



Warszawa, dnia 2 lutego 2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr Maciej Pyrki

“Właściwości fizyko-chemiczne wybranych 8-azapuryn oraz specyficzna rybozylacja 2,6-diamino-azapuryn przez fosfatazę nukleozydów purynowych”.

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Pana magistra Macieja Pyrkę nosi polski tytuł *“Właściwości fizyko-chemiczne wybranych 8-azapuryn oraz specyficzna rybozylacja 2,6-diamino-azapuryn przez fosfatazę nukleozydów purynowych”*. Została ona wykonana w Katedrze Fizyki i Biofizyki Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem rozprawy jest dr hab. Maciej Maciejczyk, prof UWM.

Rozprawa składa się z 7 rozdziałów, z czego treści merytoryczne zajmują 18 stron (od rozdziału II do V). Rozdział II jest najobszerniejszym rozdziałem - składa się z Wprowadzenia, Celu pracy doktorskiej, Omówienia prac wchodzących w skład rozprawy, Wniosków oraz Literatury obejmującej 34 pozycje. Pozostałe rozdziały zawierają wymagane ustawą elementy, m.in. streszczenia, oświadczenia współautorów prac oraz kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy. Układ pracy jest czytelny i minimalistyczny w formie. W skład rozprawy wchodzi trzy oryginalne prace opublikowane w specjalistycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. We wszystkich trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Jego wkład w powstanie prac jest znaczący; z przedstawionych oświadczeń wynika, że brał udział zarówno w etapie projektowania badania, jak i jego przeprowadzeniu, analizie wyników oraz przygotowaniu publikacji naukowych. Wszystkie trzy prace będące przedmiotem rozprawy są pracami z zakresu teoretycznej biofizyki molekularnej i prezentują oryginalne podejście do zarysowanego problemu naukowego. Komentarze merytoryczne znajdujące się w samej rozprawie doktorskiej są w dużej części przetłumaczonym tekstem pochodzącym z publikacji składających się na dysertację.

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej było przede wszystkim wyjaśnienie niekanonicznego procesu rybozylacji wybranych 8-azapuryn poprzez ustalenie ich dominujących form tautomerycznych oraz sposobu w jaki mogą tworzyć kompleksy z enzymem PNP - fosforylaza nukleotydów purynowych - silnie konserwowanym elementem szlaku biosyntezy nukleotydów purynowych. Enzym PNP jest przedmiotem zainteresowania badaczy od już kilku dekad ze względu na istotny wpływ biosyntezy nukleotydów na wiele procesów komórkowych, m. in. immunologicznych oraz prowadzących do wzmocnienia sygnału apoptotycznego. Większość prac dotyczących oddziaływań PNP z związkami chemicznymi skupia się na tworzeniu inhibitorów mogących mieć zastosowanie jako immunosupresanty lub leki przeciwnowotworowe. Istotność samego enzymu oraz reakcji rybozylacji/fosforolizy, którą przeprowadza została podkreślona przez Doktoranta w rozdziale II "Omówienie celu naukowego i wyników". Autor rozprawy wymienia w nim w skrócie zastosowanie PNP w medycynie, farmacji oraz biotechnologii. Dyskusja nad zastosowaniem PNP znajduje się też w trzeciej publikacji wchodzącej w skład przedstawionej pracy doktorskiej.

W pierwszej publikacji Doktorant bada równowagę tautomeryczną dwóch pochodnych 8-azapuryn, konkretnie 2,6-diamino-8-azapuryny oraz 8-aza-izo-guaniny. Do badania równowagi tautomerycznej wykorzystano metody obliczeniowe chemii kwantowej oparte o teorie funkcjonału gęstości (DFT), konkretnie na dwóch poziomach teorii B3LYP/6-311+G(d,p) oraz BHandHLYP/cc-pVTZ. Metodologię pracy podzielono na trzy etapy: w pierwszym następuje wygenerowanie i optymalizacja w próżni geometrii wszystkich możliwych stanów tautomerycznych badanych związków. Następnie po analizie wibracyjnej geometrii związków znajdujące się w minimum energetycznym zostają przeniesione do ośrodka wodnego i poddane symulacji. Ostatecznie Doktorant wyznacza parametry termodynamiczne tautomerów, wyciągając szereg wniosków dotyczących dominujących stanów tautomerycznych badanych związków. Ważnym elementem pracy jest etap walidacji uzyskanych wyników teoretycznych. Użyto do tego zadania rozszerzenia metody DFT - czasowo-zależnej teorii funkcjonału gęstości oraz wartości maksimum absorpcji wyznaczonych eksperymentalnie. Dla najbardziej dominującego tautomeru porównano wyniki z teoretycznie wyznaczonymi stanami wzbudzonymi uzyskując istotną korelację z wynikami eksperymentalnymi absorpcji. Opis wyników pierwszej pracy kończy konkluzja o niskim wkładzie entropowym do procesu tautomeryzacji dla obu badanych związków zarówno w próżni jak i w środowisku wodnym.

Drua publikacja w podobny sposób prowadzi recenzenta poprzez analizy stanów tautomerycznych analizowanego przez Doktoranta związku. Tym razem jest nim

9-metylo-8-aza-izo-guanina, związek w którym grupa metylowa do pewnego stopnia udaje obecność łańcucha polinukleotydowego. W tym przypadku liczba możliwych stanów tautomerycznych jest znacznie większa. Sama procedura jest jednak podobna tj. następuje wygenerowanie wszystkich możliwych tautomerów, optymalizacja ich geometrii poprzez wyznaczenie minimum energetycznego w próżni. Takie zoptymalizowane struktury zostają następnie uwodnione i poprzez ich symulację zostają wyznaczone wybrane właściwości termodynamiczne. W przeciwieństwie do poprzedniej pracy pojawia się tutaj dodatkowa analiza właściwości elektrostatycznych związku.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów Doktorant opisuje stan tautomeryczny 9-metylo-8-aza-izo-guanina w ośrodku wodnym jako równowagę dwóch form proponowanych w pozycji N(1) oraz N(3). Autor zwraca uwagę na kompetycję o proton pomiędzy tymi dwoma formami tautomerycznymi, spośród których tylko N(1) może wytworzyć wystarczająco stabilną liczbę wiązań wodorowych ze swoim odpowiednikiem pirymidynowym - izoCytosyną. Pośród rzadziej występujących tautomerów autorzy zwracają uwagę również na obecność tautomeru oznaczonego kodem AEc mogącego oddziaływać z tyminą poprzez wiązania wodorowe w interfejsie Watsona-Cricka.

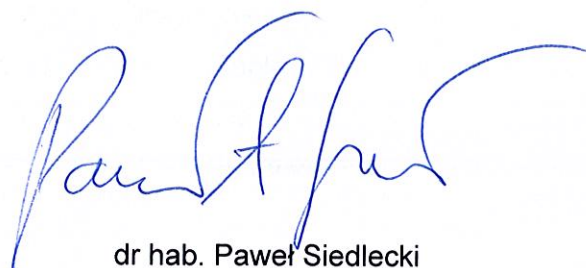
Trzecia praca przedstawiona w rozprawie przez Doktoranta opiera się na poprzednio opublikowanej metodologii i wynikach równowagi tautomerycznej związku 2,6-diamino-izo-8-azaguaniny. Celem pracy jest wyjaśnienie sposobu rybozylacji tego związku. Reakcja ta może przebiegać niekanonicznie poprzez przyłączenie rybozy w pozycji 7 lub 8. Aby wyjaśnić ten obserwowany eksperymentalnie fenomen został zastosowany okazały arsenał metod teoretycznych składający się z obliczeń chemii kwantowej, dokowania molekularnego i symulacji dynamiki molekularnej. Do walidacji zastosowanych narzędzi wykorzystano rybozylację 8-azaguaniny przebiegającą wyłącznie w pozycji 9 pierścienia triazolowego. Po wyznaczeniu niskoenergetycznych stanów tautomerycznych badanych związków zostały one zadokowane do dwóch struktur krystalograficznych PNP. Następnie wybrano konformacje kompleksów ligand-receptor, które odznaczały się odpowiednią orientacją ligandu w stosunku do elementów strukturalnych kieszeni wiążącej oraz posiadały charakterystyczny wzór wiązań wodorowych. Ostatecznie najbardziej obiecujące kompleksy poddano symulacji dynamiki molekularnej i na jej podstawie wykonano obliczenia MM-PBSA do wyznaczenia względnych energii swobodnych badanych układów. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że pochodne 8-azapuryn z podstawnikami 6-amino i 6-oxo, wiążą się do różnie naładowanych, odmiennych form protonacyjnych enzymu PNP. W oryginalnej pracy pojawia się też sugestia, że modyfikacja inhibitora (S)-PMPDAP uwzględniająca te wnioski, tj. zmiana podstawnika z pozycji 9 na 8 pierścienia mogłaby prowadzić do zwiększenia jego powinowactwa.

Moje pierwsze pytanie dotyczy aspektu praktycznego bardzo ciekawych wyników modelowania molekularnego przedstawionych przez Doktoranta; czy próbował on eksperymentalnie potwierdzić przewidywania teoretyczne, np. modyfikując znany inhibitor w taki sposób aby wykorzystać w praktyce wnioski dotyczące dominujących tautomerów oraz sposobu wiązania pochodnych 8-azapuryny z PNP? Czy takie prace są planowane i jak znacząca mogłaby być poprawa powinowactwa?

Drugie pytanie dotyczy aspektu metodologicznego. Dużo uwagi zostało poświęcone przygotowaniu i ocenie równowagi tautomerycznej w próżni. Czy zaprezentowana metodologia różniłaby się znacząco gdyby wykonywać ją od razu w ośrodku wodnym. Czy wyniki tak prowadzonych obliczeń różniłyby się znacząco od zaprezentowanych? Moja uwagę zwróciły też użyte metody hybrydowe chemii kwantowej, przeprowadzane na różnych poziomach teorii, choć nie dla wszystkich związków. Recenzent może się tylko domyślać jaki jest powód tych różnic metodologicznych?

W przedstawionej do recenzji pracy widać znajomość najnowszej literatury przedmiotu oraz umiejętność stosowania nowoczesnych metod numerycznych. Poza pracami wchodzącymi w skład pracy doktorskiej Pan magister Maciej Pyrka jest współautorem w trzech innych publikacjach naukowych z listy filadelfijskiej. Uczestniczył w trzech konferencjach i dwóch warsztatach oraz odbył dwa staże w trakcie trwania doktoratu. Podsumowując recenzję uważam, że Doktorant z sukcesem przedstawił opracowane protokoły badawcze, a uzyskane przez niego wyniki pozwoliły na osiągnięcie celu pracy. Udało się wyznaczyć równowagi tautomerycznej dla badanych związków, wyjaśnić które z nich są dominujące w populacji oraz przeanalizować wiązanie wybranych związków w kompleksie z białkiem enzymatycznym PNP.

W konkluzji stwierdzam, że zaprezentowane przez mgr Macieja Pyrkę w ocenianej rozprawie modele teoretyczne stanowią znaczące osiągnięcie naukowe, o potencjalnym charakterze aplikacyjnym. W mojej opinii kandydat spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wobec czego wnoszę o dopuszczenie Pana Magistra do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Paweł Siedlecki