

Prof. dr hab. Józef Mieczkowski

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Pracownia Chemii Związków Naturalnych

mieczkow@chem.uw.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Jolanty Szymańskiej pt.: „Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi” przedstawionej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych.

Jednym z wielu zadań chemii organicznej jest badanie – wyjaśnianie mechanizmów reakcji chemicznych oraz próby określenia, który z etapów pośrednich decyduje o szybkości, a czasem o kierunku przebiegu reakcji. Jednym, ale oczywiście nie jedynym sposobem pozwalającym na wniknięcie w mechanizm badanej reakcji jest wykorzystanie związków znakowanych w określonych pozycjach izotopami węgla, wodoru i tlenu. Występowanie efektu izotopowego wskazuje na kluczowy etap badanej reakcji. Brak efektu izotopowego może wskazywać, że badane wiązanie nie bierze udziału w kluczowym dla reakcji etapie. Takim właśnie zagadnieniom poświęcona jest rozprawa Pani mgr Jolanty Szymańskiej pt.: „Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi” wykonana w Pracowni Chemii Biomolekuł pod kierunkiem prof. dr hab. Marianny Kańskiej.

Rozprawa napisana jest w sposób klasyczny, tj. składa się z szeregu rozdziałów takich jak: określenie celu badań (2 strony), przeglądu literaturowego (55 stron), badań własnych (38 stron), podsumowania i wniosków (9 stron), części eksperymentalnej (24 strony) i

bibliografii (143 pozycje literaturowe). Każdemu z powyższych rozdziałów poświęcę kilka uwag krytycznych.

Podstawowym celem przedstawionej do recenzji pracy było zbadanie odwracalnej biotransformacji L-alaniny lub jej fluorowanej pochodnej katalizowanej przez dehydrogenazę L-alaninową z pomocą kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych. Aby można było zrealizować zamierzone plany badawcze konieczne było najpierw opracowanie i optymalizacja warunków syntezy oraz metod identyfikacji odpowiednio znakowanych izotopomerów L-alaniny, L-3-fluoroalaniny oraz syntezy koenzymu [(4R)-²H]-NADH. Substraty te posłużyły autorce do dalszych badań nad efektami izotopowymi w reakcjach deaminacji lub redukcyjnego aminowania. W świetle moich wcześniejszych uwag podjęcie tego typu badań uważam za w pełni uzasadnione.

Rozdział „Przegląd literaturowy” nie ma charakteru jednolitego tematycznie i złożony jest z szeregu podrozdziałów. Podrozdział pierwszy złożony jest z szeregu rozdziałów dotyczących przede wszystkim klasyfikacji, budowy i działania takich klas enzymów jak oksydoreduktazy, dehydrogenazy, liazy. Jest to wiedza o enzymach „w pigułce”. Uważam, że autorka wykazała się dużą wiedzą w dziedzinie wykorzystywania enzymów w najogólniej pojmowanej syntezie organicznej. Podrozdział ten zawiera bardzo interesującą i dobrze wyselekcjonowaną wiedzę o enzymach, przydatną potem doktorantce w dalszych badaniach. Drugi podrozdział dotyczy syntezy związków znakowanych, w szczególności alaniny i jej izotopomerów. Trzeci poświęcono definicji oraz rodzajom efektów izotopowych.

Te trzy pozornie odległe tematycznie rozdziały nie były wybrane przypadkowo i posłużyły doktorantce do zaplanowania a następnie przeprowadzenia badań własnych. Analizując rozdział „Przegląd literaturowy” stwierdzam, że doktorantka wykazała się biegłą znajomością bieżącej literatury fachowej, w szczególności chemizmu reakcji enzymatycznych.

Rozdział „Badania własne” możemy podzielić zasadniczo na dwie części. Część pierwsza to część syntetyczna obejmująca opracowanie a następnie optymalizację reakcji dezaminacji katalizowaną przez dehydrogenazę L-alaninową oraz reakcji odwrotnej tj. redukcyjnego aminowania kwasu pirogronowego i 3-fluoropirogronowego, opracowanie warunków reakcji redukcji NAD⁺ do [(4R)-²H]-NADH oraz kolejno opracowania warunków reakcji syntezy tryptofanu z indolu i 3-fluoroalaniny katalizowanej przez tryptofanazę. Ta

ostatnia reakcja jest oryginalnym osiągnięciem doktorantki. Doktorantka zoptymalizowała również warunki reakcji redukcji kwasu 3-fluoropirogronowego do kwasu (R)-3-fluoromlekowego katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową. W wyniku przeprowadzonych reakcji doktorantka otrzymała cztery, znakowane deuterem, związki, tj.: [(4R)-²H]-L-Trp, [2-²H]-L-Ala, 3F-(2-²H)- L-Ala oraz [2-²H]-L-Trp.

Druga część to część kinetyczna, w której zmierzono efekty kinetyczne dla szeregu reakcji katalizowanych enzymatycznie. W wyniku przeprowadzonych pomiarów doktorantka zasugerowała, że przeniesienie anionu wodorkowego jest etapem kluczowym, limitującym szybkość reakcji dezaminacji i szybkość ta jest ograniczona przez uwalnianie produktu – NADH. Podobnie wysokie wartości efektów izotopowych w reakcji redukcyjnego aminowania kwasu 3-fluoropirogronowego wskazują na to, że elektroujemny atom fluoru sprawia, że na grupie karbonylowej tworzy się większy cząstkowy ładunek dodatni, co ułatwia nukleofilowy atak anionu wodorkowego. W rezultacie rozpatrywany etap katalizy, wrażliwy na podstawienie izotopowe, w dużo większym stopniu decyduje o szybkości całego procesu w porównaniu do reakcji z niepodstawionym kwasem pirogronowym. Otrzymane wyniki badań są dobrze udokumentowane (patrz część eksperymentalna) i wskazują na duże umiejętności eksperymentalne doktorantki a także na umiejętność interpretacji wyników. Doktorantka porusza się swobodnie zarówno w klasycznej syntezie organicznej jak i w chemii enzymów, a także w zagadnieniach radiochemicznych oraz spektroskopowych.

Zaprezentowane wyniki oceniam bardzo wysoko, niestety z obowiązku recenzenta jestem zobligowany także do uwag krytycznych. Praca napisana jest w sposób staranny, poprawną polszczyznę. W znikomym stopniu też występuje żargon laboratoryjny. Niestety zauważyłem kilka błędów edytorskich, które wymieniam poniżej:

- Schemat 3.9 str. 29 – błędny wzór kwasu mrówkowego
- Schemat 3.17 str. 39 – podstawnik oznaczony na rysunku b sugeruje obecność wiązania węgiel – fosfor. Oczywiście jest to wiązanie węgiel tlen (z kwasu fosforowego)
- Schemat 3.21 str. 42 – brak ładunku na atomie azotu w pirydyloamidzie

- Schemat 3.23 str. 44 – brak atomów wodoru na węglu ^{13}C
- Schemat 3.36 str. 54 – brak atomów wodoru na węglu ^{11}C
- Schemat 4.1 str. 70 – błąd w schemacie sugerujący, że kwas 3-fluoromlekowy otrzymujemy z 3-fluoro-L-alaniny. Oczywiście kwas ten otrzymujemy z kwasu 3-fluoropirogronowego
- Schemat 4.2 str. 71 – w produkcie reakcji nie ma wiązania węgiel – fosfor. Jest węgiel – tlen
- Rysunek 4.2 str. 77 – we wzorze izotopomeru NADH na atomie tlenu brak atomów wodoru (lub deuteru) lub przynajmniej ładunku ujemnego.

Wskazane przeoczenia nie umniejszają wagi otrzymanych rezultatów. Sposób prezentacji, umiejętne interpretacje oraz krytyczny stosunek do otrzymanych rezultatów świadczą o dojrzałości naukowej doktorantki i dobrze rokują dla jej przyszłej pracy badawczej.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach i tytułach naukowych i proszę Wysoką Radę o dopuszczenie mgr Jolanty Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Józef Mieczkowski



Warszawa, 10.10.2014r.

Prof. dr hab. Alfreda Padzik-Graczyk
Pracownia Biochemii
Instytut Optoelektroniki
Wojskowa Akademia Techniczna

**RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR JOLANTY SZYMAŃSKIEJ PT.:
„BADANIE BIOTRANSFORMACJI L-ALANINY I JEJ POCHODNYCH METODAMI
IZOTOPOWYMI”**

Praca została wykonana w ramach projektu nr POKL 04.01-00-100/10 „Chemia, fizyka i biologia na potrzeby społeczeństwa XXI wieku: nowe makrokierunki studiów I, II, III stopnia w projekcie IV POKL.

Przedstawiona do recenzji praca mgr Jolanty Szymańskiej pt.: „Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi” jest szczegółowo opracowaną pod względem literatury dotyczącej związanych ze zmianami biochemicznymi, jakie zachodzą w organizmach żywych, w tym w organizmach ludzkich.

Dokładne poznanie wpływu różnych enzymów na zmiany biochemiczne prowadzące do skomplikowanych transformacji zachodzących w organizmach żywych zwierzęcych i ludzkich może być przydatne w takich dziedzinach wiedzy jak biochemia lekarska stosowana w badaniach nad rozwojem organizmów zwierzęcych i organizmów ludzkich. Wyjaśnienie skomplikowanych mechanizmów biochemicznych i dokładne oddziaływanie wybranych pierwiastków promieniotwórczych może być wykorzystane w diagnostyce różnych chorób zarówno zwierzęcych jak i ludzkich.

Mechanizmy związane z przebiegiem w organizmach żywych zarówno zwierzęcych jak i ludzkich, skomplikowanych reakcji enzymatycznych i ich wpływu na przebieg funkcjonowania tych organizmów może być wykorzystany w pracach związanych z diagnostyką kliniczną.

W pracy pani mgr Jolanty Szymańskiej obserwujemy obszerny i dokładny przegląd literatury dotyczącej badanego tematu, oraz prace związane ze skomplikowaną syntezą związków nasyconych i ich izomerów znakowanych deuterem oraz badanie mechanizmów, w którym uczestniczą enzymy będące również przedmiotem badań w tej pracy.

Dodatkowy wysiłek doktorantki związany jest z dużą pracą naukowo-fizyczną używając w swoich syntezach, związków zawierających pierwiastki takie jak deuter, ^{18}F , który jest emitерem promieniowania β^+ .

Tak więc opracowana przez doktorantkę metoda syntezy 3-fluoro-L-alaniny może być w przyszłości zaadaptowana w syntezie radioznaczników PET.

W pracy tej doktorantka wykazała duże wiadomości i umiejętności otrzymywania nowych związków organicznych, które można wytwarzać poza organizmami żywymi i mogą służyć do wyjaśnienia wielu procesów biochemicznych.

Reasumując, doktorantka opracowała wiele metod otrzymywania związków chemicznych występujących w procesach biochemicznych zarówno zwierząt jak i ludzi.

Poza pracą związaną z trudnymi syntezami związków biorących udział w procesach biochemicznych, doktorantka wykazała dobrą znajomość metod fizykochemicznych, które używała do ustalenia struktur otrzymanych związków. Wykazała również dobrą znajomość literatury przedmiotu.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pokazała, że doktorantka jest doskonale przygotowana i samodzielna w wykonywaniu skomplikowanych syntez organicznych jak i ustalaniu struktur otrzymanych związków.

Doktorantka wykazała znakomitą wiedzę i zdolność do otrzymywania nowych związków, ustalania ich struktur z określeniem perspektywy ich użytkowania.

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską pani Jolanty Szymańskiej pt.: „Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi” oceniam jako **bardzo dobrą** i przedstawiam do wyróżnienia.

Reasumując stwierdzam, że dysertacja pt. "Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi" odpowiada w pełni wymaganiom stawianym pracom na stopień doktora i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Jolanty Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Alfreda Paokiti - Grazieli
M. G.