

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Właściwości fizyko-chemiczne wybranych 8-azapuryn oraz specyficzna rybozylacja 2,6-diamino-azapuryny przez fosforylaze nukleozydów purynowych.
(Physico-chemical properties of selected 8-azapurines and specific ribosylation of 2,6-diamino-azapurine by purine nucleoside phosphorylase)

Autor rozprawy: Mgr Maciej Pyrka

Promotor rozprawy: Dr hab. Maciej Maciejczyk, prof. UWM

Przedmiotem badań rozprawy było zbadanie właściwości wybranych 8-aza-puryn: 8-aza-izo-guaniny, 8-aza-guaniny oraz 2,6-dwuamino-azapuryny, jak również wyjaśnienie mechanizmu niekanonicznej rybozylacji wybranych ligandów - pochodnych 8-aza-puryn, przez fosforylaze nukleozydów purynowych (PNP).

Na pracę o objętości 57 stron składają się trzy kopie następujących prac naukowych opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

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 (IF=1.90).
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 (IF=1.40).
3. Maciej Pyrka, Maciej Maciejczyk, *Why purine nucleoside phosphorylase ribosylates 2,6-diamino-8-azapurine in non-canonical positions ? A molecular modeling study*, Journal of Chemical Information and Modeling, 2020, 60, 1595-1606 (IF=3.97).

Prace te poprzedzone zostały następującymi paragrafami:

- I. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.
- II. Omówienie celu naukowego oraz uzyskanych wyników:
 - o *Wprowadzenie,*
 - o *Cel pracy doktorskiej.*
 - o *Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej,*
 - o *Wnioski,*

- *Spis literatury*, zawierający 34 odnośniki - będący uzupełnieniem spisów literatury w wymienionych wyżej publikacjach.
- III. Streszczenie w języku polskim.
- IV. Streszczenie w języku angielskim.
- V. Dorobek naukowy:
- *Spis wszystkich publikacji*,
 - *Działalność naukowa i organizacyjna*.
- VI. Oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Publikacje są dwuautorskie, Autora rozprawy i Promotora. Złożone oświadczenia zgodnie wskazują na wiodący udział Autora w stworzeniu prac składających się na rozprawę doktorską (odpowiednio, 70 %, 70% i 80 %). Przedłożona dokumentacja tworzy zintegrowaną całość i dobrze prezentuje osiągnięcia doktoranta będące przedmiotem niniejszej recenzji, jak również jego szersze osiągnięcia naukowe (3 inne publikacje) oraz profil jego działalności naukowej i organizacyjnej.

W badaniach zastosowano metody molekularnej mechaniki kwantowej na poziomie funkcjonału gęstości elektronowej (DFT) oraz *ab initio*, jak również metody molekularnego modelowania (MM, MD).

Pierwsze dwie prace poświęcone zostały zagadnieniu tautomerii (izomerii protonowej) 2,6,-dwuamino-8-azapuryny, 8-aza-izo-guaniny oraz 9-metylo-8-aza-izo-guaniny, w tym obliczeniom energii tych tautomerów oraz ich elektrostatycznym właściwościom. Rozważono wszystkie możliwe stany tautomeryczne w/w związków. Zastosowano dobrze ugruntowane przybliżenia pozwalające na dokładne rozwiązanie wieloelektronowego, niezależnego od czasu równania Schroedingera w przybliżeniu Borna-Oppenheimera. Obliczenia zostały przeprowadzone za pomocą metod na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p), jak również wykorzystując hybrydowe funkcjonały (BHandHLYP/cc-pVTZ) oraz metody kompozytowe (G3, G4). Wyznaczono dokładne różnice energii tautomerów oraz oszacowano różnice ich energii swobodnych.

Do ciekawszych wyników zaliczyłbym te wykonane do różnych form tautomerycznych 8-aza-izo-Guaniny oraz aza-Guaniny, co pozwoliło na przedstawienie wyników równowagi tautomerycznej tej sondy fluorescencyjnej. Wyniki były konsystentne także z wcześniejszymi badaniami eksperymentalnymi. Wyniki obliczeń zostały porównane także z tymi otrzymanymi dla Guaniny i izo-Guaniny, a zastosowana metodologia została przetestowana na 2,6 -dwuamino-8-azapurynie. Jej poprawność została sprawdzona przez obliczenie elektronowych stanów wzbudzonych oraz ich porównanie z dostępnymi danymi eksperymentalnymi.

Pierwsze trzy singletowe energie wzbudzenia zostały wyznaczone za pomocą czasowo-zależnej metody DFT oraz porównane ze znanymi eksperymentalnie maksimumami absorpcji.

Najbardziej stabilny tautomer 2,6-diamino-8-azapuriny, zarówno w fazie gazowej, jak i w wodzie występuje w formie aminowej i jest uprotonowany w pozycji N(9). Najbardziej preferowaną formą 8-aza-izo-Guaniny w fazie gazowej jest tautomer amino-enolowy, natomiast w środowisku wodnym tautomer amino-keetonowy, z tym że z drugim protonem w pozycji N(1) a nie N(9).

Ciekawym wnioskiem jest również to że efekt mutacji izoCyt→T zaobserwowany dla alternatywnego kodu genetycznego może być spodziewany również przypadku zamiany izo-Guaniny na 8-aza-izo-Guaninę.

W trzeciej pracy zaproponowano m.in. wyjaśnienie mechanizmu kanonicznej i niekanonicznej rybozylacji dwóch azapuryn przez PNP, odpowiednio aza-Guaniny oraz 2,6-dwuamino-8-azapuryny, który został zaobserwowany we wcześniejszych badaniach eksperymentalnych (A. Stachelska-Wierzchowska et al., *Molecules*, (2016), 21:44).

Analiza populacji tautomerów aza-Guaniny oraz 2,6-dwuamino-8-azapuryny, w połączeniu z teoretycznym miareczkowaniem PNP oraz analizą komplementarności stanów w procesie dokowania sugerują, że aza-Guanina wiąże się do kieszeni PNP ze zdeprotonowanym Glu-201 enzymu (czyli z jego formą ujemnie naładowaną), natomiast 2,6-dwuamino-8-azapuryna wiąże się do kieszeni z uprotonowanym Glu-201 (czyli z jego formą neutralną).

Obliczenia numeryczne oraz dokowanie wykonane są solidnie a analiza uzyskanych wyników jest wiarygodna. Można z całą pewnością stwierdzić, że uzyskane wyniki niewątpliwie przyczyniają się do lepszego poznania mechanizmów zjawiska tautomerii azapuryn oraz pozwolą lepiej zrozumieć szerzej procesy punktowych mutacji w kwasach nukleinowych, jak również mechanizmy dopasowania (wzajemnego rozpoznawania się) struktur tautomerycznych do struktury donorowo-akceptorowej wiązań wodorowych w centrum wiążącym PNP. Praca napisana jest poprawnie pod względem redakcyjnym i jasno jeżeli chodzi o zawartość merytoryczną. Czytelnik gubi się trochę w nomenklaturze struktur tautomerycznych, ale nie ma chyba na to rady, bo struktur tych jest po prostu dużo.

Mam kilka niewielkich uwag o charakterze dyskusyjnych, które są następujące:

- Nie jest dla mnie do końca jasne w jaki sposób oszacowany został wkład entropowy do różnic energii swobodnej tautomerów. Przypuszczam, że wykorzystany został w tym celu model molekularnego wielowymiarowego oscylatora (harmonicznego lub anharmonicznego), ale nie jestem tego pewien. Oczekiwałbym w trakcie obrony pracy doktorskiej odpowiedzi na to pytanie.

- Zagadnienie alternatywnego kodu genetycznego, np. takiego że zamiast guaniny mamy izoguaninę a zamiast cytozyny mielibyśmy izocytozynę było dyskutowane z wykorzystaniem obliczeń kwantowych już w latach 80-tych poprzedniego stulecia - wystarczy np. wpisać w Google pytanie "why isoguanine and isocytosine are not the components of the genetic code". Stabilność strukturalna nośników kodu genetycznego nie jest jednak wszakże cechą bezwzględnie akceptowaną w procesie molekularnej ewolucji. Należy bowiem zwrócić uwagę, że w stanie próżni nawet zwykła guanina (jak również jej 9-metylowana pochodna) w formie aminowo-enolowej jest trochę bardziej stabilna od kanonicznej formy aminowo-keetonowej - komplementarnej do cytozyny (patrz np. K. Szczepaniak et al., *Infrared spectra of tautomers and rotamers of 9-methylguanine. An experimental and theoretical study.* J.Chem.**69**,1705 (1991)), a jednak guanina jest nośnikiem kodu genetycznego. Byłbym ciekaw poznania poglądu Autora na problem „stabilności strukturalnej zasad nukleinowych” vs „bycia molekularnym nośnikiem kodu genetycznego”.

Maciej Pyrka jest w sumie współautorem sześciu prac opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny IF = 15.97, 470 punktów MNiSW). Odbił dwa staże naukowe na University of Florida w Gainesville oraz w Instytucie Fizyki na Uniwersytecie Szczecińskim. Brał także aktywny udział w kilku warsztatach i konferencjach naukowych.

Biorąc pod uwagę osiągnięcia Autora uzyskane w recenzowanej pracy doktorskiej jak i w jego dotychczasowej pracy naukowej uważam, że Maciej Pyrka jest dobrym i doświadczonym pracownikiem naukowym.

W podsumowaniu chciałbym wyrazić opinię, że rozprawa spełnia ustawowe (Ustawa z 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”) i zwyczajowe warunki stawiane rozprawom doktorskim, w szczególności zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wnoszę w związku z tym o dopuszczenie Pana magistra Macieja Pyrkę do dalszych etapów postępowania związanego z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng