



Toruń, dnia 19 listopada 2021 r.

Recenzja

pracy doktorskiej Pana mgr. Krzysztofa Żukowskiego pt. „Modyfikowane DNAzyny o aktywności peroksydazowej. Otrzymywanie, właściwości oraz zastosowanie bioanalityczne”

Ocena wyboru tematyki badawczej

Pan mgr Krzysztof Żukowski wykonał pracę doktorską pod opieką Pana Profesora dr hab. Bernarda Juskowiaka oraz Pani dr Joanny Kosman w Zakładzie Chemii Bioanalitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tematyka pracy jest związana z badaniami, prowadzonymi w tym zespole od wielu lat. Dotyczy DNAzymów, a zwłaszcza układów G-kwadrupeks - hemina i G-kwadrupeks - kropka kwantowa. Pomimo licznych badań prowadzonych w tym zakresie, tematyka pozostaje nadal bardzo aktualna m.in. ze względu na praktyczne aspekty wykorzystania DNAzymów w bioanalityce. W konsekwencji istotą podjętego przez Doktoranta problemu naukowego jest poszukiwanie nowych strategii modyfikacji tych katalizatorów, co miało na celu zwiększenie aktywności peroksydazowej.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Oceniana rozprawa doktorska to klasyczna, 260-cio stronicowa praca. Podzielono ją na dziewięć zasadniczych części: wstęp, część literaturową, cel, część eksperymentalną, wyniki i ich dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie, spis publikacji, literaturę. Ostatnia z części to spis aż 553 publikacji, monografii, książek, które posłużyły Doktorantowi zarówno podczas przygotowywania przeglądu literatury, jak i dyskusji uzyskiwanych wyników. To bardzo duża liczba odnośników literaturowych, która mam nadzieję świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta. Na podkreślenie i wyróżnienie zasługuje estetyka szaty graficznej, która jest znakomita.

Przegląd literaturowy Pan mgr Krzysztof Żukowski rozpoczął od przedstawienia podstawowych zagadnień związanych z kwasami nukleinowymi i ich strukturą. Kolejny rozdział pracy Doktorant poświęcił opisowi struktury, topologii, właściwości i aktywności G-kwadrupeksów. Szczegółowo omówił termodynamiczne aspekty tworzenia G-kwadrupeksu oraz czynniki stabilizujące tę strukturę, które są bardzo istotne dla zwiększenia aktywności katalitycznej. Przedstawił także sposoby oddziaływania G-kwadrupeksów z różnymi ligandami jednocześnie rozszerzając tematykę o zagadnienia związane z G-kwadrupeksami RNA, G-tyrpleksami, I-motywami. Ważnym podrozdziałem jest omówienie metod badań G-kwadrupeksów, co jest bardzo istotne w kontekście projektowania i syntezy DNAzymów i było jednym z celów recenzowanej pracy doktorskiej. Z tego względu uzasadniony jest przegląd literatury dokonany przez mgr. Krzysztofa Żukowskiego, poświęcony wykorzystaniu spektroskopii dichroizmu kołowego, spektroskopii UV, rentgenowskiej analizy strukturalnej, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, spektrometrii mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie w badaniach G-kwadrupeksów. Niewątpliwie bardzo ciekawym rozdziałem jest opis biologicznych aspektów G-kwadrupeksów, który świetnie uzupełnia informacje o tych związkach, ale jednocześnie uwypukla ich znaczenie w organizmie i istotność ich badań. W dalszej części Doktorant przedstawił zagadnienia dotyczące struktury, aktywności i zastosowania w bioanalityce peroksydazy chrzanowej. Jest to ściśle związane z celem badań,



ponieważ syntezowane przez Doktoranta DNAzymy mają być alternatywą dla peroksydaz peptydowych. Z tego względu dalsza część rozprawy doktorskiej została poświęcona charakterystyce tego typu katalitycznych układów DNA. Mgr Krzysztof Żukowski w oparciu o literaturę naukową bardzo wyczerpująco omówił wpływ buforu i jego pH, kationów, innych reagentów obecnych w medium reakcyjnym, modyfikacji sekwencji i szkieletu oligonukleotydów oraz topologii G-kwadrupleksu na aktywność katalityczną DNAzymów. Rozważania te rozszerzył o charakterystykę DNAzymów z kowalencyjnie przyłączoną hemina o aktywności peroksydazowej. Następnie Doktorant ciekawie przedstawił dziedziny, w których ta grupa DNAzymów znalazła dotychczas zastosowanie. Tym samym udowodnił jak ważne jest poszukiwanie ich udoskonaleń lub nowych możliwości ich wykorzystywania w bioanalizie. Dwa ostatnie rozdziały części literaturowej to opis zagadnień związanych z reakcją „click chemistry” oraz kropkami kwantowymi (otrzymywaniem, wykorzystaniem i biokoniuatami z DNA). Teoria przedstawiona w tych rozdziałach znalazła zastosowanie podczas eksperymentów prowadzonych przez Doktoranta w trakcie realizacji badań.

Należy podkreślić, że mgr Krzysztof Żukowski przygotował tę część rozprawy doktorskiej bardzo starannie, w oparciu o kilkaset literaturowych źródeł naukowych. Doktorant umiejętnie prowadzi od struktury kwasów nukleinowych, po tematykę katalitycznego DNA i wszystkie aspekty związane z tymi związkami. To świetny przegląd literatury, klarowny i bardzo systematyczny opis zagadnień teoretycznych. Jest bardzo dobrym przygotowaniem i wprowadzeniem do eksperymentów prowadzonych w części doświadczalnej. Sprawia on, że cel postawiony badaniom nie budzi zastrzeżeń. Jako że, układy G-kwadrupleks - hemina cechuje niższa aktywność peroksydazowa w porównaniu do peroksydazy chrzanowej, poszukiwane są nowe strategie modyfikacji tych układów. Stało się to jednym z głównych celów recenzowanej pracy doktorskiej. Jego realizacja objęła otrzymanie, charakterystykę oraz zbadanie aktywności peroksydazowej zmodyfikowanych układów DNAzymów.

Po poprawnym przedstawieniu odczynników, aparatury i opisie metodologii pracy (część eksperymentalna), Pan mgr Krzysztof Żukowski przedstawił przeprowadzone badania oraz dokonał interpretacji uzyskiwanych wyników. Rozpoczął od badania wpływu kowalencyjnego przyłączenia heminy na aktywność peroksydazową DNAzymów otrzymywanych w reakcji amidowania, jak również na strukturę i stabilność temperaturową G-kwadrupleksów. Pan mgr Krzysztof Żukowski opisał widma dichroizmu kołowego, profile topnienia, wartości pKa heminy, aktywność DNAzymów (względem fluorogennego substratu Amplex) opartych na dwóch podobnych sekwencjach (PS2.M oraz CatG4). W obecności kationów potasu tworzyły one stabilne G-kwadrupleksy o topologii równoległej, przy czym struktury te były stabilniejsze i sztywniejsze dla sekwencji CatG4. Zaletą zsyntezowanych DNAzymów (z kowalencyjnie związaną cząsteczką heminy) była ich znacznie wyższa aktywność peroksydazowa w nieobecności kationów stabilizujących w porównaniu do aktywności niekowalencyjnych DNAzymów. Efekt ten jest bardzo istotny dla bioanalizy wykorzystania tych związków i jest jedną z nowości prowadzonych badań. Kowalencyjna modyfikacja oligonukleotydu za pomocą heminy wpłynęła korzystnie na formowanie się równoległych G-kwadrupleksów.

Poniekąd kontynuacją tych badań było określenie wpływu długości łącznika (trzy różne) heminy do G-kwadrupleksu oraz pozycji przyłączenia heminy (3', 5', pętla G-kwadrupleksu) na zdolność katalityczną DNAzemu. W tym etapie badań mgr Krzysztof Żukowski wykorzystał reakcję chemii „click” do syntezy kowalencyjnych koniuatów hemina - G-kwadrupleks, przy czym uzyskiwane wyniki porównywał z wynikami dla DNAzymów otrzymanych w reakcji amidowania. Doktorant zwiększył ilość testowanych oligonukleotydów o jeszcze jedną



sekwencję ludzkiego telomerowego DNA (HT22). W sumie prowadzono badania dla aż 14 różnych kowalencyjnych koniugatów DNA-hemina. Pan mgr Krzysztof Żukowski rozszerzył także zakres badań nad aktywnością katalityczną uzyskiwanych G-kwadrupeksów, stosując dwa fluorogenne substraty (Amplex Red, MNBDH) oraz chromogenny indykator ABTS. Z sukcesem dokonano pełnej charakterystyki adduktów, wyznaczając profile topnienia, wartości pKa heminy oraz określając topologię G-kwadrupeksów. To bardzo kompleksowe badania, które wymagały od Doktoranta zapewne dużego nakładu pracy. Niemniej, to właśnie ze względu na ich kompleksowość mają one bardzo dużą wartość naukową.

Dla wszystkich DNAzymów najwyższą aktywność katalityczną miały koniugaty z heminą przyłączoną najkrótszym badanym łącznikiem (heksylowym). Biorąc pod uwagę pozycję przyłączenia heminy, miała ona również duży wpływ na aktywność peroksydazową, która była najwyższa dla modyfikacji oligonukleotydu na końcu 5'. Efekty te były niezależne od sekwencji. Koniugaty otrzymane na drodze reakcji chemii „click” wykazywały znacznie niższą aktywność. Niemniej w moim przekonaniu nie można wnioskować, że jest to związane z metodą syntezy, a raczej z właściwościami i strukturą koniugatów. Otrzymane przez Doktoranta wyniki pozwalają na stwierdzenie, że równoległe G-kwadrupeksy tworzą DNAzyny o wyższej aktywności peroksydazowej, co wynika m.in. z ich wyższej stabilności temperaturowej. Spośród trzech badanych sekwencji oligonukleotydowych, DNAzyny zawierające w swej strukturze CatG4 wykazywały niezależną od warunków kationowych aktywność, co jest bardzo cennym wynikiem, ponieważ dzięki temu może zwiększyć się potencjał zastosowania tych związków w bioanalizie. DNAzyny oparte na sekwencji HT22 miały inne tendencje w aktywności katalitycznej w porównaniu do sekwencji CatG4 oraz PS2.M. Według Doktoranta jest to m.in. efekt różnic w aranżacji nici, tworzących strukturę mniej korzystną do oddziaływań między kwadrupeksem, a heminą. Niemożliwe było jednak znalezienie ścisłych korelacji między topologiami G-kwadrupeksów, pKa, stabilnością temperaturową, a aktywnością katalityczną układów opartych na sekwencji HT22. Co więcej, koniugaty HT22-hemina wykazywały zbliżone tendencje aktywności peroksydazowej dla wszystkich trzech wykorzystywanych substratów, co dowodzi ich mniejszej selektywności w porównaniu z koniugatami CatG4 oraz PS2.M.

Kolejny rozdział Pan mgr Krzysztof Żukowski poświęcił opisowi badań wykorzystujących właściwości półprzewodnikowych kropek kwantowych do generowania reaktywnych form tlenu w układach kropka kwantowa - DNAzym. Głównym celem tego etapu badań była ocena aktywności katalitycznej układu, jak również określenie jaki wpływ na polidispersyjność, stabilność i zdolność katalityczną ma kowalencyjna modyfikacja powierzchni kropki kwantowej za pomocą DNAzemu. Z tego względu Doktorant po raz pierwszy zaprojektował i zsyntezował aktywowany światłem DNAzym (oparty na sekwencji CatG4) o aktywności oksydazy w reakcji z udziałem reaktywnych form tlenu generowanych przez kropkę kwantową. Z powodzeniem dokonał pełnej charakterystyki układu z wykorzystaniem różnych technik instrumentalnych. Wyniki badań pozwoliły na potwierdzenie utworzenia G-kwadrupeksu o topologii równoległej w obecności kationów potasu, przy czym aktywność oksydacyjna była wyższa dla układów, w których DNAzyny były kowalencyjnie związane z powierzchnią kropek kwantowych. Co więcej, układy te katalizowały reakcję utlenienia substratu Amplex Red z udziałem reaktywnych form tlenu generowanych przez kropki kwantowe. Reakcja indukowana jest światłem, bez udziału nadtlenku wodoru, co jest niewątpliwą zaletą. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są bardzo ważne ze względu na możliwość wykorzystania koniugatów kropka kwantowa - DNAzym w opracowaniu sensorów na antyoksydanty będące neutralizatorami wolnych rodników tlenowych lub też aptasensorów.



Przedstawione wyniki badań stanowią spójną całość. Widać wyraźnie, że cała praca badawcza poświęcona była jednemu zagadnieniu, przy czym badania te prowadzono bardzo szeroko i kompleksowo, wykonując żmudną pracę o charakterze badań podstawowych (tak niezbędną w pracy młodego naukowca). Są to duże zalety ocenianej rozprawy doktorskiej, świadczące o dojrzałości Doktoranta jako młodego naukowca. Podkreślić należy także, że dyskusja wyników jest klarowna, poprawna i ciekawa. Wyniki uzyskane przez mgr. Krzysztofa Żukowskiego niewątpliwie mają elementy nowości naukowej. Większość z nich została już opublikowana w trzech artykułach naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Molecular Sciences*, *Open Chemistry*, *Molecules* (w jednej z nich jest pierwszym autorem). Doktorant jest współautorem jeszcze jednej publikacji (*Cancer Biomarkers*). Sumaryczny IF tych prac wynosi około 16, co jest bardzo dobrym wynikiem biorąc pod uwagę dorobek naukowy do pracy doktorskiej. Pan mgr Krzysztof Żukowski uczestniczył w realizacji projektu Harmonia finansowanego ze środków NCN, ma zatem doświadczenie w realizacji grantów badawczych. Część badań w ramach Jego pracy doktorskiej została zrealizowana we współpracy z naukowcami ze znanych ośrodków badawczych, tj. Kyushu Institute of Technology (Japonia) oraz Leibniz Institute of Photonic Technology (Niemcy), co świadczy o umiejętności współpracy naukowej Doktoranta. W moim przekonaniu Pan mgr Krzysztof Żukowski jest młodym naukowcem, mającym potencjał do dalszego rozwoju naukowego.

Do najważniejszych osiągnięć ocenianej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- przeprowadzenie bardzo kompleksowych i systematycznych badań dla DNAzymów ze związaną cząsteczką heminy, otrzymanych w wyniku reakcji amidowania i „click”; badania te pozwoliły na znalezienie zależności aktywności peroksydazowej od pozycji przyłączenia heminy (największa dla 5'), długości łącznika (najwyższa dla najkrótszego), sekwencji oligonukleotydu (najwyższa dla CatG4) względem dwóch fluorogennych substratów (Amplex Red, MNBDH) oraz chromogennego indykatora ABTS;
- wykazanie, że DNAzyny oparte na sekwencji CatG4 miały wyższą stabilność temperaturową, przyjmowały bardziej równoległe struktury oraz cechowały się wyższą aktywnością peroksydazową niż układy oparte na sekwencji PS2.M oraz HT22;
- wykazanie, że układy oparte na sekwencji HT22 cechowała mniejsza selektywność aktywności katalitycznej wobec trzech różnych substratów w porównaniu do DNAzymów opartych na sekwencji PS2.M i CatG4;
- udowodnienie, że kowalencyjne addukty wykazywały wyższą aktywność peroksydazową bez obecności kationów stabilizujących, co prawdopodobnie pozwoli na zwiększenie ich stosowności;
- udowodnienie, że kowalencyjne przyłączenie oligonukleotydu do powierzchni kropki kwantowej zwiększa aktywność peroksydazową DNAzymu wobec wolnych rodników tlenowych generowanych z udziałem kropek kwantowych;
- zastosowanie układu kropka kwantowa - DNAzym jako efektywnego systemu o aktywności oksydacyjnej indukowanej światłem.

Uwagi szczegółowe

Pan mgr Krzysztof Żukowski popełnił liczne błędy językowe i edytorskie (m.in. tzw. literówki). Zazwyczaj są one nieistotne dla meritum pracy, niemniej w tym wypadku ich ilość niekiedy utrudniała czytanie pracy. Jednym z zadań recenzenta jest wskazanie wątpliwości, o których wyjaśnienie poproszę Doktoranta w trakcie publicznej obrony. Pozwolę sobie uczynić to poniżej:



- rysunki 29 A, 32 A, D: dlaczego nie zamieszczono zdjęcia płytek TLC z wykonania analiz próbek? Zamieszczanie trzech dokładnie takich samych, schematycznych rysunków płytek w mojej opinii nie ma sensu i nie jest bynajmniej żadnym wynikiem; Doktorant pisze: „analiza HPLC mieszaniny potwierdziła rozdział wykonany metodą TLC” – według mnie w pracy doktorskiej nie przedstawiono żadnych wyników rozdziałów za pomocą TLC;
- rysunki 44-49: dlaczego na wykresach przedstawiających prędkości początkowe katalizowanych reakcji punkty pomiarowe połączone są z osią x liniami?
- w opisie rysunku 51 są błędy, m.in. na rys. 51 B nie ma pasma ujemnego dla 290 nm, dodatnie pasmo na rys. 51 F występuje przy 260 nm;
- czy Doktorant rozważał zastosowanie w swoich badaniach techniki NMR?
- czy Doktorant rozważał zastosowanie HPLC do oznaczania ilości DNAzemu związanego z powierzchnią kropek kwantowych (poprzez ilościowe oznaczenie DNAzemu pozostałego w roztworze po reakcji amidowania)? Uważam, że byłoby to podejście prostsze i tańsze w porównaniu do elektroforezy żelowej oraz nanocząstek magnetycznych. Jakie jest zdanie Doktoranta w tej kwestii? Mogłaby to też być technika uzupełniająca do tych, które zostały zastosowane w pracy;
- Doktorant kilkakrotnie podkreśla, że najwyższą aktywność katalityczną miały koniugaty z heminą przyłączoną najkrótszym, heksylowym łącznikiem; jestem ciekawa opinii Doktoranta czy efekt ten na pewno jest tylko efektem długości łącznika, czy wpływ na aktywność będzie też miała jego struktura (która jest zupełnie inna w przypadku każdego ze stosowanych koniugatów);
- zastosowanie DLS (porównanie rozmiarów nanocząstek, str. 204): czy w związku z uzyskanymi przez Doktoranta wynikami, sądzi on że technika ta jest przydatna w tego typu badaniach?

Chciałabym podkreślić, że powyższe uwagi i pytania mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają w żaden sposób wartości pracy i zaprezentowanych w niej wyników badań Pana mgr. Krzysztofa Żukowskiego.

Wniosek końcowy

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że cele pracy Pana mgr Krzysztofa Żukowskiego zostały zrealizowane, wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są bardzo wartościowe i mają elementy nowości naukowej. Praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 ust. 1 i 2). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr. Krzysztofa Żukowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Studzinska