenalu z 2'-deoksycytydyną, powstaje 2'-deoksyurydyna, zawierająca zasadę specyficzną dla kwasu rybonukleinowego. Na szczególne uznanie zasługuje w pełni profesjonalne podejście Autorki do problemu ustalania struktur produktów przeprowadzonych syntez, oparte na wnikliwej i bardzo precyzyjnej analizie danych spektroskopowych i spektrometrycznych.

Dlatego też, w moim przekonaniu, niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. z późniejszymi zmianami, wobec czego wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Pani mgr. Malwiny Muńko, do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ponadto, biorąc pod uwagę poziom merytoryczny ocenianej dysertacji, proponuję Wysokiej Radzie rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr Malwiny Muńko.

