



Prof. dr hab. Bronisław Marciniak
Zakład Fizyki Chemicznej
ul. Umultowska 89b
60-780 Poznań
marcinia@amu.edu.pl

Poznań, dnia 23 sierpnia 2018

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Kingi Westphal
pt. "Radio- i fotoliza znakowanych DNA. Od syntezy modyfikowanych
oligonukleotydów do zależności sekwencyjnej fotouszkodzeń"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Kingi Westphal pt. "Radio- i fotoliza znakowanych DNA. Od syntezy modyfikowanych oligonukleotydów do zależności sekwencyjnej fotouszkodzeń" wykonana została w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka, promotora doktoratu. Praca dotyczy bardzo aktualnej i ważnej tematyki, a mianowicie działania foto- i radiosensybilizatorów opartych o modyfikowane nukleozydy. Jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych od wielu lat, z wielkim powodzeniem, przez profesora Janusza Raka.

Praca doktorska prezentuje obszerny materiał eksperymentalny i stanowi zwarte opracowanie naukowe o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym dla chemii medycznej. Została przedstawiona w formie trzech publikacji naukowych opublikowanych w latach 2016-2017 w renomowanych czasopismach naukowych oraz opisu projektu doktorskiego. Opis ten zawiera: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wstęp stanowiący wprowadzenie literaturowe w omawiane dalej zagadnienia, cel pracy, wyniki badań wraz z dyskusją przedstawione w dwóch podstawowych rozdziałach: rozdział 4, „Radio- i fotoliza modyfikowanych DNA” oraz rozdział 5 „Manipulacje enzymatyczne jako narzędzie syntezy modyfikowanego DNA”, a także podsumowanie rozprawy i bibliografię. Praca zawiera również



oświadczenia Doktorantki i współautorów o ich udziale w publikacjach przedstawionych jako rozprawa doktorska.

Jak już wspomniałem pracę doktorską stanowi cykl trzech wieloautorskich artykułów opublikowanych w latach 2016-2017 w bardzo dobrych czasopismach z chemii fizycznej, fotochemii i chemii organicznej takich jak: *Journal of Physical Chemistry B*, *Organic & Biomolecular Chemistry* oraz *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Jak jednoznacznie wynika z załączonych oświadczeń głównych współautorów publikacji, a także z określenia wkładu współautorskiego Doktorantki, udział Jej we wszystkich tych pracach był dominujący. Jej udział polegał na pomyśle i zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji i syntezie związków do badań, wykonaniu większości zadań eksperymentalnych, interpretacji wyników oraz współtworzeniu i korekcie manuskryptów. Profesor Janusz Rak, promotor i współautor wszystkich trzech prac, jednoznacznie stwierdza, iż Jego udział w pracach polegał głównie na uczestnictwie w planowaniu projektów, interpretowaniu wyników eksperymentalnych oraz przygotowaniu poszczególnych manuskryptów. Pozostali współautorzy dr Magdalena Zdrowowicz, mgr Samanta Makurat oraz dr hab. Agnieszka Żylicz-Stachula z Wydziału Chemii UG, profesor dr hab. Krzysztof Bobrowski i dr inż. Konrad Skotnicki z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie określili swój udział w publikacjach jako polegający na współwykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu obliczeń kwantowo-chemicznych i ich interpretacji, konsultacji części zagadnień dotyczących chemii radiacyjnej i obsłudze układu do napromieniowania próbek, a także udziału w opracowaniu manuskryptów. Biorąc więc pod uwagę ww. oświadczenia w mojej opinii, Doktorantka miała pełne prawo wykorzystać wyniki prac wieloautorskich w swojej rozprawie doktorskiej.

W pierwszej części opisu wprowadzającego Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące radioterapii i terapii fotodynamicznej podkreślając rolę i znaczenie zastosowania modyfikowanego DNA, a tym samym selektywnego uwrażliwienia komórek nowotworowych za pomocą związków chemicznych. Opisała także mechanizmy odpowiedzialne za degradację materiału genetycznego w wyniku naświetlania promieniowaniem jonizującym lub promieniowaniem nadfioletowym (UV). Część ta została napisana w sposób poprawny i zilustrowany schematami reakcji. Dla przykładu na rysunku 6 przedstawione zostały struktury dimerów wewnątrznicinowych powstałych w wyniku połączenia poszczególnych zasad azotowych. Wstęp literaturowy został oparty na ponad sześćdziesięciu pozycjach literaturowych. W mojej opinii prezentacja zagadnień omawianych w tej części rozprawy jest w zupełności wystarczającym wprowadzeniem w omawiane w części eksperymentalnej problemy badawcze.

Cel pracy doktorskiej został przedstawiony przez Doktorantkę w sposób jasny i przekonujący. Zastosowanie modyfikowanych nukleozydów jako radio- i fotosensybilizatorów w terapii antynowotworowej wymaga znajomości mechanizmów reakcji zachodzących podczas radiolizy i fotolizy. Zaproponowane zostały zatem trzy zasadnicze cele badawcze rozprawy doktorskiej.

Pierwszy - dotyczył poznania i opisanie ilościowego mechanizmu radiolizy jednoniciowych fragmentów DNA znakowanych jodopochodnymi zasad azotowych,.

Drugi - określenia wpływu sekwencji zasad azotowych w łańcuchu modyfikowanego DNA na wydajność jego fotoindukowanej degradacji, a ściślej jak pisze Doktorantka na „określeniu wydajności powstawania fotoindukowanych pęknięć w dwuniciowym fragmencie DNA znakowanym stałym motywem 5'-XCAABrUY-3', w którym X i Y wpływają na potencjał jonizacji guanozyny oraz powinowactwo elektronowe modyfikowanego nukleozydu” (gdzie X/Y to adenozyzna (A), guanozyzna (G), cytydyna (C) lub tymidyny (T)).

Trzeci cel, to wg Doktorantki „zaprojektowanie narzędzia pozwalającego na syntezę znakowanych fragmentów DNA o dowolnej sekwencji, umożliwiającego testowanie właściwości foto-/radiosensybilizujących modyfikowanych nukleozydów”.

W mojej opinii podjęte w rozprawie cele badań są uzasadnione naukowo i ważne aplikacyjnie.

Wymienione wyżej trzy cele badawcze zrealizowane zostały w trzech publikacjach doktoratu i omówione w trzech częściach opisu projektu doktorskiego:

1. Rozdział 4. *Radio- i fotoliza modyfikowanych DNA*
Podrozdział 4.1. *Sekwencja zasad azotowych w łańcuchu DNA warunkuje fotosensybilizujące właściwości znacznika*
2. Podrozdział 4.2. *Radiosensybilizujący potencjał jodopochodnych zasad azotowych*
3. Rozdział 5. *Manipulacje enzymatyczne jako narzędzie syntezy modyfikowanego DNA. Chemiczno-enzymatyczna synteza dwuniciowego DNA punktowo znakowanego 5-bromo-deoksyurydyną.*

Opis projektu doktorskiego w części eksperymentalnej został także przygotowany w sposób jasny i przejrzysty. Został zilustrowany wieloma schematami, tabelami i rysunkami. Stanowi dobre podsumowanie materiału badawczego zawartego w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską.

Badania mgr Kingi Westphal przedstawione w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę o mechanizmach działania radio- i fotosensybilizatorów DNA wprowadzonych do

łańcucha biopolimeru, co może mieć znaczenie w doborze odpowiednich modyfikowanych nukleozydów w radioterapii.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Kingi Westphal zaliczam:

1. Potwierdzenie udziału długi zasięgowego fotoindukowanego przeniesienia elektronu jako procesu odpowiedzialnego za uszkodzenia DNA (z udziałem modyfikowanych nukleozydów). Wykazanie, że proces ten silnie zależy od rodzaju nukleotydu w najbliższym sąsiedztwie donora i akceptora elektronu, a co za tym idzie od sekwencji zasad azotowych w łańcuchu DNA znakowanym 5BrdU. Zastosowanie odpowiednio dobranych struktur nici DNA oraz korelacji eksperymentalnie zmierzonej wydajności uszkodzeń z uzyskanymi w obliczeniach kwantowo-mechanicznych zmianami entalpi swobodnej dla procesu przeniesienia elektronu (ΔG_{el}) i jej analizie w oparciu o teorię Marcusa zasługuje na szczególne wyróżnienie. W mojej opinii, fotochemika, jest to najistotniejsze osiągnięcie pracy doktorskiej
2. Opisanie radiosensybilizujących właściwości jodopochodnych zasad azotowych na przykładzie trinukleotydów znakowanych 5-jodocytydyną (5-IdC) lub 5-jodouracydyną (5-IdU). Oznaczenie produktów reakcji radiolizy ww. trinukleotydów indukowanej przez solwatowane elektrony (radioliza wodnych odtlenionych roztworów w obecności zmiatacza rodników hydroksylowych) i wyznaczenie wydajności ich tworzenia. Dało to możliwość zaproponowania mechanizmu zachodzących reakcji.
3. Wykazanie prawie dwukrotnie większej wrażliwości jodopodstawionych nukleozydów na działanie solwatowanych elektronów w porównaniu z ich bromowanymi odpowiednikami (przebadanymi uprzednio: J. Rak et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**,10362) oraz zaproponowanie mechanizmów wyjaśniających obserwowane różnice.
4. Zaproponowanie i zoptymalizowanie procedury umożliwiającej syntezę dwuniciowych DNA znakowanych wybranym sensybilizatorem. Daje to możliwość testowania nowych sensybilizatorów do zastosowania w fotodynamicznej terapii.

Z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić tylko kilka drobnych uwag, które nie wpływają na moją pozytywną ocenę doktoratu.

1. Szkoda, że w opisie projektu doktorskiego nie przedstawiono listy skrótów stosowanych w pracy. Dla przykładu skrót IR stosowany w pracy 1.2 nie oznacza ogólnie przyjętego w chemii terminu - podczerwień.
2. W jaki sposób uzyskano promieniowanie monochromatyczne $\lambda=320$ nm z emisji lampy rtęciowej wysokociśnieniowej (jakie filtry były zastosowane)? Selektywne wzbudzenie określonej zasady azotowej ma istotne znaczenie w opisie mechanizmu reakcji fotochemicznych.

3. Czy podjęto choć wstępne badania, metodą radiolizy impulsowej, mechanizmu reakcji solwatowanych elektronów z trinukleotydami znakowanymi 5-IdC i 5-IdU? Badania te umożliwiłyby bezpośrednio zaobserwowanie nietrwałych produktów pośrednich oraz kinetyki ich tworzenia i zaniku.
4. Szkoda także, że Doktorantka nie zilustrowała proponowanych mechanizmów reakcji radiolizy trinukleotydów znakowanych 5-IdC i 5-IdU i ich bromopochodnych odpowiedników schematami reakcji, ograniczając się jedynie do słownego opisu.

Poziom badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Kingi Westphal jednoznacznie świadczy, iż należy Ona do grupy młodych naukowców potrafiących z powodzeniem prowadzić badania z zastosowaniem różnorodnych, eksperymentalnych technik badawczych, należycie interpretować wyniki w oparciu o obliczenia kwantowo-mechaniczne i literaturę przedmiotu badań. Jak wynika z załączonego CV, Doktorantka systematycznie rozwija swoje umiejętności badacze nie tylko w kraju, ale także na stażach zagranicznych. Uczestniczy w realizacji projektów badawczych wewnątrz uniwersyteckich (UG) oraz NCN. Jest współautorem aż dziewięciu publikacji (w tym trzech wchodzących w skład rozprawy doktorskiej) i wielu prezentacji na konferencjach krajowych i międzynarodowych, a także jest laureatką kilku nagród i wyróżnień dla magistrantów i doktorantów. Jest zatem bardzo dobrze zapowiadającym się młodym pracownikiem naukowym.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Kingi Westphal 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