

Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Żukowskiego zatytułowanej
Modyfikowane DNAzyny o aktywności peroksydazowej. Otrzymywanie, właściwości oraz
zastosowanie bioanalityczne

Praca doktorska mgr Krzysztofa Żukowskiego zatytułowana „Modyfikowane DNAzyny o aktywności peroksydazowej. Otrzymywanie, właściwości oraz zastosowanie bioanalityczne” powstała w Zakładzie Chemii Bioanalitycznej kierowanym przez profesora Bernarda Juskowiaka. Promotorem pomocniczym rozprawy była dr Joanna Kosman. Praca ma charakter klasycznej rozprawy doktorskiej i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu dysertacji. Jak podano na wstępie, część wykonanych badań została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu badawczego Harmonia, a także we współpracy z Kyushu Institute of Technology oraz Leibniz Institute of Photonic Technology.

Dla mnie najciekawsza część rozprawy dotyczy prezentacji wyników uzyskanych przez Doktoranta. Nie mniej należy podkreślić, że część literaturowa rozprawy doktorskiej została bardzo interesująco przedstawiona. Jest rodzajem wstępu do badań prowadzonych przez Doktoranta. Jest bardzo szczegółowa i doskonale wprowadza w badania Doktoranta.

Jak pisze Doktorant celem podjętych badań „*było otrzymanie, charakterystyka fizykochemiczna oraz zbadanie aktywności peroksydazowej zmodyfikowanych układów G-kwadrupeks/hemina*” Tak postawiony cel rozprawy doktorskiej został z powodzeniem osiągnięty. Doktorant opracował trzy metody przygotowania koniugatów oligonukleotydów i heminy. Pierwsza opierała się na kondensacji oligonukleotydu zawierającego łącznik aminoheksylowy z heminą, druga związana była z podejściem typu „*click chemistry*” i użyciem odpowiednich pochodnych oligonukleotydów i heminy, a trzecia metoda opierała się o wykorzystanie, jako nośników koniugatów, kropek kwantowych. Doktorant otrzymał trzy grupy koniugatów oparte o wykorzystanie oligodeoksynukleotydów oznaczonych symbolami PS2.M, CatG4 i HT22. Szczególnie interesujący był ten ostatni, będący fragmentem ludzkiego telomerowego DNA. Dla kilku koniugatów otrzymał także ich analogii różniące się długością i charakterem łącznika pomiędzy oligonukleotydem i heminą. Dla większości koniugatów hemina

była przyłączana do końca 5' oligonukleotydu, ale otrzymał także koniugaty z hemina ułożoną na końcu 3' i w środku oligonukleotydu DNA. Otrzymane w ten sposób koniugaty oligonukleotydów i heminy zostały bardzo wnikliwie i szeroko zbadane wieloma metodami fizykochemicznymi. Przeprowadzone badania miały na celu głównie określenie zdolności tworzenia przez oligonukleotydy struktur G-kwadrupeksów, a także zbadanie wpływu szeregu kationów na tworzenie przez G-kwadrupeksy struktur równoległych i antyrównoległych. Ponieważ kationy potasowy, sodowy i amonowy mają znaczący wpływ na tworzenie struktur G-kwadrupeksów, Doktorant skupił się na tych jednowartościowych kationach oraz układach zawierających równocześnie dwa tego typu kationy. Przeprowadził również bardzo obszerne badania trwałości termodynamicznej struktur kwadrupeksowych tworzonych przez koniugaty oligonukleotyd/hemina. Dla większości badanych układów przyłączenie heminy stabilizowało strukturę G-kwadrupeksu, przy czym w obecności kationów potasowych trwałość termodynamiczna była zdecydowanie wyższa niż sodowych. Do określenia trwałości termodynamicznej stosował metodę topnienia struktur kwadrupeksowych, w których proces przejścia kwadrupeksu w formę jednoniciową monitorował za pomocą zmian widm dichroizmu kołowego (CD) oraz w zakresie ultrafioletu (UV). Dla określenia potencjału aktywności peroksydazowej koniugatów oligonukleotyd/hemina wyznaczył także wartości dysocjacji (pKa) heminy. Przyłączenie heminy do oligonukleotydu tworzącego G-kwadrupeks w różnym stopniu zmieniało wartości pKa heminy. Duże wrażenie robi zakres różnego typu metod spektralnych zastosowanych przez Doktoranta, aby określić cechy strukturalne i funkcjonalne badanych koniugatów. Na pewno wiedza na ten temat, uzyskana pod kierunkiem profesora Juskowiaka, będzie procentować w badaniach prowadzonych na różnych etapach dalszej pracy naukowej Doktoranta.

Doktorant otrzymał i badał 14 różnych koniugatów oligonukleotydów i heminy. Każdy z nich badany był w kilku różnych warunkach jonowych, dla części także w obecności dwóch różnych surfaktantów. Jak przypuszczam, w konsekwencji przebadanych zostało blisko 100 układów, w których testowane oligonukleotydy DNA mogły tworzyć koniugaty zawierające G-kwadrupeksy.

Ostatnim etapem całego cyklu badań było określenie aktywności peroksydazowej wybranych koniugatów oligonukleotyd/hemina. Doktorant stosował trzy układy do badania aktywności peroksydazowej koniugatów. Były to układy oparte o fluorogenne układy Amplex Red i MNBDH oraz chromogeny substrat ABTS. Do badania aktywności peroksydazowej wybrano jedynie te koniugaty, dla których wcześniejsze badania strukturalne i fizykochemiczne sugerowały uzyskanie ich dużej aktywności. Pomiar aktywności peroksydazowej

przeprowadzony był metodami spektroskopowymi. Generalnie, uzyskane wyniki wykazywały znaczące zależności aktywności peroksydazowej koniugatu od rodzaju użytego oligonukleotydu i jego zdolności tworzenia G-kwadrupeksu, a także od sposobu połączenia oligonukleotydu i heminy oraz od warunków kationowych prowadzonych analiz. Szczególną aktywnością peroksydazową wyróżniały się koniugaty oznaczone symbolami: 5P3, 5C3 i 5H3. Dla wszystkich trzech koniugatów sposób połączenia heminy i oligonukleotydu był taki sam, poprzez łącznik aminoheksylowy na końcu 5', a jedynie różne były sekwencje oligonukleotydów tworzących G-kwadrupeks. Koniugaty oparte o kropki kwantowe nie do końca spełniły pokładane w nich nadzieje. Koniugaty oligonukleotydów i kropek kwantowych są układami bardzo trudnymi i mało poznanymi, dlatego nawet nie do końca udane eksperymenty są bardzo cenne.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta są niezwykle rozległe i wnikliwe. Badane koniugaty są bardzo wrażliwe na warunki, w jakich prowadzone były eksperymenty, stąd często niewielka ich zmiana prowadziła do odmiennych wyników. W takich przypadkach Doktorant starał się wyjaśnić przyczyny obserwowanych różnic. Wszystkie eksperymenty przeprowadzone przez mgr Żukowskiego zostały wykonane poprawnie i przedstawienie otrzymanych wyników jest przekonujące.

Moje uwagi mają charakter bardzo ogólny i są rodzajem „włożenia kija w mrowisko”, aby sprowokować Doktoranta do wyrażenia swoich opinii. Prosiłbym Doktoranta, aby podczas publicznej obrony swojej rozprawy doktorskiej odniósł się do następujących zagadnień:

1/ w części literaturowej pracy doktorskiej mgr Żukowski omawia wykorzystanie koniugatów oligonukleotyd/hemina głównie do detekcji DNA, białek i kationów. Są to metody detekcji w układach pozakomórkowych. Czy doktorant widzi możliwość wykorzystania badanych koniugatów w układach komórkowych? Czy badane koniugaty w warunkach komórkowych utworzyłyby G-kwadrupeksy?

2/ w swojej recenzji nie użyłem ani razu określenia „DNAzym” dla badanych przez Doktoranta koniugatów. Rozumiem, że termin DNAzym wprowadzili wcześniej inni autorzy prowadzący podobne badania. Dla mnie aktywność katalityczna rybozymów czy DNAzymów związana jest z ich częścią oligonukleotydową, dzieje się w obrębie fragmentu oligonukleotydowego. W przypadku koniugatów oligonukleotyd/hemina jest inaczej. Czy Doktorant mogłyby rozwiązać moje wątpliwości w tym zakresie i przekonać mnie, że stosowany termin „DNAzym” jest uzasadniony?

3/ Doktoranta interesował wybór optymalnego łącznika pomiędzy oligonukleotydem i heminą. Chodziło o wybór łącznika o określonej długości i charakterze oraz jego umiejscowienia w oligonukleotydzie. Doktorantowi zależało na wyborze takiego łącznika, aby oddziaływanie pomiędzy G-kwadrupleksem i heminą było optymalne dla jej aktywności peroksydazowej. Czy zdaniem Doktoranta znając strukturę G-kwadrupleksu DNA i ułożenie heminy można byłoby określić metodą symulacyjną/obliczeniową odległości obu układów i na tej podstawie zaprojektować optymalny łącznik?

Na kolejne moje uwagi Doktorant nie musi odpowiadać, ale proponuję, aby je przemyślał. Oto moje sugestie:

1/ Doktorant nagminnie używa terminu „sekwencja” dla określenia badanych oligonukleotydów. Zapewniam Doktoranta, że w swoich badaniach używał oligonukleotydów o określonej sekwencji a nie „sekwencji”, która określa jedynie kolejność reszt nukleotydowych w oligonukleotydzie.

2/ odnoszę wrażenie, że przygotowaniu rozprawy doktorskiej towarzyszył pośpiech, bo jest w niej dużo błędów edytorskich, różnych systemów zapisów tych samych rzeczy, pomyłek z numeracją schematów. To znacząco psuje estetykę rozprawy doktorskiej.

3/ z trudem przychodzi mi uwierzyć, że Doktorant zapoznał się z 553 referencjami literaturowymi zawartymi w rozprawie doktorskiej.

Reasumując, uważam, że jest to ciekawa i wartościowa praca doktorska, która wnosi dużo informacji o chemicznej syntezie, właściwościach fizykochemicznych i potencjalnym zastosowaniu dla celów bioanalitycznych koniugatów oligonukleotyd/hemina. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Krzysztofa Żukowskiego spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane ustawowo pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Krzysztofa Żukowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ryszard Kierzek

Prof. dr hab. Ryszard Kierzek