



Poznań, 06.06.2013 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: "Nowe układy bioanalityczne bazujące na DNAzymach o aktywności peroksydazowej" autorstwa Pani mgr Joanny Kosman, studentki Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

We wstępie do swojej rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanna Kosman napisała „Z momentem rozwiązania ludzkiego genomu, naukowcy odkryli mikroświat, który kryje przed nami wiele tajemnic. Znamy sekwencję jaką tworzą nukleotydy ale genom jest tak złożoną i skomplikowaną strukturą, że istnieje ogrom zakątków gdzie naukowcom nie udało się jeszcze zajrzeć”. W jeden z takich zakątków postanowiła doktorantka zajrzeć i poszerzyć naszą wiedzę w tym obszarze badań. Za główny obiekt badań wybrała DNAzyny odpowiedniki enzymów, a dokładnie mówiąc układ o aktywności peroksydazy chrzanowej, zawierającej w swojej strukturze czteroniciowe DNA i cząsteczkę heminy będącej centrum katalitycznym. Układ taki umożliwia, poprzez proces hybrydyzacji, projektowanie nowych systemów analitycznych.

Pani mgr Joanna Kosman swoje badania prowadziła w Pracowni Chemii Bioanalitycznej, na Wydziale Chemii UAM, a promotorem rozprawy był Pan profesor dr hab. Bernard Juskowiak.

Jako cel swoich badań doktorantka wytypowała następujące zagadnienia:

- Określenie wpływu wybranych parametrów środowiska reakcyjnego takich jak: rodzaj kationu towarzyszącego, rodzaj i stężenie surfaktantu, obecność czynnika zagęszczającego, rodzaj buforu, wpływ pH, czy temperatury pomiaru - na aktywność



DNAzemu w reakcji utleniania 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu (ABTS).

- Określenie topologii G-kwadrupleksu powiązanej z najwyższą aktywnością DNAzemu.
- Wyjaśnienie sposobu oddziaływania heminy z G-kwadrupleksem.
- Poznanie aktywności katalitycznej DNAzemu w reakcji utleniania wybranych substratów fluorogennych.
- Uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy DNAzemy mogą katalizować reakcję depozycji nanostruktur srebra i określenie jaki jest jej potencjał analityczny.

Tak postawione zadania wymagały przeprowadzenia szeregu eksperymentów z wykorzystaniem wielu zaawansowanych technik analitycznych, do których Doktorantka miała dostęp zarówno na Wydziale Chemii jak i podczas stażu w Institute of Photonic Technology w Jenie (Niemcy) takich jak: Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (SPR), Zlokalizowany Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (LSPR), Dichroizm Kołowy (CD) czy techniki UV-Vis i fluorescencyjne.

Rozprawa doktorska została zredagowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla tego rodzaju prac, zawarta jest na 167 stronach plus Wykaz symboli i skrótów (niestety jest on niekompletny). Kolejność rozdziałów jest poprawna i obejmują one: Wstęp, Część literaturową (podzieloną na 7 podrozdziałów), Cel pracy, Część eksperymentalną (podzieloną na 4 podrozdziały), Wyniki i dyskusję, Streszczenie i Spis cytowanej literatury obejmujący 187 pozycji. W części obejmującej przegląd literatury Doktorantka szczegółowo omawia wszystkie zagadnienia związane z biologicznym znaczeniem G-kwadrupleksów, ich budową oraz metodami badań. Omówiła również właściwości, budowę i aktywność katalityczną DNAzymów o aktywności peroksydazy chrzanowej.

Osobny podrozdział poświęcony jest telomerazie. W kolejnym (siódmym) podrozdziale Kandydatka opisała szczegółowo zagadnienia związane z zastosowaniem DNAzymów o aktywności peroksydazy w bioanalityce, z akcentem położonym na najnowsze doniesienia literaturowe. Sposób prezentacji danych literaturowych jak i poprawnie dobrana bogata ikonografia (27 rysunków w tej części pracy) wskazują na dobre przygotowanie Doktorantki do zaplanowanych przez Nią badań i znajomość dotychczasowych osiągnięć w tej dziedzinie wiedzy.



Mając takie przygotowanie literaturowe Doktorantka zaprogramowała i przeprowadziła szereg eksperymentów, które dokładnie i wyczerpująco opisała w kolejnym rozdziale. Uzyskane wyniki pozwoliły na optymalizację układu telomerowe DNA/hemina prowadzącą do powstania DNAzymu. Szczególnie znaczenie miała tu obróbka termiczna próbki polegająca na ogrzaniu jej do 95°C i następnie szybkim schłodzeniu, co utrzymywało aktywną strukturę G-kwadrupleksu opartego na sekwencji telomerowej. Trafność doboru i określenie wpływu surfaktantów Triton X-100 i Brij 58 na aktywność peroksydazową to kolejny sukces Doktorantki. Natomiast polietylenoglikole PEG200 i PEG300 nie sprawdziły się w roli czynników zagęszczających z uwagi na efekt uboczny, jakim było spowalnianie reakcji, w wyniku utrudniania kontaktu pomiędzy reagentami.

Opracowano i przetestowano także nowe układy sensorowe z wykorzystaniem DNAzymów o aktywności peroksydazy i technik rezonansu plazmowego w tym sensor do detekcji DNA wirusa HIV z wykorzystaniem zewnętrznej sondy opartej na sekwencji PS2.M. Wszystko to pozwoliło w efekcie końcowym na opracowanie nowej bezpośredniej metody wyznaczania aktywności telomerazy w oparciu o DNAzym na bazie telomerowego DNA i zaproponowanie nowego podejścia do monitorowania reakcji indykatorowej DNAzymu. Badając wpływ wartości pH na aktywność testowanych enzymów Doktorantka zaobserwowała, że w przypadku DNAzymu PS2.M najwyższe wartości uzyskuje się w środowisku zasadowym (pH w granicach 9-10) podczas gdy oligonukleotyd o sekwencji Tel2 wykazuje najwyższą aktywność w środowisku lekko kwaśnym – pH w zakresie 5 do 7 co dobrze ilustruje rysunek 60 na stronie 118 pracy doktorskiej.

Ciekawe i wartościowe rezultaty Doktorantka uzyskała badając reakcję depozycji srebra, potwierdzając tym samym wstępne założenie, że DNAzym o aktywności peroksydazy chrzanowej ją katalizuje.

Tak więc Pani mgr Joanna Kosman w pełni zrealizowała cele jakie sobie postawiła i opisała w swojej rozprawie doktorskiej. Praca ta dobitnie świadczy, że jest Ona w pełni ukształtowanym chemikiem analitykiem, potrafiącym zdefiniować aktualne cele badań, zrealizować je i krytycznie ocenić. Praca zawiera elementy nowości naukowej, chociaż napisana jest nie zawsze poprawnym językiem przy sporej ilości błędów literowych i stylistycznych. W trakcie lektury nasunęły się pytania i uwagi, które jak sądzę znajdą odpowiedź w trakcie publicznej obrony. Przykłady podaję poniżej:



- Str. 61. Jest „złoty nanocząstek” a poprawniej było by „nanocząstek złota”
- Str. 71. Jest „opartej” i „powyższej” a poprawnie powinno być „opartych” i „powyżej”
- Str.80. Jest „dostosowano pH” bardzo niezręczne sformułowanie
- Str.87. Jest „wysuszono pod azotem” podobnie jw.
- Str.87 i dalsze: sformułowanie „kitu”, „w kicie” itp. zamiast np. „zestawu”, „w zestawie” itp.
- Str. 90. jest „próbki zwirowano” też brzmi to bardzo nieszczęśliwie.
- Str. 128. Jest „...następuje osiągnięcie maksimum fluorescencji” proponuję „obserwuje się maksimum fluorescencji”.
- Te wskazane powyżej jak i inne błędy (np. literowe czy sformułowania żargonowe) nie mają na szczęście charakteru merytorycznego i są łatwe do usunięcia, a w przyszłości należy ich unikać.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Kosman stanowi bardzo kompetentne i aktualne zarówno z punktu widzenia naukowego jak i praktycznego rozwiązanie problemu analitycznego. Cel ten Doktorantka zrealizowała w oparciu o bardzo nowoczesne i czułe metody instrumentalne. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań i duża dbałość o uwiarygodnienie wyników. Wyniki zostały częściowo upublicznione zarówno w czasopismach o międzynarodowym zasięgu (np. Anal. Chim. Acta czy Cent. Eur. J. Chem) a także poprzez komunikaty na konferencjach naukowych.

Biorąc to wszystko pod uwagę, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Joanny Kosman do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stwierdzam. Że rozprawa spełnia wszystkie wymagania stosownej Ustawy z 2003 roku o tytule i stopniach naukowych.