

Poznań, dnia 5 stycznia 2013

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Polskiej
pt. "Degradacja fragmentów DNA zawierających bromopochodne zasad nukleinowych pod wpływem niskoenergetycznych elektronów lub promieniowania UV"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Polskiej pt. *"Degradacja fragmentów DNA zawierających bromopochodne zasad nukleinowych pod wpływem niskoenergetycznych elektronów lub promieniowania UV"* została wykonana w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka. Praca dotyczy aktualnej i o dużym znaczeniu poznawczym tematyki, a mianowicie opisanie mechanizmów reakcji halogenopochodnych zasad nukleinowych inicjowanych radiacyjnie lub fotochemicznie. Badania te mają istotne znaczenie dla podjęcia ewentualnych badań klinicznych w radio- lub fototerapii dynamicznej chorób nowotworowych (halogenopochodne zasad nukleinowych jako potencjalne leki antynowotworowe). Są kontynuacją i rozwinięciem badań fotochemicznych prowadzonych od wielu lat, z wielkim powodzeniem, w gdańskim ośrodku chemii fizycznej.

Praca doktorska prezentuje bardzo obszerny materiał eksperymentalny i stanowi zwarte opracowanie naukowe o bardzo dużym znaczeniu, poznawczym.. Została przedstawiona w sposób zwięzły na 144 stronicach; zawiera 85 rysunków (w pracy przyjęto konwencje zapisywania schematów reakcji i wzorów chemicznych jako rysunki), 15 tabel oraz obszerny zestaw cytowanej literatury - 175 pozycji literaturowych.

Rozprawa zredagowana została w sposób powszechnie przyjęty i zawiera: wprowadzenie wraz z częścią literaturową, cel pracy, część eksperymentalną przedstawiającą metodykę badań, dyskusję wyników, podsumowanie i wnioski, spis publikacji własnych i komunikatów konferencyjnych oraz cytowaną literaturę. Zawiera również bardzo przydatny dla czytelnika wykaz stosowanych skrótów. Zakończona została kopiami trzech publikacji w prestiżowych czasopismach: J. Phys. Chem. B (2 publikacje z 2012 i 2010 roku) oraz J. Chem. Phys. (z 2012 roku), w których wykorzystano wyniki z pracy doktorskiej.



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 17. 01. 2013
L.dz. 8010-WCH/IP-222/13

Jedyna uwaga, którą chciałbym w tym miejscu przekazać, dotyczy języka rozprawy. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła swojej pracy doktorskiej w języku angielskim. W mojej opinii przedstawianie prac doktorskich w naukach przyrodniczych w języku angielskim powinno stać się zwyczajem w Polsce, jak to ma miejsce w wielu europejskich, czołowych ośrodkach naukowych. Zamieszczanie obszernego streszczenia w języku polskim umożliwiłoby zapoznanie się z wynikami badań wszystkim zainteresowanym w kraju. Jednakże wyżej wymienione publikacje z doktoratu (publikowane w języku angielskim), które praktycznie ukazały się równoległe z rozprawą doktorską mogą być wyjaśnieniem dla mojej uwagi.

W części „Wstęp” Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące oddziaływania promieniowania jonizującego na materię żywą. Szczegółowo omówiła obecny stan wiedzy nad uszkodzeniami DNA generowanymi przez niskoenergetyczne elektrony, ostatnie wyniki badań radiolizy i fotolizy halogenopochodnych zasad nukleinowych i nukleozydów oraz badań nad radiouszkodzeniem i fotouszkodzeniem DNA znakowanego halogenopochodnymi zasadami nukleinowymi. Część literaturowa została napisana w sposób poprawny, podkreślający istotne znaczenie zagadnień związanych z omawianymi reakcjami. Materiał w tym rozdziale został oparty na 117 cytowanych publikacjach. Szkoda, że w tej części rozprawy Doktorantka nie podkreśliła wkładu polskich grup badawczych, m.in. z UAM w Poznaniu, w badaniach mechanizmów reakcji fotochemicznych zasad nukleinowych.

(Poniżej dwie przykładowe, ostatnie prace z tego zakresu:

1. Skalski, B.; Rapp, M.; Suchowiak, M.; Golankiewicz, K. Photocycloaddition of 5-Bromouracil to Uracil in a Dinucleotide Model Compound. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 5127-5129.
2. Lepczynska, J.; Komodzinski, K.; Milecki, J.; Kierzek, R.; Gdaniec, Z.; Franzen, S.; Skalski, B. Photoaddition of 5-Bromouracil to Uracil in Oligonucleotides Leading to 5,5'-Bipyrimidine-Type Adducts: Mechanism of the Photoreaction. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 11362-11367).

Pomimo tej ostatniej uwagi, w mojej opinii prezentacja omawianych w części literaturowej zagadnień jest w zupełności wystarczającym wprowadzeniem w omawiane dalej problemy badawcze.

Drobne, krytyczne uwagi dotyczące tego rozdziału zostały przedstawione poniżej:

1. str. 16 i dalsze - znak minus oznaczający anionorodnik H (i inne) jest zbyt mały (widoczny jako „kropka” charakteryzująca rodnik),
2. str. 33, drugi akapit od góry – brak jednostek przy energiach dysocjacji,
3. str. 33-34, rozróżnienie mechanizmów bezpośredniej i fotosensybilizowanej (z udziałem acetonu) fotolizy i udziału wzbudzonych stanów singletowych i trypletowych pochodnych pirymidyn wymaga szerszego komentarza.

Jako podstawowe cele badań (rozdział II) Doktorantka przyjęła „zbadanie podatności na uszkodzenia niskoenergetycznymi elektronami znakowanych halogenopochodnymi zasad nukleinowych fragmentów DNA oraz właściwości fotouczulających 5-bromodeoksyurydyny w wodzie i środowisku biopolimeru”. Cele te Doktorantka realizowała poprzez dobór odpowiednich układów do badań, m. in. modelowych oligonukleotydów znakowanych 5-bromo-2'-deoksyurydyną, 5-bromo-2'-deoksycytydyną, 5-bromo-2'-deoksyadenozyną, 5-bromo-2'-deoksyguanozyną oraz natywnych układów, a także „sztucznego” plazmidu DNA znakowanego 5-bromo-2'-deoksyurydyną.

Na szczególne podkreślenie zasługuje przedstawienie krótkiej, ale przekonującej argumentacji uzasadniającej podjęcie tego typu badań, łączącej poznanie mechanizmów z potencjalnym zastosowaniem badanych układów w radio- lub fototerapii dynamicznej chorób nowotworowych.

Rozdział trzeci obejmuje swoim zakresem prezentację części eksperymentalnej związanej z rozprawą. Został podzielony na cztery części obejmujące kolejne zadania badawcze:

(1) bombardowanie elektronami trimerów bromowanych (TBrXT, gdzie X oznacza deoksytyminę, deoksycytydynę, deoksyadenozynę lub deoksyguanozynę) i natywnych TXT,

(2) desorpcję anionów stymulowanej elektronami z trimerów TXT i TBrXT,

(3) fotolizę 5-bromodeoksyurydyny w roztworach woda: acetonitryl: 2-propanol,

(4) synteza oraz fotodegradacja „sztucznego” plazmidu DNA znakowanego 5-bromodeoksyurydyną.

Rozdział ten zawiera opis stosowanych substratów do badań, aparatury, warunki i procedury przeprowadzenia eksperymentów i analizy wyników. Stanowi dobrą prezentację części eksperymentalnej pracy doktorskiej.

Najistotniejszym i najważniejszym rozdziałem rozprawy jest rozdział czwarty, przedstawiający wyniki badań i ich dyskusję. Rozdział ten oparty został głównie na materiale oryginalnym, w dużej części opublikowanym w trzech publikacjach : J. Phys. Chem. B, 2012, 116, 9676-9682, J. Chem. Phys. 2012, 136, 075101 oraz J. Phys. Chem. B, 2010, 114, 16902 – 16907. Wyniki badań były także prezentowane przez Doktorantkę na wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie ustnych wystąpień i posterów.

Rozdział piąty przedstawia w sposób skrótowy, aczkolwiek wystarczający, główne wnioski wynikające z tak obszernej w wyniki eksperymentalne rozprawy.

Podsumowując opis rozprawy należy stwierdzić, że w swojej pracy doktorskiej mgr Katarzyna Polska poprawnie przedstawiła i krytycznie omówiła wyniki swoich badań. Stosując różne dostępne metody i techniki badawcze oraz starannie i celowo dobrane układy do badań opisała mechanizmy degradacji

fragmentów DNA zawierających bromopochodne zasad nukleinowych w wyniku działania niskoenergetycznych elektronów lub promieniowania UV.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Katarzyny Polak zaliczam:

1. Wykazanie, że podczas bombardowania elektronami o energii 10 eV modelowych oligonukleotydów modyfikowanych bromopochodnymi zasad nukleinowych (trimerów TBrXT) znakowanych 5-bromo-2'-deoksyurydyną, 5-bromo-2'-deoksycytydyną, 5-bromo-2'-deoksyadenozyną, 5-bromo-2'-deoksyguanozyną) główną reakcją prowadzącą do degradacji badanych układów jest debromowanie do utworzenia natywnych trimerów (TXT) oraz że reakcja ta odpowiedzialna jest za dwukrotne zwiększenie wydajności uszkodzenia oligonukleotydów modyfikowanych bromowanymi zasadami pirymidynowymi (TBrUT i TBrCT) w porównaniu z natywnymi odpowiednikami, a w przypadku zasad purynowych (TBrAT i TBrGT) za trzykrotny wzrost wydajności degradacji.
2. Przeanalizowanie możliwych mechanizmów fragmentacji bromowanych i niebromowanych trimerów TBrXT i TXT w wyniku dysocjacyjnego przyłączenia elektronu oraz zaproponowanie schematu wtórnych reakcji prowadzących do uwolnienia tyminy i debromowanych produktów.
3. Przebadanie desorpcji anionów stymulowanych działaniem elektronów o energii 0-20 eV z filmów bromowanych i natywnych trimerów zaabsorbowanych na powierzchni złota. Wykazanie, że w przypadku bromowanych pochodnych uwalniane są głównie aniony wodorkowe i bromkowe. Uszeregowanie reaktywności bromowanych oligonukleotydów w następującej kolejności: TBrUT > TBrAT > TBrGT > TBrCT.
4. Przeprowadzenie badań jakościowych i ilościowych nad sensybilizowaną acetonem fotolizą 5-bromo-2'-deoksyurydyny (5-BrdU) w roztworach woda/2-propanol. Zidentyfikowanie głównych produktów reakcji, a mianowicie :2'-deoksyurydyny (dU) oraz adduktu dU z 2-propanolem, a także wyznaczenie wydajności kwantowej fotorozkładu 5-BrdU równej 0,63.
5. Na podstawie uzyskanych wyników i danych literaturowych zaproponowanie mechanizmu pierwotnych i wtórnych reakcji fotochemicznych, a przede wszystkim reakcji przeniesienia elektronu z rodnika 2-propylowego do 5-BrU prowadzącej do rodnikoanionu (5-BrdU)⁻ ulegającego dalszej reakcji odszczepienia anionu bromkowego z utworzeniem rodnika urydylowego dU[•].
6. Opracowanie protokołu syntezy „sztucznego” DNA plazmidowego całkowicie znakowanego 5-bromo-2'-deoksyurydyną (5BrdU). Wykazanie, że podczas naświetlania promieniowaniem UV o długości fali

300 nm do pojedynczych pęknięć dochodzi wyłącznie dla plazmidu znakowanego 5BrdU.

Czytając rozprawę nasunęły się recenzentowi następujące uwagi, które mam nadzieję, zostaną wyjaśnione podczas publicznej obrony doktoratu:

1. W pracy na str. 104 stwierdzono, że „naświetlanie 5-BrdU fotonami o długości fali 254 nm prowadzi do wygenerowania porównywalnej ilości produktów fotodegradacji, jak w przypadku fotolizy światłem o długości fali 300 nm”. Aby ten wniosek był prawdziwy należy uwzględnić intensywność obu źródeł promieniowania, (a ściślej intensywność promieniowania absorbowanego przez substrat) a zatem porównać wydajności kwantowe.
2. Na str. 110 przedstawiono, że ze względu na małą wartość wydajności kwantowej fotorozkładu 5-BrdU w bezpośredniej fotolizie w porównaniu z sensybilizowaną acetonem reakcją można pierwszą reakcję pominąć. Wniosek ten jest prawdziwy, jeśli uwzględnione zostaną także intensywności promieniowania absorbowanego przez aceton oraz przez 5-BrdU (a ściślej intensywności promieniowania absorbowanego przez jeden składnik w obecności drugiego i odwrotnie).
3. Na str. 111 reakcja (1) jest błędnie przedstawiona.
4. Str. 112, oszacowano „szybkość” powstawania acetonu w stanie trypletowym w warunkach eksperymentalnych jako $3 \times 10^{-7} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Jak obliczono tę wielkość i co ona oznacza?
5. W literaturze polskiej przyjęto stosowanie w miejsce symbolu M mol/dm³.

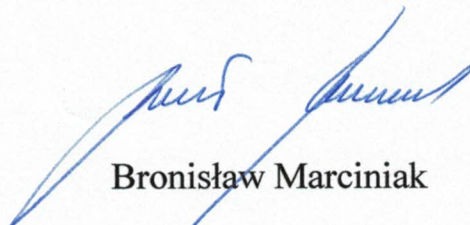
Mgr Katarzyna Polska należy do grupy młodych naukowców potrafiących z powodzeniem prowadzić badania z zastosowaniem różnorodnych metod i technik badawczych od syntezy organicznej poprzez metody stacjonarnej chemii radiacyjnej i fotochemii, a także biologii molekularnej. Ma umiejętność interpretacji uzyskanych wyników uwzględniając metody obliczeniowe oraz obszerną literaturę przedmiotu badań..

Badania mgr Katarzyny Polskiej prezentowane w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele nowych i oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę o mechanizmach reakcji degradacji fragmentów DNA zawierających halogenopochodne zasad nukleinowych inicjowanych radiacyjnie lub fotochemicznie.

Również z formalnego punktu widzenia ocena pracy jest bardzo pozytywna. Rozprawa jest dobrze zaplanowana, język poprawny, szata graficzna nie budzi zastrzeżeń. Zauważone przez recenzenta drobne błędy zawarte w części teoretycznej i eksperymentalnej nie umniejszają w sposób istotny wartości rozprawy doktorskiej. Rozprawa ma także jeszcze jedną istotną cechę – może stanowić podstawę do dalszych badań z zastosowaniem metod

czasowo-rozdzielczych umożliwiającym jeszcze głębsze poznanie mechanizmu badanych reakcji radiacyjnych i fotochemicznych.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Polskiej w pełni odpowiada swoim poziomem naukowym i metodycznym wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie pracy i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Bronisław Marciniak