

prof. dr hab. Marcin Hoffmann
Wydział Chemii, UAM
Umultowska 89b, Poznań

Poznań, 24 maja 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana magistra inżyniera Pawła Wityka

**„SENSYBILIZOWANE USZKODZENIA FOTOCHIMICZNE
I RADIACYJNE W OLIGONUKLEOTYDACH
ORAZ KOMPLEKSACH BIAŁKO-DNA”**

**wykonanej w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Janusza Raka
i promotora pomocniczego dr hab. inż. Jacka Czuba**

Przedstawiona mi do recenzji praca jest owocem udanego połączenia starannie przeprowadzonych prac obliczeniowych na poziomie mechaniki molekularnej i kwantowej oraz badań doświadczalnych obejmujących pomiary kalorymetryczne i dichroizmu kołowego, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym i napromieniowywanie promieniami X, chromatografię cieczową z detektorem spektrofotometrycznym i sprzężoną ze spektrometrem mas. Przedmiotem mojej oceny, w myśl wymagań Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2017 poz. 1789, z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa

Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261), jest oryginalność rozwiązanego problemu naukowego, ogólna wiedza teoretyczna Kandydata w dziedzinie nauk chemicznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Najogólniej charakteryzując liczącą 149 stron dysertację, trzeba zauważyć jej szeroki zakres tematyczny, co nieuchronnie prowadzić musiało do daleko posuniętej zwięzłości wypowiedzi wprowadzającej niekiedy wrażenie chaosu. Tym niemniej praca doktorska skomponowana jest klasycznie: wstęp zajmuje 42 strony, następnie przedstawiony zostaje cel rozprawy (2 str.), metodologia prowadzonych badań doświadczalnych i obliczeniowych (27 str.), otrzymane wyniki wraz z ich dyskusją (46 str.), podsumowanie (3 str.), dalej spis literatury obejmujący 142 pozycje (w spisie 153 lecz brakuje poz. 143 a pozycje 13 i 14, 66 i 87, 98 i 100, 104 i 107, 105 i 108, 115 i 116, 119 i 145, 122 i 126, 123 i 127, 140 i 141 są zduplikowane). Całość poprzedzona jest wykazem tabel, wykazem rysunków i spisem stosowanych skrótów. Rozprawa przygotowana jest w języku polskim. Streszczenie w języku angielskim stanowi odrębny dokument.

Celem rozprawy sformułowanym przez Autora w rozdziale 2 było: *„opracowanie ogólnej metodologii umożliwiającej uzyskanie zdefiniowanego strukturalnie kompleksu oligonukleotyd-oligopeptyd oraz wykonanie studium przypadku (badań fotochemicznych i radiacyjnych) dla układu modelującego oddziaływanie w kompleksie znakowane DNA-białko”*. Ten cel nadrzędny wymagał przeprowadzenia szeregu starannie zaplanowanych badań doświadczalnych i obliczeniowych.

Cele rozprawy udało się zrealizować. Należy w pełni zgodzić się z doktorantem, iż z sukcesem otrzymano układ modelowy stanowiący połączenie

dwuniciowego DNA z układem α -helikalnym peptydu. Modelu, w którym obecne są oddziaływania pomiędzy resztami aminokwasowymi białek a zasadami azotowymi kwasów nukleinowych. Jak słusznie zauważa Doktorant „*oddziaływania zmieniają podatność DNA na uszkodzenia fotochemiczne lub radiacyjne. Oddziaływania zasady BrdG z resztą argininy znacząco poprawiają powinowactwo elektronowe tej pary, powodując zwiększenie stopnia degradacji DNA pod wpływem promieniowania X, które generuje solwatowane elektrony.*” Zaprojektowanie owego modelu możliwe było dzięki wykorzystaniu dynamiki molekularnej jak i technik kwantowochemicznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w toku prowadzonych pomiarów eksperymentalnych zaobserwowano występowanie niespecyficznego uszkodzenia nici DNA ze względu na powstanie - podczas radiolizy roztworu - rodników hydroksylowych, pomimo zastosowania zmiataacza rodników. Wpływ peptydu zwiększał stopień degradacji sensybilizowanego DNA jak i powstanie połączeń międzyniciowych. Jako istotny walor poznawczy rozprawy należy wskazać na fakt, że metody kwantowo-chemiczne pozwoliły na prognozowanie uszkodzenia biopolimeru DNA pod wpływem rodnika zlokalizowanego w obrębie puryny, pokazując, że procesy prowadzące do degradacji DNA, na drodze kaskady reakcji rodnikowych, są najprawdopodobniej kontrolowane kinetycznie. Doktorant opracował metodę pozwalającą na opisanie procesu fotoindukowanego transferu elektronu wewnątrz DNA. Obliczone wartości stałych szybkości reakcji separacji jak i rekombinacji ładunku na drodze teorii transferu elektronu Marcusa, pozwoliły na przewidzenie powstania uszkodzenia w DNA. Ubocznie wskazano, że trietyloamina - obecna jako zanieczyszczenie organiczne w nabywanych oligonukleotydach - inhibuje proces fotoindukowanego transferu elektronu.

Uwagi szczegółowe

Doktorant stwierdza (str. 62):

„W celu wykonania procesu ligacji użyto metody „CLICK chemistry” W celu aktywacji miedzi (CuII), która katalizuje proces reakcji ligacji ...”

Czy na pewno to jony miedzi II katalizują proces cykloaddycji? Czy Doktorant mógłby przedstawić proponowany mechanizm (mechanizmy) tego procesu w trakcie publicznej obrony?

Jako wymagające szerszego komentarza należy wskazać Tabele 4.2 (str. 108) 4.5 (str. 133) i 4.6 (str. 134) prezentujące wybrane parametry liczbowe, jednak nie prezentujące odchyłeń standardowych – a dla badań naukowych to bardzo istotna informacja pozwalająca wnioskować o powtarzalności uzyskiwanych wyników. Proszę o odpowiedź jakiej niepewności dla otrzymanych parametrów możemy się spodziewać, ile cyfr znaczących mają przedstawione przez Doktoranta parametry.

Rysunek 1.3 nie jest autorstwa Doktoranta – więc jego użycie winno to być klarownie wyjaśnione w podpisie pod rysunkiem. Niestety nie jest. Czy Doktorant pozyskał zgodę wydawnictwa bądź autorów na wykorzystanie tej ilustracji, czy może takiej zgody nie potrzebował. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii w trakcie publicznej obrony.

Rysunek 1.7 wydaje się nie być autorstwa Doktoranta – winno to być klarownie wyjaśnione w podpisie pod rysunkiem. Użycie jedynie odnośnika literaturowego jako indeksu górnego „87” będącego zresztą błędnym duplikatem odnośnika 66 jest

niewystarczające. Nie wspominając, że pod adresem wskazanym w Ref. 87 znajduje się inna ilustracja. Proszę o wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony.

Rysunek 1.2 wydaje się nie być autorstwa Doktoranta – winno to być klarownie wyjaśnione w podpisie pod rysunkiem. Użycie jedynie odnośnika literaturowego jako indeksu górnego „16” i to do strony startowej <https://www.wpclipart.com/> jest niewystarczające.

Doktorant wskazał na pozycje literaturowe w sposób tak odosobniony, że aż ocierający się o granicę akceptowalności. Nie podaje numerów wolumenów czasopism, stron na których opublikowano artykuł, czy alternatywnie numerów DOI. Duplikuje część odnośników (pozycje 13 i 14, 66 i 87, 98 i 100, 104 i 107, 105 i 108, 115 i 116, 119 i 145, 122 i 126, 123 i 127, 140 i 141) zdarza się, że nie podaje nazwiska żadnego autora (Ref. 6). Zazwyczaj tytuły czasopism przedstawia w formie przyjętych skrótów, ale nie jest w tym konsekwentny (np. poz. 29, 57, 58, 84). Niekiedy tytuł czasopisma nie zostaje przedstawiony pismem pochylonym (np. poz. 57, 62, 89, 99, 116, 152). Dla tego samego czasopisma niekiedy stosuje inny skrót niż w pozostałych przypadkach np. czasem JACS czasem J. Am. Chem. Soc. W odnośnikach do stron internetowych Doktorant winien wskazać na datę dostępu a tego brakuje. Powstaje pytanie dlaczego Doktorant nie używa żadnego z programów ułatwiających pracę z cytowaniami literaturowymi – są przecież i takie bezpłatne. Nawet w wikipedii znajdziemy informacje porównawcze

o kilkudziesięciu różnych programach

(https://en.wikipedia.org/wiki/Comparison_of_reference_management_software

data dostępu 24 maja 2018)

Proszę o wyjaśnienie wskazanego przez Doktoranta związku przyczynowo skutkowego na str. 23:

„Wszystkie eukariotyczne organizmy używają tlenu (O_2) podczas fosforylacji oksydacyjnej w celu produkcji ATP.²¹ Dlatego u ssaków ciągły dostęp do O_2 jest zapewniany przez system naczyń krwionośnych.”

Czyżby owady, u których dostęp tlenu do komórek zapewniany jest przez system przetchlinek, nie były eukariontami?

Proszę o wyjaśnienie o znaczenie niezrozumiałego podpisu rysunku 4.18 *„pochodna profili topnienia”* – co takiego Doktorant ma na myśli.

Proszę wyjaśnić powód umieszczenia we wzorach związków (rysunek 3.1) symbolu R, który ma inne znaczenie po prawej i po lewej stronie równania reakcji szczególnie że za każdym razem oznacza jeden określony pierwiastek.

Proszę o wyjaśnienie znaczenia gwiazdki na rysunku 4.28 przy nazwie dwóch dostawców *„materiałów”*? Dlaczego dla dwóch pozostałych dostawców nie zaprezentowano danych *„z gwiazdką”*.

Na podstawie jakich danych doświadczalnych wygenerowano struktury przedstawione na rysunku 1.9 ?

Na str. 67 i 68 znajdujemy informację o dwukrotnym powtórzeniu eksperymentów. Czy to nie za mało by wyciągać wnioski ilościowe?

Na str. 26 Doktorant używa bardzo kategorycznego stwierdzenia: „*We wszystkich organizmach żywych DNA składa się z dwóch komplementarnych do siebie nici tworzących strukturę podwójnej helisy*” – a co z kwadrupleksami, o których sam autor wspomina na str. 27.

Na str. 26 znajdujemy też zdanie: „*Skład buforu oraz sekwencja zasad determinuje konformację DNA*” – a co jeśli DNA nie zostanie rozpuszczone w buforze tylko na przykład w wodzie destylowanej, albo roztworze soli silnego kwasu i silnej zasady?

Na str. 18 znajdziemy zdanie: „*wiele zespołów badawczych pracuje obecnie...*” choć nie wskazano żadnego i nie przywołano źródła literaturowego. W opracowaniach naukowych zobowiązani jesteśmy wskazać na odpowiednie źródła informacji i unikać nieprecyzyjnych sformułowań.

Podobnie na str. 31 Doktorant odnotował: „*Duża część danych literaturowych wyjaśnia ...*” a wskazuje jedynie jeden odnośnik literaturowy i jeszcze zapewnia nas, że: „*można znaleźć też wiele prac ...*” wskazując na jedną pozycję literaturową.

Podobnie na str. 45 Doktorant przedstawia stwierdzenie: „*Białka wiążą się do DNA przeważnie w obrębie dużego rowka, aczkolwiek istnieje kilka wyjątków.*” Niestety nie wskazuje na jakikolwiek choćby przez podanie przypisu do literatury.

Analogicznie na str. 77: „*funkcjonał (Minnesota local functional, M06-L) został wyselekcjonowany ze względu na to, że dane literaturowe sugerują jego większą dokładność w przypadku reakcji przeniesienia atomu wodoru.*” Niestety brakuje odniesienia do literatury.

Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem jakoby $G(\xi;\tau)$ to profil energii swobodnej w czasie (tak str. 78). Słowo profil wydaje się przez Doktoranta niezwykle lubiane. W rozprawie doktorskiej mamy „profile topnienia”, „profile energii swobodnej”, „profile po trawieniu”, „profile dla stanów istotnych dla danej reakcji”, „profil naukowy”, „profil temperaturowy”, a nawet „pochodną profili topnienia”.

Proszę o wyjaśnienie co autor miał na myśli podpisując rysunek 4.33 „wartości odpowiednich sprzężeń ...” (czyżby były też jakieś nieodpowiednie?)

Na str. 42 Doktorant stwierdza:

„Maksimum absorpcji dla BrdU, BrdA, BrdG i BrdC wynoszą, odpowiednio, 280, 285, (252, 276) i 283 nm. Jasno wynika stąd, że wykorzystanie światła UV z zakresu >280 nm powinno w większej mierze wzbudzić jedynie bromopochodne zasad azotowych.”

Moim zdaniem Doktorant wskazuje na zbyt mało faktów by można by mówić o „jasnym wynikaniu”. Czyżby zbadał wszystkie inne możliwe pochodne zasad azotowych by był uprawniony do użycia słowa „jedynie”.

Na str. 26 znajdujemy zdanie: „Nukleotydy składają się z fosforanu, cukru (2'-deoksyrybozy, pentoza) oraz zasady azotowej (adeniny, tyminy, guaniny, cytozyny)” Zestawienie informacji wyszczególnionych w nawiasach sugeruje, że albo deoksyryboza nie jest pentozą albo adenina należy do zbioru tymin a te z kolei należą do zbioru guanin itd.

Doktorant nazwisko Svante Augusta Arrheniusa zapisuje zastępując drugą literę r przez literę c: („ARCHENIUS”) (str viii, 80)

W pracach naukowych staramy się zwyczajowo nie używać słownictwa potocznego w tym słowa firma w znaczeniu potocznym przedsiębiorstwa. (str. 61, 64, podpis rysunku 4.28). Podobnie żargonu. Podpisy pod równaniami na str. 87 w przedstawionej w rozprawie formie zawierają określenia żargonowe np.: „sprzężenia”, „couplingi”, „częstotliwość modów”. Jak poprawnie opisać wyrażenia występujące w tych równaniach?

Zwyczajowo podpisy umieszczamy pod rysunkiem a nie ponad.

W podpisie rysunku 4.7 znajdziemy frazę „*uszeregowanych zgodnie z ilością grup fosforanowych*” choć skoro można te grupy policzyć winno zostać użyte sformułowanie liczba grup.

Wśród skrótów brakuje skrótu TEA użytego np. na stronie 69, 71, 118, 119.

W tytule tabeli 4.2 możemy przeczytać:

„*przedstawionych na Rysunek 4.13*” (a nie na Rysunku).

W podpisie rysunku 1.9 znajdziemy frazę „*a-helisa*” zamiast „ *α -helisa*”.

Na str. 19 stwierdzenie „*Aby normalna komórka uległa transformacji w nowotworową, jej DNA powinno ulec mutacji ...*” może sugerować, że transformacja ta jest pożądana.

Na str. 37 znajdziemy „*obecnie współczesna ...*” – wystarczy jedno z tych słów.

Na str. 23 zamiast „*tyempei*” winno być „*tempie*”, na str. 24 zamiast „*pelni*” winno być „*pełni*”, na str. 73 zamiast „*uzyto*” winno być „*użyto*”.

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Doktoranta, pomimo pewnych usterek, napisana jest dość interesująco i świadczy o zrozumieniu stawianych zadań badawczych. Doktorant pokazał, że rozumie i umiejętnie używa różne techniki badawcze, formułuje hipotezy badawcze i je weryfikuje tak więc ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta w dziedzinie nauk chemicznych należy ocenić wysoko. Nie sposób nie zauważyć, że wyniki badań Doktoranta (nie tylko te z niniejszej rozprawy) były poddane szczegółowej ocenie przez recenzentów wybranych przez edytorów poszczególnych czasopism, jest on bowiem wg bazy Scopus współautorem dziewięciu publikacji naukowych i jednego rozdziału w książce.

- (1) Wityk, P.; Zdrowowicz, M.; Wiczak, J.; Rak, J. UV-Induced Electron Transfer between Triethylamine and 5-Bromo-2'-Deoxyuridine. A Puzzle Concerning the Photochemical Debromination of Labeled DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *142*, 262–269.
- (2) Wityk, P.; Wieczór, M.; Makurat, S.; Chomicz-Mańka, L.; Czub, J.; Rak, J. Dominant Pathways of Adenosyl Radical-Induced DNA Damage Revealed by QM/MM Metadynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2017**, *13* (12), 6415–6423.
- (3) Czechowska, J.; Kawecka, A.; Romanowska, A.; Marczak, M.; Wityk, P.; Krzyński, K.; Zadykiewicz, B. Chemiluminogenic Acridinium Salts: A Comparison Study. Detection of Intermediate Entities Appearing upon Light Generation. *Journal of Luminescence* **2017**, *187*, 102–112.

- (4) Chomicz-Mańka, L.; Wityk, P.; Golon, Ł.; Zdrowowicz, M.; Wiczak, J.; Westphal, K.; Żyndul, M.; Makurat, S.; Rak, J. Consequences of Electron Attachment to Modified Nucleosides Incorporated into DNA. In *Handbook of Computational Chemistry*; 2017; pp 1895–1916.
- (5) Zdrowowicz, M.; Wityk, P.; Michalska, B.; Rak, J. 5-Bromo-2'-Deoxycytidine - A Potential DNA Photosensitizer. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2016**, *14* (39), 9312–9321.
- (6) Zdrowowicz, M.; Chomicz, L.; Zyndul, M.; Wityk, P.; Rak, J.; Wiegand, T. J.; Hanson, C. G.; Adhikary, A.; Sevilla, M. D. 5-Thiocyanato-2'-Deoxyuridine as a Possible Radiosensitizer: Electron-Induced Formation of Uracil-C5-Thiyl Radical and Its Dimerization. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (26), 16907–16916.
- (7) Rak, J.; Chomicz, L.; Wiczak, J.; Westphal, K.; Zdrowowicz, M.; Wityk, P.; Zyndul, M.; Makurat, S.; Golon, Ł. Mechanisms of Damage to DNA Labeled with Electrophilic Nucleobases Induced by Ionizing or UV Radiation. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119* (26), 8227–8238.
- (8) Wieczór, M.; Wityk, P.; Czub, J.; Chomicz, L.; Rak, J. A First-Principles Study of Electron Attachment to the Fully Hydrated Bromonucleobases. *Chemical Physics Letters* **2014**, *595–596*, 133–137.
- (9) Wieczór, M.; Tobiszewski, A.; Wityk, P.; Tomiczek, B.; Czub, J. Molecular Recognition in Complexes of TRF Proteins with Telomeric DNA. *PLoS ONE* **2014**, *9* (2).
- (10) Mietlarek-Kropidłowska, A.; Chojnacki, J.; Wityk, P.; Wieczór, M.; Becker, B. N-(4-Methylpiperazin-4-ylm-1-yl)Dithiocarbamate Sesquihydrate. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* **2012**, *68* (6).

W renomowanych czasopismach, o wysokim współczynniku wpływu (IF) są to zwykle bardzo rygorystyczne oceny. Tak więc włączony do rozprawy dorobek naukowy magistra Pawła Wityka został już oceniony przez wielu ekspertów.

Ocena końcowa

W podsumowaniu mojej oceny rozprawy doktorskiej pana magistra inżyniera Pawła Wityka pragnę przede wszystkim stwierdzić, że prezentowany dorobek naukowy rozprawy oceniam wysoko. Biorąc pod uwagę niewątpliwe walory rozprawy doktorskiej, udane połączenie użycia technik badawczych i obliczeniowych, oraz walory aplikacyjne oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Pawła Wityka jako ważny wkład do naszej wiedzy o chemii. Oceniam, że rozprawa ta spełnia zwyczajowe i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, unaocznia ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w chemii oraz pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pana magistra Pawła Wityka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Jeanis Hoffmann'.