



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl

## Recenzja

rozprawy doktorskiej **Magistra Macieja Pyrki** zatytułowanej:

**„Właściwości fizyko-chemiczne wybranych 8-azapuryn oraz specyficzna rybozylacja 2,6-diamino-azapuryny przez fosforylaze nukleozydów purynowych”**

Gdańsk, 14 grudnia 2020 r.

Ogromne zainteresowanie badaniami struktur tautomerycznych zasad nukleinowych w kontekście ich roli w procesie mutagenyzy, w szczególności powstawania mutacji spontanicznych, zbiegło się w czasie z burzliwym rozwojem technik spektroskopowych w latach 60. i 70. Ograniczeniem, często uniemożliwiającym badania spektroskopowe pochodnych zasad nukleinowych w roztworach (szczególnie w środowisku wodnym), była słaba rozpuszczalność tych związków. Dane literaturowe opublikowane w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku dowiodły wykonalność wyznaczania równowag tautomerycznych w fazie gazowej przy zastosowaniu metod teoretycznych. Udowodniono wtedy słuszność podejść teoretycznych udostępniając do porównania odpowiednie dane eksperymentalne (Kwiatkowski i in., 1985). Badania teoretyczne dotyczyły cząsteczki 2-pirydonu w fazie gazowej, gdzie wykorzystując zaawansowane zbiory Gaussa do opisu cząsteczki, pełną geometryczną optymalizację oraz uwzględniając energię korelacji do wyznaczenia wartości różnicy energii między ketonowymi i enolowymi formami otrzymano zgodność wyników z eksperymentem (Schlegel i in. (1982) i Scanlan i in. (1983)). Dziś możliwości modelowania i symulacji bardziej złożonych układów biologicznych niż zasady purynowe, powiązanie ich struktury z funkcjami życiowymi, zależą wyłącznie od wizji badawczej i mocy obliczeniowych komputerów, a wyniki tych obliczeń są natychmiast wykorzystywane przez zespoły doświadczalne i *vice versa*, co ma bezpośrednie przełożenie na ich wdrożenie w medycynie i farmakologii. Wszystkie zasady nukleinowe mają karbonylowe i aminowe grupy funkcyjne, które zawierają wymienialne z rozpuszczalnikiem (słabo związane) atomy wodoru, które mogą uczestniczyć w keto-enolowych i amino-iminowych typach tautomerii. Ze wszystkich możliwych kanonicznych form tautomerycznych zasad nukleinowych, formy keto- i aminowe przeważają w warunkach fizjologicznych, a zatem są uważane za tzw. „główne” tautomery (ang. *major*). Formy imino- i enolowe są uważane za „drugorzędne” tautomery (ang. *minor*) i zazwyczaj występują bardzo rzadko. Chociaż wszystkie zasady kwasu nukleinowego mogą potencjalnie przyjąć „drugorzędne” formy tautomeryczne, tylko w przypadku guaniny pomniejsze/drugorzędne tautomeryczne formy równowagi



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl

zostały zaproponowane jako odgrywające zasadniczą rolę w biochemii RNA. Przyjęto, że tautomeryczne formy „drugorzędne” i/lub zjonizowane formy katalitycznych guanozyn są zaangażowane w katalizę kwasowo-zasadową autolitycznych reakcji rozszczepiania samorozszczepiających się rybozymów, takich jak: *hairpin*, *hammerhead* i *glmS* (Cochrane i Strobel, 2008).

Biorąc pod uwagę, że tautomeria jest nieodłączną właściwością rybonukleotydów, uważam, że tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jest jedną z kluczowych w biochemii, ponieważ zróżnicowanie strukturalne generowane przez równowagi tautomeryczne wpływa na szereg procesów biologicznych z udziałem RNA. (Wiadomym jest, że analogi tautomeryczne nukleozydów mają szerokie zastosowanie terapeutyczne jako leki przeciwwirusowe ze względu na ich zdolność do wywoływania śmiertelnej mutagenezy (Li i wsp. 2014)).

Udowodniono, że pochodne guaniny (aza-guanina) oraz izo-guaniny (8-aza-izo-guaniny) zostały w przeszłości rozpoznane jako sondy fluorescencyjne, które mogą być użyteczne w badaniach ważnych procesów biologicznych. Zatem rozszerzenie wiedzy na temat ich stabilności, której podjął się Magister Pyrka realizując swoją pracę doktorską, ma duże znaczenie. W rozprawie bowiem zostały przedstawione wyniki obliczeń uzyskane przy zastosowaniu metod chemii kwantowej dla różnych form tautomerycznych w/w związków, co umożliwiło przedstawienie profilu równowagi tautomerycznej sondy fluorescencyjnej. W pracy pojawił się również bardzo istotny wątek reakcji rybozylacji dwóch azapuryn przez cielec PNP (białko fosforylaze nukleozydów purynowych, które rozszczepia wiązanie glikozydowe rybo- i dezoksorybonukleozydów w obecności nieorganicznego fosforanu). Magister Pyrka przedstawił uzyskane przez siebie wyniki w kontekście danych eksperymentalnych. Już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku stwierdzono, że brak aktywności fosforylazy (PNP) prowadzi do upośledzenia odporności komórkowej, stąd cel wybrania tego właśnie białka do badań wydaje się uzasadniony.

Magister Maciej Pyrka wykonywał swoją pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Macieja Maciejczyka, prof. UWM w Katedrze Fizyki i Biofizyki na Wydziale Nauki o Żywności, na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska zakładała następujące cele: zbadanie właściwości wybranych trzech 8-aza-puryn, t.j.: 8-aza-izo-guaniny, 8-aza-guaniny, 2,6-diamino-aza-puryny oraz wyjaśnienie mechanizmu rybozylacji wybranych pochodnych 8-aza-puryn przez enzym PNP.

Rozprawa została przygotowana w formie spójnego zbioru trzech artykułów opublikowanych w prestiżowych czasopiśmie naukowych, z listy JCR. Taka forma przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym i nie budzi najmniejszej wątpliwości. Całość ma charakter tzw. spinki, w skład której poza kopiami artykułów wchodzi: omówienie celu naukowego i



uzyskanych wyników, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis dorobku naukowego, oświadczenia współautorów prac. Na rozprawę mgr Pyrki składają się trzy oryginalne publikacje, w których Magister Pyrka jest pierwszym autorem i - jak wynika z załączonych oświadczeń – jego udział był dominujący, oceniony na 70% i więcej:

- 1) Maciej Pyrka, Maciej Maciejczyk\*; Theoretical study of tautomeric equilibria of 2,6-diamino-8-azapurine and 8-aza-iso-Guanine; *Chemical Physics Letters*, 2015, 627, 30-35. (publikacja nr1)
- 2) Maciej Pyrka, Maciej Maciejczyk\*; Theoretical investigations of tautomeric equilibrium of 9-methyl-8-aza-iso-Guanine and its electrostatic properties; *Computational and Theoretical Chemistry*, 2016, 1091, 1-7. (publikacja nr2)
- 3) Maciej Pyrka, Maciej Maciejczyk\*; Why purine nucleoside phosphorylase ribo-sylates 2,6-diamino-8-azapurine in non-canonical positions? A molecular modeling study; *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2020, 1091, 1-7. (publikacja nr3)

Łączny impact factor (IF) publikacji wynosi 7,266. Liczba punktów MNIŚW wynosi natomiast 145 (210 licząc punktację z 2019 roku). Powyższe trzy publikacje są tylko dwuautorskie, drugim autorem jest Promotor Doktoranta. Warto podkreślić w tym miejscu, iż Magister Pyrka w swoim dorobku naukowym posiada, oprócz wymienionych publikacji, jeszcze trzy inne prace z listy JCR.

W pierwszej pracy z cyklu zawarte są wyniki, na podstawie których wyznaczono obraz tautomeryczny dwóch wybranych pochodnych 8-azapuryn: 2,6-diamino-8-azapuryny (nazwanym w skrócie DaaPur) oraz 8-aza-izo-guaniny (z8izoGua) w fazie gazowej oraz w otoczeniu wodnym. Obliczenia prowadzone były za pomocą chemii kwantowej przy użyciu metod teorii funkcjonału gęstości na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) (czyli VTZP + funkcje dyfuzyjne dla ciężkich atomów) oraz wykorzystującej hybrydowe funkcjonały BHandHLYP/cc-pVTZ. Autor wykazał, że dla 2,6-diamino-8-azapuryny zarówno w fazie gazowej jak i wodnej najbardziej stabilnym tautomerem okazuje się związek sprotonowany w pozycji N9 (tzw. D9), natomiast dla 8-aza-izo-guaniny w fazie gazowej forma amino-enolowa A29, a w wodzie amino-oxo A38 (nazwy używane przez Autora w publikacji nr1). W przypadku 2,6-diamino-8-azapuryny sprotonowanej w pozycji N9 dane eksperymentalne pozostają w zgodności z danymi obliczeniowymi. Rozpatrując 8-aza-izo-guaninę wyniki dla fazy gazowej różnią się od tych dla środowiska wodnego. W tym przypadku mamy do czynienia z bardziej skomplikowanym układem. Forma cis aminowo-enolowa preferuje formę sprotonowaną w pozycji N9 pierścienia triazolowego podczas gdy forma trans pozycję N7 i N8. Dodatkowo w fazie wodnej dominuje zdecydowanie tautomer ze sprotonowaną formą w



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl

pozycji N8. Dane literaturowe eksperymentalne, który dotyczyły wyłącznie stanu podstawowego, pokazały, że tautomer N(8)-H jest w mniejszości w stosunku do innych tautomerów pierścienia triazolowego N(7)-H i N(9)-H. Wniosku tego nie potwierdzają uzyskane przez Autora obliczenia kwantowo-mechaniczne. Czy Autor mógłby wyjaśnić przyczynę tej rozbieżności?

Drugi artykuł wchodzący w skład pracy doktorskiej dotyczy procesu metylacji 8-aza-izo-guaniny w pozycji N9 i jego wpływu na równowagę tautomeryczną. Wszystkie możliwe formy zmetylowanej 8-aza-izo-guaniny w pozycji 9 zostały rozpatrzone (nawet iminowe). Obliczenia zostały wykonane za pomocą hybrydowych metod BHandHLYP/cc-pVTZ i złożonej metody kwantowej *Gaussian-3* (G3) i *Gaussian-4* (G4), a wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla izo-guanidyny blokowanej metylem oraz niemetylowanej cząsteczki 8-aza-izo-guaniny. Względne energie swobodne uzyskane za pomocą BHandHLYP i G3 były silnie skorelowane, a wyniki uzyskane metodą G4 nie różniły się istotnie od uzyskanych metodą G3. Silna korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami hybrydową BHandHLYP/cc-pVTZ i złożoną G3 potwierdza trafność wyznaczonego rzędu tautomerycznego. Uważam, że najbardziej praktyczną informacją wynikającą z przeprowadzenia badań w tej części pracy doktorskiej było ustalenie, iż darmowe energie uzyskane metodą BHandHLYP/cc-pVTZ są ilościowo bardziej wiarygodne, chociaż obie metody (tzn. hybrydowa oraz G3) przewidują z grubsza tę samą kolejność tautomerów. W rezultacie mniej wymagająca obliczeniowo metoda G3 dobrze nadaje się do przewidywania rzędu tautomerycznego i wstępnej selekcji tautomerów niskoenergetycznych, ale do analizy ilościowej należy stosować droższą metodą BHandHLYP/cc-pVTZ. Czy po przeprowadzeniu w/w badań Autor uważa, że jest możliwe - dla wszystkich tautomerów - rozpoznanie form obojnaczych tylko na podstawie prostych rozważań dotyczących kolejności wiązań? Proszę o krótkie wyjaśnienie.

Trzecim artykułem składającym się na pracę doktorska jest publikacja, której celem było wyjaśnienie obserwowanej eksperymentalnie rybozylacji dwóch analogów puryny: 2,6-diamino-8-azapuryny (niekanonicznej) i 8-azaguaniny (kanonicznej) przez cielece białko PNP. Magister Pyrka wraz ze współautorem pracy postawili hipotezę, że miejsce rybozylacji zależy od ekspozycji pierścienia triazolowego ligandów na kanał prowadzący do miejsca wiązania, gdzie  $\alpha$ -D-rybozo-1-fosforan może zbliżyć się do celu, w związku z czym miejsce rybozylacji zależy od najbardziej prawdopodobnego ustawienia wiązania liganda w kieszonce wiążącej, tj. model związania liganda w kieszonce, dla którego wyznaczono najniższą energią swobodną Gibbsa. Analiza populacji tautomerów 8-aza-guaniny (azaGua) i 2,6-diamino-8-azapuryny (DaaPur) w połączeniu z tzw. „teoretycznym miareczkowaniem” białka PNP i analizą dokowania /MM-PBSA/NMA pokazały, że formy docelowego białka dla analogów puryny



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl

podstawionych 6-okso i 6-aminami nie są identyczne. Zaprezentowane wyniki sugerują, że cząsteczka azaGua (podstawnik 6-okso) wiąże się z białkiem z deprotonowaną resztą Glu-201, ale DaaPur (podstawnik 6-aminowy) wiąże się z białkiem z protonowanym Glu-201. Najbardziej prawdopodobnym miejscem ekspozycji cząsteczki DaaPur jest N8, natomiast prawdopodobieństwo ekspozycji N7 jest niskie. Wynik ten jest tylko częściowo zgodny z danymi eksperymentalnymi, które przewidują rybozylację w obydwu pozycjach N8 i N7. Energia swobodna Gibbsa uzyskana w tej samej analizie tylko dla tym razem azaGua przewiduje najwyższą stabilność pozycji wiązania z N8, natomiast eksperymentalnie przewidywana jest ekspozycja N9. Czy Autor mógłby skomentować te różnice? Czy jest możliwe jednoznaczne wskazanie na podstawie wykonanych badań najbardziej prawdopodobnego miejsca ekspozycji liganda azaGua do PNP?

Badania zostały przeprowadzone rzetelnie i poprawnie. Na uwagę zasługuje fakt zastosowania bogatej metodyki w trakcie realizacji badań do pracy nr3. Wcześniejsze opublikowanie wyników jest formą weryfikacji ich wysokiego poziomu naukowego. Dlatego też rozprawa doktorska w postaci opublikowanych prac jest bardzo wartościowa i zasługuje na uznanie.

Opis celu naukowego oraz uzyskanych wyników został napisany dość przejrzyście. Język, którego używa Autor wskazuje na Jego dojrzałość naukową i dobre rozeznanie w tematyce prowadzonych badań. Zauważyłam nieco sformułowań żargonowych, np.: „najbardziej prawdopodobny mod wiązania”, „miareczkowalne reszty białka (...)”, „ (...) bardziej wyrafinowana metodologia (...)”. W przyszłości proponuję unikać zwrotów żargonowych.

Podsumowując, moja opinia o rozprawie jest zdecydowanie pozytywna. Składające się na nią publikacje zostały już poddane bardzo rygorystycznej ocenie anonimowych recenzentów, będących specjalistami w dziedzinie rozprawy. Wstęp jest napisany jasno i bez istotnych uchybień językowych czy stylistycznych. Nie doszukałam się w rozprawie problemów merytorycznych, a w recenzji zadałam Doktorantowi jedynie parę pytań wynikłych z mojego zaciekawienia tematyką rozprawy. Rozprawa zawiera wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone wynikami naukowymi wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej. Rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne.



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl

Wnoszę zatem o dopuszczenie mgra Macieja Pyrki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Makowska