

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-714 Poznań

Poznań, 9 listopada 2015 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister Beaty Naumczuk zatytułowanej
***„Synteza i badanie właściwości chemicznych i biologicznych potencjalnych inhibitorów
topoizomerazy I oddziałujących z oligomerami DNA.”***

Choroby nowotworowe to w dzisiejszych czasach bardzo poważny problem cywilizacyjny. Obecnie podstawową metodą leczenia chorób nowotworowych jest przeprowadzenie zabiegu operacyjnego, a następnie naświetlanie oraz terapia systemowa wykorzystująca leki przeciwnowotworowe (tzw. chemioterapeutyki). Rola chemioterapeutyków polega na zniszczeniu intensywnie dzielących się komórek nowotworu złośliwego, jednakże chemioterapeutyki niszczą również prawidłowe komórki organizmu. Niska efektywność klasycznych metod leczenia chorób nowotworowych jest jedną z przyczyn poszukiwania coraz to nowszych, bardziej skutecznych leków wykazujących mniej niepożądanych działań.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Beaty Naumczuk zostały wykonane pod kierunkiem prof. dr hab. Lecha Kozerskiego i dotyczą półsyntetycznych analogów kamptotecyny o silnych właściwościach przeciwnowotworowych, topotekanu (TPT) oraz SN38, aktywnego metabolitu irinotekanu. Mechanizm działania pochodnych kamptotecyny polega na specyficznej inhibicji topoizomerazy I, co prowadzi do powstania jednoniciowych odcinków DNA, które blokują widelki replikacyjne.

Rozprawę spisaną na 143 stronach rozpoczyna wstęp, po którym Autorka jasno precyzuje cel pracy - otrzymanie nowych, rozpuszczalnych w wodzie, pochodnych topotekanu i SN38 oraz charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Część literaturowa rozprawy podzielona jest na trzy podrozdziały. Wpierw Doktorantka

pokróćce omawia znane mechanizmy oddziaływania leków z DNA a następnie, dla wybranych leków stosowanych od lat w terapii antynowotworowej, przedstawia ich strukturę chemiczną i przybliża czytelnikowi mechanizm ich działania. Osobny podrozdział Autorka poświęciła o-metylenochinonom, bardzo reaktywnym związkom, które mają zdolność alkilowania i sieciowania DNA. Informacje zawarte w części literaturowej wprowadzają czytelnika w zagadnienia przedstawione w dalszej części rozprawy. Opis wyników badań połączony z dyskusją zamyka podsumowanie, po którym umieszczona została część eksperymentalna wraz z załącznikami. Rozprawę kończy spis cytowanej literatury obejmujący 123 pozycje.

Opisane w pracy badania skupiają się wokół dwóch grup związków, pochodnych topotekanu i SN38. W przypadku pierwszej grupy mamy do czynienia z kontynuacją badań prowadzonych wcześniej w Pracowni prof. Kozerskiego. Chociaż metoda otrzymywania soli topotekanu zawierających w pozycji 23 grupę N-trimetyloamoniową była opracowana wcześniej, w niniejszej rozprawie Doktorantka zaproponowała nową metodę oczyszczania wieloskładnikowej mieszaniny reakcyjnej. W efekcie udało jej się uzyskać mieszaninę soli kwasu mrówkowego pożądanej pochodnej oraz topotekanu w stosunku 1:3. Mieszaninę tę wykorzystała do zbadania oddziaływań $[TPT-Me_3N]^+HCOO^-$ z oktamerem DNA. Niestety zamieszczone na stronie 55 wyjaśnienie wyboru takiego a nie innego fragmentu DNA nie jest dla mnie zrozumiałe. Mgr Naumczuk pisze mianowicie, że „terminalna para GC oligomeru o sekwencji $d(GCGATCGC)_2$ odpowiada połowie przerwy w przerwanym dekamerze”. Nie potrafię sobie wyobrazić, co Autorka miała na myśli.

Wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni pokazały, że czwartorzędowa pochodna topotekanu łączy się kowalencyjnie z DNA podczas naświetlania roztworu o $pH=6$ promieniowaniem UV o długości fali 365 nm. Doktorantka postanowiła powtórzyć tę reakcję stosując oczyszczoną przez siebie mieszaninę oraz zwiększając do 7 wartość pH . Przebieg reakcji monitorowała za pomocą widm 1H NMR. Zauważyła, że już sama obecność pochodnej $[TPT-Me_3N]^+HCOO^-$ indukuje zmianę przesunięć chemicznych sygnałów DNA. Po godzinie naświetlania promieniowaniem UV ($\lambda=365$ nm) zaobserwowała prawie całkowity zanik sygnału pochodzącego od grupy trimetyloamoniowej związanej z pochodną topotekanu oraz pojawienie się sygnału należącego do mrówczanu trietyloaminy, co świadczyło o przereagowaniu pochodnej TPT. Za pomocą widm masowych (ESI MS oraz MALDI-TOF) wykazała, że pochodna TPT w wyniku aktywacji fotochemicznej łączy się kowalencyjnie z DNA. Jednak proces alkilacji nie jest selektywny, co mgr Naumczuk wywnioskowała na podstawie zaobserwowanego poszerzenia sygnałów rezonansowych w widmach 1H NMR.

Zastanawiałam się, czy Doktorantka próbowała prześledzić zachowanie się mieszaniny DNA / $[\text{TPT-Me}_3\text{N}]^+\text{HCOO}^-$ pozostawionej bez naświetlania?

Mam pytanie dotyczące tego fragmentu rozprawy. Dlaczego widma zamieszczone na rysunkach 6.1A i 7.7A tak bardzo się różnią? Doktorantka pisze, że w widmie oktameru DNA zarejestrowanego w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ w obecności 25 mM NaCl (rysunek 6.1A), niskie stężenie oligomeru (0.33 mM) jest przyczyną pojawienia się oprócz sygnałów od dupleksu również sygnałów od pojedynczej nici. Przyznam, że zaskoczyła mnie ta obserwacja, gdyż do tej pory nie zdarzyło mi się, aby w takich warunkach roztworu kanoniczny dupleks o wzajemnie komplementarnej sekwencji zasad znajdował się w wolnej wymianie z pojedynczą nicią. Jak w takim razie wytłumaczyć fakt, że oligomer o identycznej sekwencji zasad i porównywalnym stężeniu (0.31 mM), w buforze o $\text{pH}=6$ tworzy jedynie dupleks, jak to pokazuje rysunek 7.7A? Może wyjaśnienie jest proste, jednak aby to zrozumieć, potrzebne mi są dodatkowe informacje. Przy okazji dodam, że znacznie ułatwiłoby mi czytanie rozprawy, gdyby Doktorantka dołączyła widma również w formie elektronicznej. Na widmach zamieszczonych w rozprawie, szczególnie tych wykonanych dla cząsteczek DNA, niejednokrotnie trudno mi było zauważyć niewielkie różnice, które mgr Naumczuk omawia w tekście. Ten fragment rozprawy kończy bardzo krótkie omówienie wyników badań biologicznych przeprowadzonych dla $[\text{TPT-Me}_3\text{N}]^+\text{HCOO}^-$ na komórkach białaczki mysiej. W eksperymentach tych zaobserwowano znaczny wzrost aktywności biologicznej po naświetlaniu promieniowaniem UV.

Druga część rozprawy poświęcona jest otrzymaniu nowych, rozpuszczalnych w wodzie pochodnych SN38. Mgr Naumczuk otrzymała sześć pochodnych SN38 w formie soli kwasu mrówkowego oraz soli kwasu chlorowodorowego z wydajnością od 18 do 30 %. Następnie sprawdziła ich stabilność w wodzie, DMSO i metanolu. Okazało się, że wszystkie nowe pochodne są stosunkowo stabilne w DMSO, lecz część z nich po rozpuszczeniu w wodzie ulega hydrolizie. Jedna z pochodnych, BN74A, okazała się nietrwała w metanolu, podobnie jak to już wcześniej zaobserwowano dla topotekanu. Szkoda, że wyników tych Autorka nie umieściła w tabeli, gdyż nie zawsze z opisu było jasne, której soli dotyczy omawiany wynik.

W kolejnym etapie Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy pochodne SN38 oddziałują z dupleksem DNA. Podobnie jak we wcześniej prowadzonych badaniach dla soli topotekanu, wykorzystwała w tym celu widma NMR. Początkowo eksperymenty NMR prowadziła w temperaturze pokojowej, jednak zmiany przesunięć chemicznych obserwowane w widmach były niewielkie. Dlatego też większość danych eksperymentalnych uzyskała w

temperaturze 10 °C, gdzie zmiany przesunięć chemicznych wywołane obecnością liganda były trochę większe. Dla wszystkich zbadanych przez nią ligandów największe zmiany przesunięć chemicznych w duplekse DNA zaobserwowała dla sygnałów pochodzących od protonów końcowej pary zasad GC. Na tej też podstawie wywnioskowała, że miejscem oddziaływania pochodnej SN38 z dupleksem DNA jest właśnie końcowa para zasad GC. Za pomocą eksperymentów NMR oraz widm masowych Doktorantka wykazała, że również mrówczan SN-Me₂ oraz chlorowodorek BN37A alkilują DNA, chociaż reakcje te nie przebiegają selektywnie. W pracy znalazłam informację, że wykorzystując widma masowe mgr Naumczuk ustaliła, że również pochodne BN71A oraz BN74A mają podobne właściwości. Co ze związkami BN67A i BN49A, których obecność indukowała stosunkowo duże zmiany przesunięć chemicznych w DNA?

W swoich badaniach mgr Naumczuk wykazała się dużą dociekliwością. Wiedząc, że pochodne SN38 oddziałując z DNA mogą tworzyć wiązania kowalencyjne, postanowiła również sprawdzić oddziaływanie pochodnej BN37A z deoksyguanozyną. Związek BN37A wybrała dlatego, że posiadał on największą zdolność alkilowania DNA. Postęp reakcji monitorowała za pomocą widm ¹H NMR. Otrzymany związek, którego strukturę Doktorantka ustaliła stosując różne techniki NMR okazał się produktem alkilowania grupy 2-NH₂ deoksyguanozyny przez pochodną BN37A. Wynik ten z pewnością pozwoli na lepsze zrozumienie procesów zachodzących podczas oddziaływania SN38 z DNA.

Rozprawę kończy rozdział dotyczący badań biologicznych wykonanych dla pochodnych SN38, z których wynika, że związki otrzymane przez mgr Naumczuk wykazują *in vitro* znacznie lepszą aktywność przeciwko komórkom nowotworowym niż stosowany w chemioterapii irinotekan. Wyniki tych badań są niezwykle obiecujące, gdyż pokazują, że związki te nie są toksyczne dla komórek prawidłowych, jak to ma miejsce w przypadku SN38.

Recenzowana rozprawa zawiera bardzo obszerny i niezwykle interesujący materiał eksperymentalny. Szkoda tylko, że znalazłam w niej stosunkowo dużo błędów edytorskich oraz żargonowych wyrażeń. Z obowiązku recenzenta wymienię tylko niektóre usterki.

Na przykład w spisie literatury, w tytule publikacji, której mgr Naumczuk jest pierwszym autorem wkradł się błąd i zamiast „covalent binding” jest „*covalent Winding*”.

Nie podobają mi się niektóre sformułowania używane w rozprawie takie jak na przykład „*tworzenie wiązań wewnątrznicinowych*” (strona 19) lub „*międzynicinowych*” (strona 27) czy wyrażenie „*pojedyncza nitka DNA*” (strona 50).

Podpisy pod rysunkami są czasami zbyt lakoniczne. Na przykład w opisie pod rysunkiem 4.1 brak informacji, że przedstawiona jest struktura krystalograficzna kompleksu. Dodałabym również, że kolorem zielonym przedstawiono strukturę topoizomerazy I, a kolorem żółtym podwójną helisę DNA.

Pod rysunkami ilustrującymi widma DOSY mgr Naumczuk konsekwentnie pisze, że „*strzałki wskazują współczynniki dyfuzji dla DNA...*” zamiast na przykład „*strzałki wskazują sygnały pochodzące od DNA, dla którego wartość współczynnika dyfuzji wynosi....*”

Z kolei na stronie 69 wyjaśnia, że „*topotekan interkaluje do terminalnej pary GC*”, chociaż zjawisko interkalacji to wsuwanie się liganda pomiędzy sąsiadujące pary zasad.

W celu pracy Doktorantka wspomina, że dla „*lepszego zrozumienia mechanizmu oraz regioselektywności oddziaływania nowych pochodnych SN38 zaplanowano przeprowadzenie reakcji związków z modelowymi nukleozydami*”, początkowo z 2'-deoksyguanozyną, a następnie z pozostałymi nukleozydami. Niestety nigdzie w pracy nie znalazłam informacji, dlaczego Doktorantka ograniczyła swoje badania jedynie do deoksyguanozyny. Czy zabrakło jej czasu na kolejne eksperymenty, czy może reakcja z pozostałymi nukleozydami nie zachodzi w takim stopniu, jak z guanozyną?

W części dotyczącej badań biologicznych omawiane są wyniki testów MTT i CVS. Krótki opis testu MTT znalazłam w części eksperymentalnej, natomiast nigdzie w rozprawie nie jest wyjaśnione, na czym polega test CVS.

Na rysunku 7.17 sygnały na widmie 1D nie pasują do sygnałów widocznych w widmie DOSY. Czy są to widma różnych związków?

Dobrze by było, gdyby tabelom zawierającym wartości przesunięć chemicznych dupletu DNA w obecności różnych ligandów towarzyszyły również widma, które posłużyły Doktorantce do przypisania sygnałów. Można by zamieścić je chociażby na płycie DVD wraz z innymi widmami. Czytając rozprawę niejednokrotnie miałam ochotę spojrzeć na omawiane w niej widma aby móc ocenić skalę trudności przeprowadzanych analiz.

Powyższe uwagi w żaden sposób nie wpływają na ogólną ocenę merytoryczną rozprawy a wyniki uzyskane przez mgr Naumczuk są oryginalnym i wartościowym wkładem w poznanie mechanizmów oddziaływania leków z DNA. Pragnę podkreślić, że cele jakie postawiono przed Doktorantką były ambitne i z pewnością niełatwe w realizacji. Za największe osiągnięcie Doktorantki uważam otrzymanie nowych związków, których aktywność cytotoksyczna jest kilka rzędów większa niż stosowany klinicznie irinotekan, a jednocześnie są porównywalnie lub znacznie mniej cytotoksyczne w stosunku do komórek normalnych. Na

uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest współautorem czterech zgłoszeń patentowych oraz pierwszym autorem publikacji, która ukazała się w tym roku w *Magnetic Resonance in Chemistry*. Ponadto mgr Naumczuk aktywnie uczestniczyła w konferencjach krajowych i zagranicznych, gdzie niejednokrotnie prezentowała wyniki swoich badań.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r., wraz z późniejszymi zmianami. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej PAN o dopuszczenie mgr Beaty Naumczuk do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia Idaniew