

Olsztyn, 16 sierpnia 2022 r.

Prof. dr hab. Zbigniew Wieczorek
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 4
10-917 Olsztyn

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Prokopowicz, zatytułowanej:
„Spectroscopic studies of interactions of molecular targets in chemotherapy: Purine Nucleoside Phosphorylase, Thymidylate Synthase and their mutants with specific ligands”.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia wyniki badań oddziaływań molekularnych celów w terapiach przeciwnowotworowych ze specyficznymi ligandami uzyskanych metodami spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej. Molekularnymi celami były enzymy:

1. Fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP) z *Escherichia coli* i jej cztery mutanty, w których zmieniono jeden aminokwas - konkretnie PNPF159Y i PNPF159A (fenyloalaninę w pozycji 159 zastąpiono odpowiednio tyroziną i alaniną) oraz PNPY160F i PNPY160S (tyrozinę w pozycji 160 zastąpiono odpowiednio fenyloalaniną i seryną). Fosforylaza nukleozydów purynowych jest kluczowym enzymem w rezerwowym szlaku syntezy nukleozydów, odpowiedzialnym za odwracalną reakcję fosforolitycznego rozszczepienia nukleozydów purynowych na odpowiednią zasadę purynową i pentozy-1-fosforan. Intensywne badania tego enzymu zapoczątkowało odkrycie, że brak jego aktywności powoduje upośledzenie działania limfocytów T, a co za tym idzie niewłaściwej komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Objawy wywołane brakiem aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych nasunęły możliwość wykorzystania inhibitorów tego enzymu jako selektywnych leków immunosupresyjnych, w terapii nowotworów wywołanych nieprawidłowym namnażaniem się limfocytów T oraz w terapii niektórych chorób autoimmunizacyjnych.
2. Syntaza tymidylanowa (TS) z *Mus musculus* i jej dwa mutanty, w których zmieniono jeden aminokwas - konkretnie H190A (histydynę w pozycji 190 zastąpiono alaniną) i W103G (tryptofan w pozycji 103 zastąpiono glicyną). Syntaza tymidylanowa katalizuje reakcję zależnego od $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianu (mTHF) przekształcenia deoksyurydyno-5'-monofosforanu (dUMP), prowadzącą do powstania tymidyno-5'-

monofosforanu (dTMP). Reakcja ta obejmuje dwa sprzężone elementy: (1) przeniesienie grupy metylenowej z metylenotetrahydrofolianu na piąty atom węgla pierścienia pirymidynowego deoksyurydino-5'-monofosforanu i (2) redukcję tej grupy na koszt pozostałego tetrahydrofolianu, niekowalencyjnie związanego z białkiem, ulegającego utlenieniu do dihydrofolianu. Inhibicja tego enzymu jest od dziesięcioleci wykorzystywana w chemioterapii nowotworów.

W przypadku fosforylasy nukleozydów purynowych i jej mutantów Autorka wykorzystała tylko jeden specyficzny ligand – formycynę A (FA), natomiast w przypadku syntazy tymidylanowej były to: deoksyurydino-5'-monofosforan, fluorodeoksyurydino-5'-monofosforan (FdUMP) i N⁴-hydroksy-deoksycytydino-5'-monofosforan.

Tytuł pracy dobrze określa zawartość rozprawy. Rozprawa doktorska jest obszernym, oryginalnym opracowaniem o dość klasycznym układzie treści podzielonym na dziewięć rozdziałów. Część z nich została podzielona na podrozdziały. Całość opatrzona jest streszczeniem w języku angielskim i polskim, dwoma dodatkami zawierającymi materiały uzupełniające i wykaz stosowanych skrótów, spisami: schematów, rysunków i tabel, wykazem cytowanej literatury oraz informacją zawierającą spis publikacji, których współautorką jest Autorka rozprawy i które zawierają część prezentowanych wyników. Nie mam zastrzeżeń do formalnego układu pracy, który daje klarowny obraz treści.

Pierwsze cztery rozdziały stanowią klasyczne wprowadzenie w tematykę oparte na literaturze i stanowią wyczerpujące przedstawienie tła dla badań podjętych przez Autorkę. W rozdziale piątym Autorka wskazuje cele badań, rozdzielając je na te odnoszące się do fosforylasy nukleozydów purynowych i syntazy tymidylanowej.

Głównym celem badań oddziaływań fosforylasy nukleozydów purynowych z formycyną A było określenie roli Phe159 i Tyr160 w oddziaływaniach z nukleozydami oraz wykazanie, że oddziaływania te są oddziaływaniami typu π - π , stąd taki dobór mutantów fosforylasy nukleozydów purynowych wykorzystanych w tych badaniach. Niejako dodatkowo zaplanowana została weryfikację hipotezy, że Tyr160 jest jedynym donorem energii w zjawisku bezpromienistego przeniesienia energii z formycyny A.

Z kolei głównym celem badań oddziaływań syntazy tymidylanowej i jej mutantów (dobranych ze względu na rolę His190 i Trp103) z trzema ligandami była weryfikacja hipotezy o rozprężeniu wskazanych wcześniej dwóch etapów reakcji katalizowanej przez enzym. N⁴-hydroksy-deoksycytydino-5'-monofosforan zaburza katalizowaną reakcję w zupełnie inny sposób niż fluorodeoksyurydino-5'-monofosforan. Autorka wskazuje również, że celem badań było określenie potencjału elektrostatycznego w oddziaływaniach syntazy tymidylanowej

z nukleotydami. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie związane z rolą Autorki w tym elemencie badań, ponieważ, jak sama stwierdza w następnym rozdziale, obliczenia potencjału elektrostatycznego wykonał dr hab. Adam Jarmuła (zresztą z pominięciem litery „ł” w nazwisku).

W przypadku obu enzymów i ich mutantów Autorka wskazuje jeszcze jako cel badań ich charakterystykę spektroskopową. Na marginesie zauważam, że Autorka wydaje się lepiej posługiwać się językiem angielskim niż polskim, ponieważ w streszczeniu zamiast słowa charakterystyka użyła słowa o zupełnie innym znaczeniu – „charakteryzacja”.

W rozdziale szóstym zajmującym 22 strony rozprawy Autorka starannie prezentuje wykorzystane materiały i zastosowane metody. Nie mam zastrzeżeń do tego rozdziału, poza pewnym dysonansem związanym z tym, że w podrozdziale 6.7 Autorka opisuje korekcję widm fluorescencji na filtr wewnętrzny, co sugeruje, że absorbancja badanych próbek nie konieczne była bardzo mała, a z kolei w podrozdziale 6.11.3 stosuje liniową korekcję na rozcieńczenie, a przecież natężenie fluorescencji nie jest liniową funkcją stężenia, chociaż jak wynika z rysunków w wielu przypadkach absorbancja nie przekraczała wartości 0,1.

Najobszerniejsze są rozdziały siódmy i ósmy, w których Autorka przedstawia uzyskane wyniki i ich dyskusję na tle literatury oddzielnie w odniesieniu do każdego z enzymów. Sposób prezentowania wyników, ich opis i dyskusja są na odpowiednim poziomie, chociaż mam kilka uwag, które nie umniejszają merytorycznej wartości treści tych rozdziałów, ale z obowiązku recenzenta powinienem je wskazać.

Niestety niektóre rysunki są mało czytelne ze względu na: ich rozmiar - rys. 7.12 i 7.14, niefortunne użycie koloru żółtego do oznaczenia widm na niektórych z rysunków – np. rys. 8.4 i 8.10, dużą grubość linii, co prowadzi do zlewania się krzywych - rys. 8.3 i A13.

Zwróciłem też uwagę na fakt, że obserwowane zmiany absorbancji są bardzo małe, szczególnie przy wyznaczaniu specyficznej aktywności syntazy tymidylanowej ($\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}}$ rzędu 0,001), a przecież, o ile mi wiadomo, w deklaracji producenta używany do tych pomiarów spektrofotometr PerkinElmer LAMBDA 265 ma dokładność fotometryczną $\pm 0,01$, powtarzalność fotometryczną $< 0,002$ i szum fotometryczny $< 0,002$ przy absorbancji 1. Ile wynosi zatem niepewność pomiaru konkretnego, wykorzystanego w badaniach przyrządu, skoro można było wykonywać tak dokładne pomiary?

Doskonale zdaję sobie sprawę z trudności eksperymentalnych w badaniach reakcji enzymatycznych, jednak wydaje mi się nieco naciągającym wyznaczanie nachylenia prostej opierając ją tylko na dwóch punktach, jak to ma miejsce na stronie 111 czy 121.

I ostatnia uwaga, w tabelach 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 i 8.1 zabrakło danych obrazujących jakość uzyskanych wyników, ponieważ Autorka nie podała wartości niepewności wyników prezentowanych w nich, co ciekawe w tabelach 7.1 i 8.3 można je znaleźć. Zakładam, że oznacza to tylko niedociągnięcie o charakterze redakcyjnym.

Rozprawę zamyka rozdział dziewiąty będący podsumowaniem wyników badań w nawiązaniu do założonych celów.

Stwierdzam, że wskazane drobne braki i niedociągnięcia nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Bezsporne są osiągnięcia Autorki ocenianej rozprawy, do których przede wszystkim zaliczam: wykazanie kluczowej roli Phe159 i Tyr160 w wiązaniu formycyny A przez fosforylaze nukleozydów purynowych oraz potwierdzenie istotności oddziaływań π - π , udowodnienie rozprzęgnięcia reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową w sytuacji, gdy ligandem jest N⁴-hydroksy-deoksycytidyno-5'-monofosforan. Na dużą uwagę zasługują również uzyskane dane spektroskopowe charakteryzujące badane enzymy.

W celu realizacji badań objętych ocenianą rozprawą, Autorka musiała opanować bogaty warsztat badawczy, umiejętnie łącząc możliwości metod: fizycznych, chemii organicznej, biologii molekularnej, biochemicznych i biotechnologicznych. Szczególnie ważną rolę odgrywa tu właściwa interpretacja uzyskanych danych spektroskopowych.

W tym miejscu pragnę zauważyć, jak istotna dla Doktorantki była możliwość prowadzenia badań w dwóch, interdyscyplinarnych zespołach naukowych, bez których realizacja celów pracy byłaby niemożliwa. Autorka rozprawy przygotowywała rozprawę w dwóch warszawskich szkołach badawczych. Jedna to szkoła badań nad fosforylazą nukleozydów purynowych w Zakładzie Biofizyki Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, mająca swe początki w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku i ciągle wnosząca wkład w wiedzę na temat tego enzymu. Dowodem tego jest chociażby analiza wyników wyszukiwania w bazie Web of Science Core Collection hasła "*purine nucleoside phosphorylase*". Wyszukiwanie to pokazuje, że pierwsze miejsce wśród afiliacji zajmują pracownicy Zakładu Biofizyki Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Podobnie jest ze szkołą badań nad syntazą tymidylanową, która ukształtowała się w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, pierwsze miejsce wśród afiliacji pozycji naukowych dotyczących syntazy tymidylanowej zajmują pracownicy tego Instytutu.

Co ważne, Autorka rozprawy potrafiła, w mojej ocenie, właściwie skorzystać z potencjału zespołów badawczych, w których prowadziła badania. Na podkreślenie zasługuje

również wykorzystanie przez Doktorantkę świetnie funkcjonującej współpracy międzynarodowej.

Bardzo ważnym jest także fakt, że publikowanie wyników badań w bardzo dobrych czasopiśmiech w trakcie realizacji ocenianej rozprawy przyniosło Autorce znakomity dorobek naukowy w postaci pięciu publikacji, których sumaryczny *Impact Factor* wynosi około 23.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką dr. hab. Piotra Fity, prof. UW i prof. dr. hab. Wojciecha Rode stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka rozprawy spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora. Wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Włodzisław Włodarczyk