



POLSKA AKADEMIA NAUK

Prof. dr hab. Jan Barciszewski



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19

fax: 61 852 05 32, e-mail: [ibch@ibch.poznan.pl](mailto:ibch@ibch.poznan.pl)

REGON 000849327

NIP 777-00-02-062

e-mail: [Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl](mailto:Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl)

25 lipca 2018

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Malwiny Muńko

pt.

Modyfikacje strukturalne zasad DNA i aminokwasów powstające pod wpływem działania dwufunkcyjnych związków karbonylowych

#### 1. Tematyka rozprawy doktorskiej

Kilka lat po zaproponowaniu modelu struktury DNA, Francis Crick, jeden z jego twórców sformułował Centralny Dogmat Biologii Molekularnej. Według tej hipotezy przepływ informacji genetycznej następuje od DNA poprzez RNA do białka. Ta informacja jest zakodowana w postaci określonej sekwencji nukleotydów DNA, a następnie przekazywana w niezmienionej formie następnym pokoleniom. Zmiany w dokładności procesu przekazu (translacji) informacji prowadzą do zaburzeń metabolizmu komórkowego. Mogą one występować na poziomie DNA, RNA i białka. Zmiany w sekwencji DNA w wyniku mutacji lub chemicznej modyfikacji zaburzają sekwencję aminokwasów kodowanego białka, ale mogą ulec korekcie albo naprawie. Warto w tym miejscu przypomnieć, że za badania mechanizmów naprawy DNA przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii 2015, którą otrzymali Tomas Lindahl, Paul Modrich i Aziz Sancar. Mutacje mogą powstawać spontanicznie lub być wynikiem działania mutagenów chemicznych lub fizycznych reagujących z DNA. Modyfikacje końcowego produktu ekspresji informacji genetycznej czyli białek prowadzą do nieodwracalnych zmian w ich strukturze i funkcji.

Uszkodzenia komórkowe są indukowane przez wiele czynników endogennych i egzogennych, które mogą powodować różne zmiany w strukturze i właściwościach chemicznych DNA, RNA i białek, ale także cukrów, lipidów i innych komórkowych cząsteczek życia.

Związki uszkodzające materiał komórkowy mogą oddziaływać w sposób bezpośredni czyli reakcją ze składnikami, monomerami biologicznych makrocząsteczek (kwasy nukleinowe, białka, lipidy, cukry) albo też wg mechanizmu pośredniego, gdy czynniki chemiczne lub fizyczne modyfikują strukturę makrocząsteczki dopiero po wytworzeniu metabolitów (związków pośrednich) np. wolnych rodników czy innych związków reaktywnych (aldehydy). W związku z tym np. reaktywne połączenia tlenu (ang. ROS) mogą pośrednio modyfikować zasady azotowe w kwasach nukleinowych (DNA i RNA), a także aminokwasy. Mogą one także reagować z końcowymi produktami peroksydacji lipidów jakim jest dialdehyd malonowy (MDA).

Jest oczywiste, że wszelkie modyfikacje wszystkich składników komórki (nie tylko DNA) mają udział w jej patogennym funkcjonowaniu. Dla jego poznania i zrozumienia konieczna jest ich identyfikacja oraz analiza powstałych adduktów oraz mechanizmów ich tworzenia. Ta aktywność badawcza należy do nowych dyscyplin naukowych, które noszą nazwę omik. Najbardziej znane to genomika, proteomika, RNAomika, metabolomika, lipidomika i inne. Pracę doktorską mgr Malwiny Muńko widzę właśnie w obszarze adduktomiki zajmującej się identyfikacją i mechanizmami tworzenia różnorodnych produktów (adduktów) w reakcji z pojedynczym mutagenem. W swojej rozprawie doktorantka analizuje produkty reakcji niektórych deoksynukleotydów oraz wybranych aminokwasów z metabolitem furanu i tym samym szuka znaczników na dwóch poziomach.

Jest to temat interesujący, ważny dla zrozumienia metabolizmu komórki o dużym potencjale diagnostycznym i terapeutycznym.

## 2. Cele pracy

Strategicznym celem badań objętych rozprawą było poznanie produktów reakcji oksoenu (DOPE) na monomeryczne składniki (nukleozydy, aminokwasy) dwóch biopolimerów komórkowych (DNA i białka). Działanie to wpisuje się w obszar adduktomiki.

Głównym zadaniem badawczym była analiza reaktywności oksoenu (3,5-dietoksy-4-oksopent-2-enalu, DOPE) z monodeksynukleozydami: cytydyną, adenozyną i guanozyną oraz identyfikacja produktów reakcji metodami spektrofotometrycznymi i spektroskopowymi a także analiza ich właściwości.

Równoległym i równie ważnym celem było rozpoznanie produktów reakcji oksoenu z wybranymi aminokwasami, jak pochodne cysteiny i lizyny oraz mechanizmu ich tworzenia.

Wyniki badań objętych rozprawą są opisane i dyskutowane w 2 publikacjach cytowanych w pracy doktorskiej (Ref. 1, 96). Doktorantka jest współautorką obu prac.



### 3. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie

- 3.1. Zsyntetyzowano 5,5-dietoksy-4-oksopent-2-enal (DOPE), główny związek do modyfikacji nukleozydów i aminokwasów.
- 3.2. Stwierdzono, że DOPE tworzy addukty z monodeoksynukleozydami: cytozyną, adeniną i guanozyną. Są to analogi strukturalne produktów reakcji tych nukleozydów z cis-2-buten-1,4-dialem (BDA).
- 3.3. Głównym produktem reakcji DOPE i BDA z deoksynukleotydami jest addukt z cytozyną.
- 3.4. Addukty oksadiazabicykloktainowe mogą powstawać w reakcji addycji 1,2 oraz 1,4 z takim samym prawdopodobieństwem.
- 3.5. Niesymetryczne związki dikarboonylowe z dużym podstawnikiem przy grupie aldehydowej dają addukty wg mechanizmu determinowanego przez strukturę powstającego produktu.
- 3.6. Addukty oksoenalu są nietrwałe w warunkach fizjologicznych (pH) i ulegają degradacji z wytworzeniem deoksycytozyny i doeksyurydyny jako produktu deaminacji.
- 3.7. Pochodne cysteiny i lizyny w reakcji z oksoenalem dają połączenia krzyżowe. Wydajność reakcji zależy od pH.
- 3.8. Zidentyfikowano i zaproponowano struktury nowych połączeń krzyżowych cis-2-buten-1,4-dialu z pochodnymi cysteiny i lizyny oraz zasugerowano ich potencjalną rolę biologiczną.

### 4. Uwagi do pracy

- 4.1. Autorka nie uzasadniła wyboru substratów do reakcji z oksoenalem. Dlaczego wybrano tylko deoksynukleotydy a nie rybonukleotydy lub tylko zasady? Dlaczego pochodne cysteiny i lizyny?
- 4.2. Doktorantka pisze, że identyfikacja nowych połączeń krzyżowych cysteiny i lizyny stanowi cenną informację dotyczącą modyfikacji białek *in vivo* oraz, że badania wymagają kontynuacji. Jakie informacje doktorantka ma na myśli i jakie badania powinny być wykonane i dlaczego ich nie podjęto?
- 4.3. Doktorantka bardzo precyzyjnie charakteryzowała otrzymane addukty przy pomocy UV, NMR, spektrometrii mas a także metod obliczeniowych. Dlaczego nie badano właściwości fluorescencji nowych połączeń?
- 4.4. Deoksynukleozyd nie jest zasadą (str. 149).
- 4.5. Nie zauważyłem cytowania w tekście własnej pracy Ref. 1.

- 4.6. W zakończeniu paragrafu Dyskusja wyników doktorantka pisze, że otrzymane rezultaty pozwalają przypuszczać, iż powstanie dwóch regioizomerycznych połączeń krzyżowych *in vivo* jest bardzo prawdopodobne i warto weryfikacji. W związku z tym chciałem zapytać, dlaczego nic w tym kierunku doktorantka nie uczyniła?
- 4.7. Referencje 70, 96, 111 wymagają korekty.
- 4.8. Należy podkreślić staranność i wysiłek edytorski doktorantki włożony w przygotowanie rozprawy. Nie mam na myśli tylko kolorowych tabel oraz tytułów poszczególnych paragrafów zapisanych kolorową czcionką.

## 5. Wniosek końcowy

- 5.1. Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej mgr Malwiny Muńko są bardzo bogatym materiałem eksperymentalnym dotyczącym badań uszkodzeń komórkowych cząsteczek życia a w szczególności tworzenia adduktów kwasów nukleinowych i aminokwasów. Są one dobrym przykładem wykorzystania syntezy organicznej, metod analitycznych i obliczeniowych w biologii chemicznej. Rozprawa stanowi istotny wkład do badań do adduktomiki oraz niskocząsteczkowych markerów o dużym potencjale terapeutycznym.
- 5.2. Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami wprowadzonymi przez Dz. U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2010 r., Nr 96, poz. 620, Dz. U. z 2010, Nr 182, poz. 1228) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie p. mgr Malwiny Muńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

