

Dr hab. Anna Pasternak, prof. IChB PAN

Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych

tel. 61 852 85 03, fax. 61 852 05 32

e-mail: apa@ibch.poznan.pl

Poznań, 10 maj 2019

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Świtalskiej
pt. "Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe oparte na strukturze G-kwadrupleksu, ich
charakterystyka i oddziaływanie z monowarstwą Langmuira"

Przekazana do recenzji praca doktorska mgr Angeliki Świtalskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka w Pracowni Chemii Bioanalitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

Celem badań prowadzonych przez mgr Angelikę Świtalską było zaprojektowanie i charakterystyka spektralna fluorescencyjnych sond do detekcji jonów potasu z wykorzystaniem techniki Langmuira z udziałem monowarstwy lipidowej. Sondy oparte były na strukturze dwóch znanych z literatury oligonukleotydów DNA tworzących G-kwadrupleksy.

Badania opisane w ramach przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej doskonale wpisują się w światowe trendy projektowania i tworzenia fluorescencyjnych sond molekularnych o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym. Obecnie biosensory są coraz częściej wykorzystywane do wykrywania fizjologicznie ważnych analitów w próbkach biologicznych takich jak krew, osocze, mocz czy ślina. Sondy fluorescencyjne mogą służyć do detekcji szerokiego spektrum związków, pomagając w badaniach przesiewowych, diagnostyce i monitorowaniu stanów chorobowych oraz ocenie skuteczności danej terapii. Niewątpliwie, biosensory stają się niezwykle ciekawą alternatywą dla aktualnie wykorzystywanych technik analitycznych, umożliwiając szybkie monitorowanie docelowych substancji w czasie rzeczywistym.

Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim, liczy w sumie 328 stron i podzielona jest na trzy zasadnicze części tj. część literaturową, część eksperymentalną oraz rozdział zawierający wyniki i dyskusję. Na początku pracy umieszczony jest wykaz skrótów i symboli, natomiast cel pracy znalazł swoje miejsce

po części literaturowej i poprzedza część eksperymentalną rozprawy. Co ciekawe, streszczenie oraz jego odpowiednik w języku angielskim znalazły się na samym końcu pracy, tuż przed spisem literatury. Takie umiejscowienie streszczenia jest dla recenzenta nieco zaskakujące, ale być może wynika z ogólnie przyjętych standardów układu prac doktorskich na Wydziale Chemii UAM.

Część literaturowa stanowi dobry przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień niezbędnych do zrozumienia dalszej części pracy. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka omawia budowę G-kwadrupeksów, metody ich analizy oraz naturalne występowanie w komórkach żywych. Nie zabrakło również wprowadzenia w tematykę fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych oraz podstaw syntezy nanoklasterów srebra na matrycach oligonukleotydowych wraz z ich zastosowaniem. Część literaturową wieńczy wyczerpujące omówienie zagadnienia monowarstw Langmuira pod kątem zarówno fizycznych podstaw techniki, metod ich tworzenia oraz analizy jak i wykorzystania jako modelu błony komórkowej. Niestety, pomimo silnego zaplecza merytorycznego, ta część pracy pod względem edytorskim rozczarowuje. Część literaturowa sprawia wrażenie napisanej bez odpowiedniej staranności, zawiera liczne literówki, błędy stylistyczne, składniowe oraz fleksyjne, niejednokrotnie wynikające zapewne z bezpośredniego, dosłownego tłumaczenia zdań anglojęzycznych oraz niepotrzebne zapożyczenia z języka angielskiego takie jak chociażby G-kwadrupeksy „intra-” oraz „intermolekularne” zamiast „wewnątrz-” oraz „międzycząsteczkowe”, „immunosystem” zamiast „układ immunologiczny” czy też „sekwencje flankujące” zamiast „sekwencje zamykające/otaczające”. Oczywiście przy tak obszernym opracowaniu pisemnym nie sposób uniknąć pewnych błędów, jednak praca jest nimi wręcz przesycona. Z pewnością można by było dużą część literówek i błędów wyeliminować na etapie dodatkowych korekt, co poprawiłoby znacząco odbiór tekstu przez czytelnika. Mam również zastrzeżenia do używania nie zawsze poprawnego nazewnictwa. Dla przykładu wymienię jedynie parę przypadków obrazujących znalezione niedociągnięcia:

- (i) str. 22, zasady azotowe, które weszły już powszechnie do języka potocznego, bardziej elegancko można by było nazwać zasadami heterocyklicznymi;
- (ii) termin „absorpcja” jest niejednokrotnie w rozprawie doktorskiej nieprawidłowo użyty i powinien zostać zastąpiony terminem „absorbancja”;
- (iii) str. 44, Doktorantka posłużyła się określeniem „kręgosłup G-kwadrupeksu”, które znacznie lepiej zastąpić „szkieletem” lub „rdzeniem G-kwadrupeksu”;
- (iv) str. 54, „jednoniciowe oligonukleotydy” powinny być zastąpione po prostu oligonukleotydami, gdyż są one zawsze jednoniciowe – mogą oczywiście tworzyć struktury wewnątrzcząsteczkowe lub oddziaływać na zasadzie samokomplementarności, niemniej jednak nadal jeden oligonukleotyd to jedna nić niezależnie od oddziaływań, w jakie zostaje uwikłany;
- (v) str. 55, Doktorantka pisząc „Potas jest także niezbędny do hamowania krzepnięcia trombiny” miała raczej na myśli krzepnięcie krwi (?);
- (vi) str. 60, LNA to nie „zablokowane kwasy nukleinowe” a raczej kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy;
- (vii) str. 64, Rys. 12 I, traktowanie β -pirenylonukleozydu jako rodzaju modyfikacji 2'-deoksyrybozy jest dla recenzenta dosyć kontrowersyjnym podejściem;

- (viii) str. 66, niepoprawna numeracja atomów pirymidyny (N5), deazapuryny (N7) oraz puryny (N8);
- (ix) str. 74, monomer cytozyny DNA powinien zostać nazwany 2'-deoksycytydyną;
- (x) „niedopasowane pary zasad”, o których wspomina Doktorantka na str. 75 to zwyczajowo „niesparowania”.

Jakość rysunków oraz wzorów strukturalnych oceniam dosyć wysoko, chociaż i tutaj zdarzyło się parę pomyłek. Pomimo licznych błędów, bezdyskusyjnym pozostaje fakt, iż część literaturowa przedstawiona w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowi dobry wstęp do omówienia wyników badań własnych, napisany w sposób rzeczowy. Zapoznanie się z tą częścią rozprawy bez wątpienia stanowi dla czytelnika ułatwienie w analizie i interpretacji wyników zawartych w dalszej części pracy.

Kolejną ważną częścią rozprawy doktorskiej jest część eksperymentalna. Doktorantka w sposób szczegółowy opisała sposoby przygotowywania wykorzystywanych w eksperymentach roztworów bazowych, źródło pochodzenia oligonukleotydów, sposób ich oczyszczania oraz weryfikacji stopnia czystości. Pewien niedosyt pozostawia opis pomiaru krzywych topnienia z wykorzystaniem metody UV. Prosiłabym Doktorantkę, aby podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej rozszerzyła informacje na temat metodyki tych badań o podanie ilości krzywych uzyskanych dla danego oligonukleotydu oraz zakresu wielkości błędów, jakimi obarczone były podane w tabelach wartości T_m . Dodatkowo, ponieważ szybkość zmiany temperatury podana w części eksperymentalnej wyniosła aż $1^\circ\text{C}/\text{min}$, prosiłabym o zaprezentowanie przykładowych krzywych topnienia zarejestrowanych w przypadku podgrzewania oraz chłodzenia próbki i komentarz na temat obserwowanego zjawiska histerezy w odniesieniu do otrzymywanych w ten sposób wyników – w jakim celu pomiar wykonywany był w obydwu kierunkach? Dlaczego obserwujemy zjawisko histerezy oraz jak wpływa ono na otrzymane dane? Które z krzywych posłużyły do wyznaczenia wartości T_m zamieszczonych w tabeli?

Najistotniejszą część pracy stanowi omówienie wyników badań własnych. W powyższej części rozprawy Doktorantka wyczerpująco i rzeczowo przedstawia rezultaty swoich badań. Sposób, w jaki zostały opisane otrzymane wyniki świadczy o dużej wiedzy mgr Angeliki Świtalskiej w tej tematyce. W rezultacie szeregu doskonale zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka zaprojektowała cztery rodzaje sensorów, tj. sondy typu FRET, znakowane pirenem, znakowane 5-(1-etynylopirenylo)-2'-deoksyurydyną oraz nanoklastery srebra, a następnie z sukcesem:

- określiła stabilność poprzez wyznaczenie temperatur topnienia sond;
- scharakteryzowała zmiany strukturalne badanych sond z wykorzystaniem spektroskopii UV, dichroizmu kołowego oraz spektroskopii fluorescencyjnej;
- określiła selektywność sond względem jonów Na^+ oraz K^+ ;
- przetestowała sondy w warunkach zbliżonych do komórkowych;

- określiła zachowanie sond na granicy faz woda/powietrze;
- oszacowała użyteczność sond do konstrukcji sensorów poprzez charakterystykę filmów Langmuira-Blodgett.

Wyniki powyższych analiz wyraźnie pokazały potencjał wykorzystania struktur G-kwadrupleksowych znakowanych fluorescencyjnie do monitorowania zmian stężenia jonów potasu. Dodatkowe zastosowanie kotwicy cholesterolowej było natomiast prostym, lecz nader skutecznym sposobem na wbudowanie badanych sond w błonę komórkową, przez co wykorzystanie sond jako biosensorów zyskało wymiar nie tylko czysto poznawczy, ale skutecznie zbliżyło się do realnych możliwości ich biomedycznego zastosowania. W moim odczuciu na szczególną uwagę zasługuje interdyscyplinarność przedstawionych w rozprawie doktorskiej badań. Doktorantka nie tylko przeprowadziła na zaprojektowanych sondach olbrzymią ilość eksperymentów mających na celu ich szczegółową charakterystykę, ale również poszła o krok dalej, przekazując wybrane sensory do badań biologicznych i sprawdzając ich potencjał w środowisku komórkowym. Takie wielotorowe podejście do zadanego problemu badawczego czyni pracę niezwykle interesującą.

Niestety również w powyższej części rozprawy doktorskiej znajduje się mnóstwo błędów stylistycznych oraz literówek, co powoduje, że praca sprawia wrażenie niestarannie napisanej. Poniżej wymienię jedynie parę przykładów:

- str. 214, operowanie skrótami: „Insert na (Rys. 76B) przedstawia zależności int. fluorescencji(...)”; „Profil (...) wykazuje spadek int. fluorescencji (...) natomiast profil F483 vs T do temp. 45,0 °C (...)”;
- str. 214, literówki: „Eksperyment ten wskazuje, że po stopnienia struktury dsDNA(...)”, str. 245, „tymin” (w domyśle tymina);
- str. 172, błędna nazwa: F-TBA-T/Na⁺ (powinno być F-Tel21-T/Na⁺);
- str. 260, błąd składniowy w zdaniu rozpoczynającym podrozdział: „Dane literaturowe określające parametry termodynamiczne, które charakteryzują oddziaływanie jonów Ag⁺ z różnymi polimorficznymi strukturami DNA (nici bogate w cytozynę, dupleks, i-motyw, G-kwadrupleks).”;
- str. 260, wielokrotne błędy gramatyczne/fleksyjne: „Stwierdzono, że matrycę oparte na intramolekularnych G-kwadrupleksów o topologii antyrównoległej powodują uzyskanie AgNCs o wyższej intensywności wydajności fluorescencji w porównaniu z G4 DNA o topologii równoległej i hybrydowej.”; str. 283 „(...) można stwierdzić, że obecności znaczników (...) destabilizuje (...) natomiast ugrupowanie cholesterolowego wpływa pozytywnie (...)”.

Pomijając niedoskonałości językowe rozprawy doktorskiej, nie udało się również uniknąć pewnych nieścisłości. Na przykład, opis dotyczący podstaw techniki wyznaczania temperatur topnienia struktur tworzonych przez kwasy nukleinowe, pomimo wysoko ocenianej przez recenzenta szczegółowości i poprawności merytorycznej ogranicza się jedynie do cząsteczek DNA. Zapewne wynika to z faktu,

iż Doktorantka w ramach swojej pracy doktorskiej pracowała wyłącznie z tego typu cząsteczkami. Jednak nie sposób oprzeć się wrażeniu, że takie ograniczenie sugeruje, że cząsteczki RNA zachowują się podczas topnienia UV w sposób odmienny. Wydaje się więc, że przedstawiony, rzeczowy opis byłby pełniejszy bez podkreślania zachowania struktur DNA i opisanie tej techniki jako bardziej uniwersalnej, dotyczącej zarówno DNA jak i RNA. Przy okazji chciałabym zwrócić uwagę na niezwykle ważny aspekt wyboru odpowiedniego buforu do topnień UV, jaki został wspomniany i poprawnie opisany przez Doktorantkę w tej części pracy, co stanowiło dla mnie bardzo miłe zaskoczenie. Przed rozpoczęciem odpowiednich pomiarów należy uwzględnić pKa buforu, pojemność buforową, kompatybilność z jonami metali oraz zależność wartości pH od zmian temperatury i widać dokładnie, że Doktorantka miała tego pełną świadomość. Niestety jest to nadal rzadko spotykane wśród naukowców zajmujących się badaniami trwałości termodynamicznej kwasów nukleinowych i do dnia dzisiejszego istnieje szereg publikacji, w których można spotkać Tris-HCl jako bufor (nieśluszenie) używany do pomiarów termodynamicznych.

Nieścisłość wkradła się również do wyników prezentowanych w Tabeli 9 na str. 151. Bardzo pomocne dla czytelnika jest oznaczenie wartości niewiarygodnych, jednak nie mogłam nigdzie odszukać informacji, na czym polega owa niewiarygodność? Ponadto, nieco dziwne wydaje się przypisanie do wartości T_m równej 69 °C komentarza „brak T_m ”. Zakładam jednak, że to kolejna literówka/błąd edytorski.

W podrozdziale 14.3.2 Doktorantka opisuje spektroskopię dichroizmu kołowego, jako sposób na „sprawdzenie czy obecność znaczników nie przeszkadza w formowaniu się struktury G-kwadrupleksu”. W tym przypadku jednak poprawniejsze byłoby opisanie metody CD, jako sposobu analizy wpływu znaczników na ewentualne zmiany w topologii fałdowania G-kwadrupleksu. Wpływ modyfikacji na samo formowanie się struktury został bowiem sprawdzony poprzez analizę krzywych topnienia i wartości temperatur topnienia badanych cząsteczek.

Podobnie, w podrozdziale 15.3.2 przy opisywaniu pasm charakterystycznych dla dupleksów wkradła się pewna nieścisłość w przypisaniu „wszystkim” dupleksom dodatniego pasma przy około 260-280 nm oraz ujemnego około 245 nm. W tym wypadku zabrakło mi rozróżnienia charakterystycznych kształtów widm CD w odniesieniu do różnorodnych geometrii (A, B, Z), jakie mogą przyjmować struktury helikalne.

W rozdziale 16.3 umieszczono Tabelę 15 zawierającą wartości temperatur topnienia dla G-kwadrupleksów Tel22C12. Niezrozumiałym jest dla mnie brak danych dla Tel22C12-AgNCs w obecności jonów sodu, pomimo, że krzywa odpowiadająca takiemu układowi jest zaprezentowana na str. 249 (Rys. 104B, żółta krzywa).

Ponadto, mam również parę uwag oraz pytań dotyczących części wyników. Prosiłabym więc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony pracy doktorskiej:

1. Analiza sekwencji znajdującej się na Rys. 31C (str. 146) pokazuje, że w przypadku oddziaływania z sekwencją przedstawioną na Rys. 31D oraz 31E tworzą się trzy niesparowania – jaka jest ich rola? Dlaczego nie użyto w pełni komplementarnej sekwencji?
2. Doktorantka omawiając profile topnienia pokazane na Rys. 34 (str. 150) przypisuje efekt hiperchromowy, obserwowany w zakresie temperatur 55-90°C, rozplataniu struktury duplexu. Nie można tego wykluczyć, natomiast w profilu występuje również drugi efekt hiperchromowy w zakresie 10-30°C (Rys. 34A, krzywa żółta oraz zielona). Czy wiadomo zatem jak wytłumaczyć nietypowe zachowanie krzywej w tym rejonie?
3. Ciekawa obserwacja dotycząca wpływu kotwicy cholesterolowej na stabilność G-kwadrupleksu (wzrost T_m o 16 °C w obecności jonów K^+ oraz o 5 °C w obecności jonów Na^+ , str. 153). Czy wiadomo, z czego wynika aż tak duża rozbieżność w efektach stabilizacyjnych w wymienionych warunkach solnych?
4. Na podstawie widm przedstawionych na Rys. 43 i 44 Doktorantka sugeruje, że obecność dodatkowej 16-merowej sekwencji oraz układu dsDNA negatywnie wpływa na tworzenie G-kwadrupleksów. Natomiast analiza porównawcza wartości T_m nie wykazuje znaczącej zmiany stabilności pomiędzy G-kwadrupleksami zawierającymi FAM, FAM z dodatkową sekwencją czy też z układem helikalnym (T_m wynosi odpowiednio 38°C, 38°C oraz 37°C). Jak można zatem wytłumaczyć rozbieżność we wnioskach wyciągniętych na podstawie analizy T_m oraz widm emisji dla 16-F-TBA-T/Ch16'?
5. Na podstawie widm CD przedstawionych na Rys. 88 A-D (str. 227) Doktorantka przypisuje topologię typu „koszyk” cząsteczkom G4 DNA w obecności jonów sodu, natomiast topologię hybrydową wszystkim cząsteczkom G4 DNA w obecności jonów potasu, wskazując charakterystyczne pasmo przy 270 nm. Czy krzywa CD dla Tel22-Tpy w Na^+ (Rys. 88A) nie wskazuje bardziej na topologię hybrydową? Czy w przypadku pozostałych cząsteczek G4 DNA w obecności K^+ topologia nie jest inna niż hybrydowa? Na Rys. 88 B-D trudno dostrzec jakiegokolwiek pasmo przy 270 nm w widmach otrzymanych w buforze zawierającym jony K^+ .
6. Pewną trudność sprawiło mi dopatrzenie się wartości T_m zawartej w tabeli 15 dla Tel22C12 w obecności jonów sodu na Rys. 104 A oraz 104B (str. 249). W trakcie publicznej obrony prosiłabym o zaprezentowanie tych krzywych rejestrowanych w obydwu długościach fali wraz z pierwszą pochodną oraz wyznaczonymi wartościami T_m (38°C oraz 36°C). Co Doktorantka rozumie przez „pozorne dsDNA”?
7. Analiza Rys. 121 (str. 269) wskazuje, że fluorescencja ulega wygaszaniu zarówno w obecności jonów Na^+ jak i K^+ , z tym, że K^+ wycisza fluorescencję wydajniej. Skoro jony Na^+ również wyciszają fluorescencję, czy jest możliwe odróżnienie w środowisku komórkowym czy wyciszenie na danym poziomie nastąpiło pod wpływem np. niskiego stężenia jonów K^+ czy też wysokiego stężenia jonów Na^+ ? Podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym Doktorantkę o dyskusję w świetle oceny realnej użyteczności takiej sondy.
8. Zamieszczone na stronach 274 i 275 widma fluorescencji nanoklasterów srebra Tal22C12-AgNCs na granicy faz woda/powietrze skłoniły Doktorantkę do wyciągnięcia wniosku, iż badany układ ma

znaczenie diagnostyczne. Dlaczego więc nie włączono nanoklasterów do badań z użyciem linii komórkowej HeLa?

Na koniec pragnę wyraźnie zaznaczyć, że przedstawione powyżej komentarze i uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Świtalskiej. W przedłożonej do recenzji pracy zaprezentowane zostały interesujące wyniki badań, które doprowadziły do ciekawych i oryginalnych wniosków. Rozbudowana i rzeczowo omówiona część opisująca otrzymane rezultaty wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w tym obszarze nauki. Dlatego stwierdzam z pełnym przekonaniem, iż rozprawa doktorska mgr Angeliki Świtalskiej odpowiada wymogom stawianym przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie mgr Angeliki Świtalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na oryginalność badań oraz ich interdyscyplinarny charakter zwracam się również do Rady Wydziału Chemii UAM z wnioskiem o wyróżnienie powyższej pracy doktorskiej.

Alex Pasternak