



Prof. dr hab. Jarosław Poznański
Laboratory of Molecular Basis of Biological Activity
Institute of Biochemistry and Biophysics PAS
Pawieńskiego 5a
02-106 Warszawa
jarek@ibb.waw.pl
<https://ibb.edu.pl/en/laboratory/jaroslaw-poznanski/>
<https://orcid.org/0000-0003-2684-1775>

Warszawa 22.10.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Prokopowicz pt.

*„Spectroscopic studies of interactions of molecular targets in chemotherapy:
Purine Nucleoside Phosphorylase, Thymidylate Synthase and their mutants with
specific ligands”.*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Prokopowicz została wykonana w Zakładzie Optyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. Z tego powodu Doktorantką, obok promotora dr hab. Piotr Fity (UW) opiekował się, jako promotor pomocniczy, prof. Wojciech Rode (IBB). Ze względu na specjalizację opiekunów Doktorantki metody optyczne i spektroskopowe (dr hab. Piotr Fity) oraz biochemia, enzymologia farmaceutyczna, biologia molekularna i biologia komórkowa (prof. dr hab. Wojciech Rode), taki dobór promotorów jest ze wszech miar uzasadniony. Co więcej, Doktorantka jest (była?) uczestnikiem Międzywydziałowego Interdyscyplinarnego Studium Doktoranckiego w zakresie Nauk Matematyczno-Przyrodniczych prowadzonego

przez Uniwersytet Warszawski. Podwójność opieki jest więc, przynajmniej w opinii recenzenta, w pełni uzasadniona.

Formalna ocena rozprawy

Zgodnie z deklaracją Doktorantki (strona iv ocenianej Rozprawy) „The results presented in this dissertation are partially the subject of **(the)** following publications:”

1. Prokopowicz M., Greń B., Cieśla J., Kierdaszuk B. Towards understanding the E. coli PNP binding mechanism and FRET absence between E. coli PNP and formycin A. *Biophys. Chem.*, 230:98-108, 2017.
2. Prokopowicz M., Cieśla J., Kierdaszuk B. A synergistic effect of phosphate, pH and Phe159 substitution on the formycin A association to the E. coli purine nucleoside phosphorylase. *Biochimie*, 148:80-86, 2018
3. Sobich J., Prokopowicz M., Maj P., Wilk P., Zieliński Z., Frączyk T., Rode W. Thymidylate synthase-catalyzed, tetrahydrofolate-dependent self-inactivation by 5-FdUMP. *Arch. Biochem. Biophys.*, 674:108106, 2019.
4. Prokopowicz M., Jarmuła A., Casamayou-Boucau, Y., Gordon, F., Ryder, A., Sobich, J., Maj, P., Cieśla, J., Zieliński, Z., Fita, P., Rode W. Advanced Spectroscopy and APBS Modeling for Determination of the Role of His190 and Trp103 in Mouse Thymidylate Synthase Interaction with Selected dUMP Analogues. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2661
5. Maj P., Jarmuła A., Wilk P., Prokopowicz M., Rypniewski W., Zieliński Z., Dowiecchia A., Bzowska A., Rode W. Molecular Mechanism of Thymidylate Synthase Inhibition by N4-Hydroxy-dCMP in View of Spectrophotometric and Crystallographic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4758.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094758>

Treść rozprawy opiera się więc na wynikach zawartych w pięciu wieloautorskich artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach. W publikacjach 1, 2 i 4 Doktorantka jest Autorem Korespondencyjnym, a w publikacji 3 jest pierwsza na liście autorów. Bez wątpienia jej udział w prowadzonych badaniach był znaczący. Łączny czynnik oddziaływania tych pięciu prac przekracza 24, jednak prace te były cytowane jedynie 3 razy (0 bez autocytowań, stan na dzień 30.10.2022).

Forma ponad dwustustronicowej Rozprawy Doktorskiej jest z grubsza zgodna z kanonem. W skład Rozprawy wchodzi kolejno: wykaz publikacji stanowiących podstawę Rozprawy, streszczenia w języku polskim oraz angielskim, podziękowania, spis treści. Rolę klasycznego wstępu pełnią Chapter 1 (Introduction, 2 strony), Chapter 2 (Metabolism of purines and pyrimidines, 2 strony + 2 stronicowy rysunek skopiowany z pracy [9]), Chapter 3 (Purine Nucleoside Phosphorylase, 13 stron) oraz Chapter 4 (Thymidylate synthase, 13 stron). Cele pracy są jasno przedstawione w Chapter 5, po którym następuje opis użytych materiałów i stosowanych metod (Chapter 6, 22 strony). Kolejne dwa rozdziały przedstawiają uzyskane wyniki: „Purine Nucleoside Phosphorylase, results and discussion” (Chapter 7, 33 strony) oraz „Thymidylate synthase, results and discussion” (Chapter 8, 56 stron). W kolejnym pięciostronicowym rozdziale zawarte jest podsumowanie wyników (Chapter 9). Rozprawa została uzupełniona o 10-o stronicowy dodatek demonstrujących szczegóły niezawarte w Rozprawie, listę skrótów oraz listę użytych symboli. Spis schematów, rysunków oraz tabel stanowi pomoc w poruszaniu się po tekście. Rozprawę wieńczy lista 331 pozycji literaturowych.

Rozprawa została napisana w języku angielskim. Recenzent nie czuje się kompetentny do oceny językowej, ale można przyjąć, że od tej strony Rozprawę można uznać za poprawną. Niestety odnoszę wrażenie, graniczące z pewnością, że Doktorantka działała pod silną presją czasu. Skoro Rozprawa oparła się na

pięciu recenzowanych artykułach, to nie powinno dziwić, że zawartość merytoryczna w zasadzie nie budzi większych zastrzeżeń (konkretne uwagi przedstawiam pod koniec recenzji). Jednakże na polu edytorskim Rozprawa pozostawia bardzo dużo do życzenia. Już lista publikacji ze strony iv zawiera liczne błędy redakcyjne, które przedstawiając powyżej wyróżniłem żółtym kolorem. Takie błędy redakcyjne zdarzają się niemal zawsze. Jednak poważniejszy zarzut dotyczy samej organizacji tekstu. W moim odczuciu Rozprawa zawiera w sobie dwa niezależne nurty badań, dotyczące badań spektroskopowych nad fosforylazą nukleozydów purynowych (PNP) oraz syntazą tymidylanową (TS). Sam sposób organizacji tekstu dodatkowo podkreśla ich rozłączność, potęgując wrażenie, że Rozprawa stanowi nienaturalne połączenie dwóch różnych wątków. W moim odczuciu każdy z nich mógłby stanowić podstawę „pryzwoitego” doktoratu. Poza osobą Doktorantki, jedynym aspektem łączącym oba wątki jest zastosowanie podobnych metod spektroskopowych, co jednak w żaden sposób nie zostało podkreślone w Rozprawie. Aby nie być gołosłownym, w trzy „syntetyczne” rozdziały (Streszczenie, Cele Pracy i Podsumowanie) zostały formalnie rozdzielone na dwa niezależne fragmenty dotyczące obu nurtów badań. Zaś Wstęp oraz opis wyników zostały wprost podzielone na pary niezależnych rozdziałów. W odczuciu recenzenta taka forma Rozprawy jest trudna do zaakceptowania. Co więcej, większość materiału ilustracyjnego (Rysunki, Schematy, Tabele) została wprowadzona do Rozprawy metodą „copy-paste”. Oczywiście takie postępowanie nie jest to zakazane (dopóki autor podaje odpowiednie źródło), ale stało się ono źródłem poważnych niespójności. W moim odczuciu, biorąc pod uwagę liczbę publikacji, na których opiera się Rozprawa, wydaje się, że właściwszą formą byłaby spinka opatrzona krótkim komentarzem. Pozwoliłoby to Doktorantce na skupieniu się na połączeniu i odpowiedniej prezentacji

wątków badawczych, zaś Recenzentowi ujęłoby konieczności merytorycznej oceny badań, które zostały już przecież poddane niezależnej recenzji.

Skoro jednak Rozprawa została przedstawiona w formie pełnego tekstu, to Recenzent czuje się w obowiązku poddać ocenie wszystkie jej elementy. Większość rysunków została przekopiovana z publikacji. W konsekwencji nie mają wspólnej szaty graficznej, są w większości niedostatecznej jakości oraz zawierają elementy, które nie zostały opisane.

- Fig. 3.1 – Podwójny opis – raz z oryginału, drugi raz od Doktorantki.
- Fig. 3.2 - Niska jakość. Nie wiadomo, co oznaczają kolorowe kreski w panelu a
- Fig. 3.3 - Panele b i d przygotowane inaczej niż a i c. Błędny opis panelu c
- Fig. 3.4 – Panel a odbiega od b i c. Dotyczy to zarówno sposobu prezentacji (pierścień cukrowy), jak i konformacji (syn, dwa pozostałe przedstawiają Gua i Ino w konformacji anti). Niepotrzebna wstawka z numeracją, która jest już przedstawiona na tej samej stronie.
- Fig. 3.5. Fatalna jakość, nie rozumiem, dlaczego nie mógł zostać zrobiony na nowo.
- Tab. 3.1. Ta lista kontaktów POWINNA zostać pokazana na rysunku. Inaczej wartość informacyjna jest zerowa.
- Fig. 3.6. Odmienny sposób prezentacji zawartości w obu panelach, przekopiovanych zresztą z 2 różnych publikacji. W efekcie, odciąga uwagę od jedyne go istotnego elementu, którym jest zmiana gęstości elektronowej na N7 i C8 oraz przeniesienie grupy fosforanowej z C3' na C1'.
- Fig. 4.1. Zawiera kopię tabeli z publikacji [150]. Bezsensowny jest wyrwany z kontekstu oryginalny podpis.

- Schem. 4.1-4.4. Proste schematy reakcji uzyskane najprawdopodobniej metodą „copy-paste” z różnych prac. W konsekwencji brak spójności graficznej, a i chyba przesada w korzystaniu ze źródeł.
- Fig. 4.3. Brak spójności. Nie rozumiem, dlaczego Doktorantka nie mogła osobiście porównać dwóch struktur PDB (1I00 z 6qya), ale musiała skopiować obrazek z innej publikacji.
- Fig. 4.4 i 4.5. także powinny zostać wykonane przed Doktorantkę
- Fig. 4.7. Z jakiegoś powodu konformacje cząsteczek się różnią: zmiany kwasu glutaminowego powodują pozorne zmiany stereochemii na atomie Ca. Odmienny jest także rotamer grupy karboksylowej łańcucha bocznego. Co więcej, różnica w orientacji pierścienia imidazolinowego między panelami b i c a panelem a sugeruje, że transferowi podlega inna grupa metylenowa!
- Fig. 4.10. W panelu b fluorouracyl został przedstawiony w innej orientacji niż ten sam układ aromatyczny będący składnikiem FdUMP. Czysta dezinformacja w stosunku do osób mniej obytych w dziedzinie, a niepotrzebne dla obeznanych z problemem.
- Fig. 4.11a. W moim odczuciu schemat błędny. Teoretycznie, przejście między rotamerami N(4)OH jest możliwe nie tylko przez inną formę tautomeryczną, ale także poprzez formę kationową uprotonowaną na N(4). Bezpośrednia rotacja wiązania podwójnego formy syn-imino do anti-imino (prawa pionowa strzałka) jest niezwykle mało prawdopodobna, co nie znajduje wyrazu na rysunku.

W przypadku opisu zastosowanych metod mam już szereg uwag merytorycznych:

- Str. 49 „Subsequently, each absorption spectrum was corrected for the background (absorption at the longest registered wavelength).” Zwykle, pojawienie się nieoczekiwanej absorpcji jest związane z tłem i po korekcie o wyniki pomiaru buforu efekt powinien być pomijalny. W tym konkretnym przypadku można domniemywać, że obserwowany efekt mógł być spowodowany agregacją próbki białka i rozpraszaniem światła na agregatach. Wpływ takiego zjawiska należało przedyskutować.
- Równanie 6.2 Doktorantka używa alternatywnie $\text{antilog}_{10}(x)$ i 10^x (np. równanie 6.11), co nie powinno mieć miejsca.
- TCSPC data analysis. Nie rozumiem idei posługiwania się średnim czasem zaniku fluorescencji. Takie podejście gubi większość informacji zawartej w pomiarach TCSPC. Po uśrednieniu nie wiadomo, czy obserwowane zmiany zostały spowodowane zmianami czasów zaniku, czy też zmianami populacji poszczególnych stanów wpływających na zanik fluorescencji.
- Współczynnik σ_{2k} we wzorze 6.4 nie został zdefiniowany. Na moje wyczucie powinien wynosić albo $N(t)_k$, albo $N_c(t)_k$. Tak, jak jest napisane, to zupełnie nie wiadomo, jak jest liczona ta wartość („ σ_{2k} is the standard deviation”). Co więcej, podwójne indeksowanie (czasem, t , oraz numerem kanału, k) wskazuje, że ta część tekstu jest najprawdopodobniej związana z „Multi-channel TCSPC fluorescence spectra”.
- Wzór 6.5 nie ma sensu fizycznego. Pod pierwiastkiem do wartości bezwymiarowej jest dodawana wartość mianowana (czas).
- Wzory 6.7-6.9 są równoważne wzorowi 6.3, a więc ich podawanie jest zbędne. Bardzo niejasno została opisana procedura wyboru właściwego modelu („The best fit was evaluated with the residual plot and value of χ^2 ”). Zwykle do oszacowania ilości składników wykładniczych stosuje

się test Fishera albo kryterium Akaike. Ograniczenie do analizy wartości χ^2 prowadzi do “przeparametryzowania” modelu.

- Wzór 6.11 Niezdefiniowana wielkość F , której wartość nie jest wykorzystywana w okolicznych wzorach.
- 6.1.12 „Difference absorption spectra” Sposób wyznaczenia wartości R oraz σ zależy od sposobu przeprowadzenia eksperymentu. Takich informacji nie ma w tekście. Określenie R jako „dilution constant” jest nieinformatywne.
- Wzory 6.12 i 6.14 zostały wprost przekopiowane z publikacji. Z tego powodu został wprowadzony alternatywny zapis dzielenia („÷” zamiast „/”)
- Wzór 6.20 jest absurdalny. Zakładając fizyczne wartości parametrów ($F_{\text{mix}}=F_D$, $\alpha=0.5$) otrzymujemy $E\alpha=-1$, co zgodnie ze wzorem 6.21 prowadzi do zespolonych wartości α . Przeprowadzone dochodzenie wskazuje, że Doktorantka błędnie przepisała wzór 7 z publikacji 1. Jednak zakres stosowalności oryginalnego wzoru powinien zostać przedyskutowany w Rozprawie. Nie jest dla mnie oczywiste, że wzór z publikacji gwarantuje, że $E\alpha \geq 0$.
- Wzór 6.22 zawiera ewidentny błąd. Zamiast drugiego znaku „+” powinien być znak „×”. Taki sam błąd występuje we wzorze 2 w publikacji 2, z której został najprawdopodobniej przekopiowany. Co więcej, wzór ten nie uwzględnia stechiometrii wiązania, mimo, że zostało to zadeklarowane w tym samym rozdziale (także uwaga poniżej).
- Str. 57 “The choice of the best binding stoichiometry was based on the χ^2 , R-squared and on the residual plots.” Zwykle do oszacowania optymalnej ilości parametrów, alternatywne modele ocenia się stosując test Fishera albo kryterium Akaike. Ograniczenie analizy do wartości χ^2 , R^2 czy odchyłeń zwykle prowadzi do “przeparametryzowania” modelu. W

analizowanym przypadku skuteczna mogłoby się okazać zastosowanie metody Job'a, która pozwala na zgrubne oszacowanie stechiometrii układu (Job, P. 1928 Ann. Chim., 9, 113-203).

- Wzór 6.25 nie uwzględnia liczby miejsc wiążących. Z tego powodu wartość L w tym wzorze nie odpowiada stężeniu wolnego liganda. W konsekwencji stałe wiązania wyznaczone za pomocą wzoru 6.23 będą n -krotnie (n to stechiometria układu) zawyżone. Konsekwencją tego błędu są rozbieżności niektórych wartości K_d i K_{app} w tabeli 7.1.

Nie mam za to większych uwag w odniesieniu do samych wyników. Wszystkie stanowią powtórzenie danych przedstawianych w recenzowanych publikacjach. Do tego stopnia, że wiele z rysunków zawartych w tych dwóch rozdziałach jest efektem akcji „copy-paste” z odpowiedniej publikacji. Poniżej lista zastrzeżeń:

- Tab, 7.1, wartości K_{app} i h zostały wyznaczone przy zastosowaniu błędnego wzoru 6.25. Konsekwencje opisane powyżej.
- Tab 7.2 i 7.3. brak wiarygodnego oszacowania niepewności wyników. Jeśli oszacowanie „SEM were within 0.1 of calculated values” byłoby poprawne, to podawanie wartości z dokładnością inną niż dwa miejsca znaczące jest błędem.
- Fig. 7.20. Nie widzę sensu pokazywania identycznej struktury za pomocą alternatywnych programów. Obraz wytworzony VMD nie dostarcza żadnej nowej informacji. Mimo, że ułożenie białka na obu obrazkach jest inne, można się domyślać, że orientacja zaznaczonych aminokwasów aromatycznych różna, ale fakt ten nie został w żaden sposób skomentowany.

- Tab. 7.4. i 7.5 brak oszacowania niepewności wyników. Wartości w tabeli doskonale obrazują, w jaki sposób uśrednianie czasów zaniku fluorescencji gubi informację o układzie.
- Fig. 8.9. Naiwnie myśląc $KR_i = -RK_i$, a więc połowa widm różnicowych na rysunku jest najprawdopodobniej redundantna.

Powyższa krytyka formalnej strony Rozprawy nie neguje jej wartości merytorycznej. Recenzentowi pozostaje jedynie żałować, że Doktorantka nie potrafiła sprawnie opisać wyników zawartych w pięciu publikacjach, z których w czterech była autorem wiodącym. Zrealizowała jednak wszystkie postawione cele, badając dwa białka niezwykle ważne z punktu widzenia chemioterapii przeciwnowotworowej. Pracowała w złożonym środowisku badawczym, w którym z powodzeniem stosowała precyzyjne metody fizykochemiczne (głównie metody optyczne) do badań wieloskładnikowych układów biologicznych. Przeprowadziła oraz przeanalizowała wyniki wielu serii eksperymentów prowadzonych na różnych wariantach tych białek, co pozwoliło powiązać wyniki doświadczalne (głównie spektroskopowe) ze strukturą białka oraz efektem wprowadzonych zamian aminokwasowych. Do najważniejszych wniosków wynikających z Jej pracy zaliczyłbym potwierdzenie obecności dwóch etapów reakcji (1) przeniesienia grupy metylenowej oraz (2) redukcji, obu katalizowanych przez syntazę tymidylanową oraz wykazanie, że etapy te zostają rozdzielone w obecności N4-OH-dCMP. Tutaj nasuwa się jednak pytanie o mechanizm działania 5F-N4-OH-dCMP, która jak wiadomo jest znacznie bardziej aktywna niż N4-OH-dCMP. W przypadku kompleksów PNP najważniejszym wynikiem było określenie istotnej roli oddziaływań warstwowych z F159 i Y160 przy wiązaniu substratu (formycyny A). Zabrakło jednak analizy sekwencji większej liczby homologów białka. Jeśli uzyskane przez Doktorantkę wnioski są ogólne, to w pozycji odpowiadającej F159

powinny być silnie preferowane aminokwasy aromatyczne, poprzedzające tyrozynę. Należy podkreślić, że badania PNY stanowią duże wyzwanie, głównie ze względu na quasi symetryczną formę oligomeryczną białka (trimer dimerów), która to symetria może być łamana po zamianie aminokwasowej.

Reasumując, recenzent musi stwierdzić, że mimo istotnych uchybień redakcyjnych, oceniana rozprawa wnosi istotny wkład w poznanie molekularnych mechanizmów działania fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) oraz syntazy tymidylanowej (TS). Tym samym, spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.07.2018 r. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Prokopowicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Równocześnie, o ile to możliwe, sugerowałbym umożliwienie Doktorantce przeprowadzenia korekty tekstu Rozprawy.