

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

ul Z. Noskowskiego 12/14

61-714 Poznań

Poznań, 31 maja 2013

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister Joanny Kosman zatytułowanej

***„Nowe układy bioanalityczne bazujące na DNAzymach o aktywności
peroksydazowej”***

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Joanny Kosman została wykonana w Pracowni Chemii Bioanalitycznej Wydziału Chemii UAM pod kierunkiem prof. Bernarda Juskowiaka. Rozprawa poświęcona jest opracowaniu nowych reakcji analitycznych z udziałem oligonukleotydów posiadających aktywność DNAzymów oraz próbach zastosowania ich do celów bioanalitycznych. Celem pracy mgr Kosman była optymalizacja warunków reakcji katalizowanej przez DNAzym o sekwencji telomerowej, poszukiwanie nowych fluorogennych substratów, zastosowanie których doprowadziłoby do zwiększenia czułości detekcji metod bioanalitycznych opartych o DNAzimy o aktywności peroksydazowej, oraz opracowanie nowej metody detekcji telomerazy. Telomeraza jest enzymem o aktywności polimerazy DNA zależnej od RNA, który posiada zdolność syntezy telomerów, zabezpieczając w ten sposób końce chromosomów przed ich nadmiernym skracaniem się w trakcie podziałów komórkowych. Telomeraza stanowi doskonały cel dla chemioterapii, gdyż jest to enzym aktywny w większości przypadków nowotworów, a jednocześnie nieaktywny w zdrowych komórkach. Lek, który umożliwiłby wyłączenie działania telomerazy, byłby skutecznym w przypadku różnych typów nowotworów. Metody pozwalające na szybką detekcję telomerazy w komórkach są z tych względów wysoce pożądane.

DNAzimy o aktywności peroksydazowej katalizują reakcję pomiędzy nadtlenkiem wodoru a substratem, który w wyniku reakcji indukuje sygnał analityczny. Najczęściej wykorzystuje się DNAzym zbudowany z fragmentu DNA o sekwencji PS2.M, który w

kompleksie z heminą wykazuje najwyższą aktywność peroksydazową. Sekwencja ta jest bogata w reszty guanozyny i w obecności kationów jednowartościowych przyjmuje strukturę kwadrupleksu. Kwadrupleks utworzony z oligonukleotydu o sekwencji telomerowej również tworzy kompleks z heminą, jednakże jego aktywność katalityczna jest niewielka. Poszukując optymalnych warunków dla reakcji utleniania 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu (ATBS) katalizowanej przez DNAzym o sekwencji telomerowej, mgr Kosman zbadała wpływ różnych czynników środowiska na jego aktywność. Sprawdziła między innymi zależność pomiędzy aktywnością katalityczną DNAzymów o sekwencjach PS2.M i Tel2 od typu i stężenia różnych kationów jedno- i dwuwartościowych (K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+}). Podczas gdy DNAzym o sekwencji PS2.M wykazuje najwyższą aktywność katalityczną w obecności jonów potasu i jonów amonu, aktywność DNAzymu o sekwencji telomerowej jest najwyższa w obecności mieszaniny jonów potasu i jonów magnezu lub wapnia. W celu sprawdzenia, czy zmiany aktywności DNAzymów można powiązać ze zmianą topologii kwadrupleksów, mgr Kosman posłużyła się spektroskopią dichroizmu kołowego. Analiza widm CD pokazała, że dla oligonukleotydu o sekwencji PS2.M obecność kationów dwuwartościowych (Mg^{2+} i Ca^{2+}) indukuje znaczne zmiany strukturalne, w wyniku których wzrasta populacja formy równoległej kwadrupleksu. Również w przypadku struktury o sekwencji Tel2 obecność kationów dwuwartościowych indukowała zmiany w kierunku tworzenia się formy równoległej, choć w znacznie mniejszym stopniu.

Mgr Kosman przebadła również wpływ pH na aktywność badanych enzymów. Zaobserwowała, że DNAzym o sekwencji PS2.M wykazuje najwyższą aktywność w bardziej zasadowym pH (zakres pH 9 - 10) natomiast ten o sekwencji Tel2 dla uzyskania maksymalnej aktywności wymaga bardziej kwaśnego środowiska (zakres pH 5 - 7).

Doktorantka zbadała także wpływ obecności różnych związków powierzchniowo czynnych na aktywność DNAzymów o sekwencjach PS2.M, Tel1 i Tel2. Wiadomo, że obecność surfaktantu Triton X100 zapobiega agregacji heminy oraz przyczynia się do stabilizacji kompleksu pomiędzy kwadrupleksem i heminą. Okazało się, że z przebadanych przez nią kilku surfaktantów aktywność DNAzymu o sekwencji PS2.M zwiększał właśnie Triton X100. Wzrost aktywności DNAzymów o sekwencjach telomerowych powodował natomiast dodatek niejonowego surfaktanta o nazwie Brij 58. Z kolei dodatek czynników zagęszczających, jakimi są polietylenoglikole PEG200 i PEG300, wpływał ujemnie na badane reakcje.

Bardzo interesującym spostrzeżeniem dokonany przez Doktorantkę była obserwacja, że aktywność DNAzymu o sekwencji telomerowej zależy od sposobu przygotowania próbki. Zjawisko to mgr Kosman tłumaczy tym, że ogrzanie próbki do 95 °C i natychmiastowe jej

schłodzenie w lodzie wymusza takie pofałdowanie kwadrupleksu, które odpowiada najwyższej aktywności DNAzemu, natomiast jego malejąca z czasem aktywność wynika z ustalania się równowagi termodynamicznej pomiędzy różnymi formami kwadrupleksu. Zastanawiam się, jakie przesłanki skłoniły ją do wyciągnięcia takich wniosków. Czy wykonane były na przykład widma CD, które w bardzo prosty sposób mogłyby potwierdzić tę hipotezę?

Niestety, niepowodzeniem zakończyły się próby detekcji telomerazy w ekstrakcie z komórek nowotworowych podjęte przez Doktorantkę we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu. Być może Doktorantce zabrakło już czasu na zoptymalizowanie tego eksperymentu? Wierzę, że dzięki wytrwałej i systematycznej pracy, w spokojniejszych warunkach również i ten, kluczowy dla jej badań eksperyment, zakończy się sukcesem.

Kolejnym celem, który wyznaczyła sobie mgr Kosman, było zwiększenie czułości detekcji metod bioanalitycznych wykorzystujących DNAzemy o aktywności peroksydazowej. Metody te zazwyczaj oparte są o stosunkowo mało czułe pomiary kolorymetryczne i chemiluminescencyjne. Mgr Kosman zaproponowała więc wykorzystanie zjawiska fluorescencji. Idea tego eksperymentu zakładała, że fluorogenne substraty, w wyniku utleniania w obecności DNAzemu będą wykazywać wzmocnioną fluorescencję. Dla DNAzymów o sekwencjach PS2.M oraz Tel2 zbadała zachowanie się trzech substratów fluorogennych – tiaminy, Amplex Red i MNBDH. Obiecujące wyniki uzyskała jedynie dla DNAzemu o sekwencji PS2.M. Sugerują one, że szczególnie w obecności MNBDH, metoda ta może mieć potencjalne zastosowanie w badaniach bioanalitycznych.

Ostatnia część eksperymentalna pracy poświęcona jest reakcji depozycji srebra. Przesłankę do tych badań stanowiła informacja, że w metodach immunochemicznych oraz w obrazowaniu mikroskopowym stosuje się reakcję depozycji srebra katalizowaną peroksydazą chrzanową. Mgr Kosman postawiła więc hipotezę, że również i DNAzym o aktywności peroksydazy chrzanowej może katalizować taką reakcję. Wykorzystując spektroskopię UV-Vis, powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) oraz zlokalizowany rezonans plazmonowy (LPR) wykazała słuszność swojej hipotezy. Pokazała, że DNAzemy skonstruowane zarówno z sekwencji PS2.M jak i z sekwencji telomerowej mogą katalizować reakcję depozycji srebra. Ponadto stosując metody rezonansu plazmonowego zaprojektowała nowe układy sensorowe z wykorzystaniem DNAzymów o aktywności peroksydazowej. Wykazała również, że metoda ta może zostać wykorzystana do detekcji zarówno telomerazy jak i patogenów DNA.

Recenzowana przeze mnie rozprawa została spisana na 171 stronach. Zarówno wstęp jak i część literaturowa stanowią doskonałe wprowadzenie do zagadnień poruszanych w

rozprawie. Część eksperymentalną poprzedza rozdział, w którym mgr Kosman precyzuje cel pracy. Dla realizacji programu badawczego zaplanowała sześć niezależnych zadań, które miały wyjaśnić sprecyzowane wcześniej problemy naukowe. Po części eksperymentalnej umieszczone zostały rozdziały, w których zawarte są wyniki eksperymentalne wraz z ich dyskusją. Rozprawę kończy podsumowanie rozprawy, jej streszczenie, cytowana literatura składająca się ze 187 pozycji oraz wykaz symboli i skrótów stosowanych w pracy, który jest bardzo niekompletny.

Niestety, ta niezwykle interesująca i bogata eksperymentalnie rozprawa ma również wady. Z wielką przykrością muszę odnotować, że jest w niej bardzo dużo błędów edytorskich. Język rozprawy jest nieprecyzyjny, pełen żargonu naukowego. Rozprawa sprawia wrażenie, że przygotowana została w pośpiechu i Autorce nie wystarczyło czasu na jej korektę. Trudno byłoby przytoczyć wszystkie występujące w rozprawie niepoprawne wyrażenia czy błędy edytorskie, ograniczę się więc jedynie do kilku przykładów.

- Na stronach 28 i 66 Autorka używa wyrażen: „*ekspresowane białko*” czy też „*białko jest ekspresowane*” zamiast „*białko ulegające ekspresji*” lub ewentualnie „*ekspresjonowane*” białko.
- Na stronie 29 pisze, że „*G-kwadrupleksy to struktury przestrzenne tworzone przez jednoniciowe odcinki DNA lub RNA*”. W następnym zaś zdaniu kontynuuje: „*Mogą być formowane przez cztery, dwie lub jedną nić kwasu nukleinowego...*” Jest to zbyt duży skrót myślowy, który prowadzi do wzajemnie wykluczających się stwierdzeń.
- Na stronie 30 Doktorantka informuje nas, że: „*G-kwadrupleks stabilizowany jest przez wiązania wodorowe pomiędzy resztami guanozyn, przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnimi kationami metalu a ujemnie naładowanymi resztami kwasu fosforanowego szkieletu fosfodiesterowego...*”. Choć oddziaływania kationów metali z resztami fosforanowymi są również ważne dla stabilności kwadrupleksu, jednak to oddziaływanie kationów metali z atomami tlenu grup karbonylowych reszt guanozyny są odpowiedzialne za podwyższoną stabilność kwadrupleksów w stosunku do innych form strukturalnych.
- Zdecydowanie zbyt dużym uproszczeniem jest również stwierdzenie na stronie 32, że: „*dupleksy stabilizowane są przez dwa lub trzy wiązania wodorowe, zaś G-kwadrupleksy przez cztery*”. Dwa lub trzy wiązania wodorowe zawiązują się pomiędzy kanonicznymi parami zasad odpowiednio A-T i C-G, natomiast liczba wiązań wodorowych stabilizujących strukturę dupleksu zależy od liczby par zasad tworzących

dupleks. Podobne uproszczenie dotyczy struktur G-kwadrupleksów. Już w każdej G-tetradzie występuje osiem wiązań wodorowych (a nie cztery), gdyż każda reszta guanozyny jest donorem i akceptorem dwóch wiązań wodorowych, o czym Autorka pisze dwie strony wcześniej.

- Mgr Kosman kilkakrotnie używa wyrażenia: „*negatywnie naładowane grupy karboksylowe*” czy „*pozytywny ładunek*”, zamiast: ujemnie naładowane grupy, czy też ładunek dodatni. Nie podoba mi się znajdujące na stronie 47 wyrażenie, w którym wspomina o „*dystalnym*” położeniu heminy. Zamiast „*woda MiliQ*” proponowałabym używać na przykład wyrażenia: woda filtrowana w systemie MiliQ. W części eksperymentalnej mgr Kosman podaje, że w swoich eksperymentach wykorzystywała „*kity firmy BBInternational*”, a roztwór liganda dodawała przy pomocy „*injektora*”.
- Zdarza się, że zamiast numeru odnośnika znajdujemy nawias, a w nim słowo „*odnośnik*”.
- Uważam także, że sformułowanie „*DNAzym utworzony na sekwencji*” jest żargonowe. Zamiast tego należy stosować na przykład „*DNAzym oparty o sekwencję*”, czy też po prostu „*DNAzym o sekwencji*”... Bez komentarza pozostawię natomiast nagminnie używane przez Doktorantkę wyrażenia „*złote nanocząstki*” zamiast „*nanocząstki złota*”.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości, na które nie znalazłam odpowiedzi. Podczas publicznej obrony chciałabym usłyszeć od Doktorantki, jakie przesłanki kierowały nią, by badać DNAzyny o sekwencjach telomerowych, choć wiadomo, że najwyższą aktywność katalityczną wykazuje DNAzym o sekwencji PS2.M.

W trakcie badań nad wpływem jonów metali na aktywność katalityczną DNAzymów mgr Kosman całkowicie pomija kationy sodu, odgrywające istotną rolę w badaniach strukturalnych kwadrupleksów. Z wcześniejszych badań wiadomo, że w zależności od tego, czy w układzie są jony potasu lub sodu, topologia kwadrupleksu o sekwencji PS2.M zmienia się z równoległej na antyrównoległą o znacznie mniejszej aktywności katalitycznej. Nie znalazłam nigdzie informacji o badaniach dotyczących wpływu kationów sodu na topologię badanych przez nią oligonukleotydów o sekwencjach telomerowych. Ponadto chciałam zauważyć, że przedstawiony przez nią na rysunku 13 C jednocząsteczkowy kwadrupleks jest antyrównoległy, a nie równoległy, jak podaje w podpisie do rysunku.

Krzywa temperatury topnienia dla oligonukleotydu o sekwencji PS2.M w obecności jonów magnezu wykazuje histerezę. W oparciu o to zjawisko Doktorantka stawia hipotezę o

dwustopniowym procesie powstawania kwadrupeksu. Chciałabym podkreślić, że obecność histerezy jest typowa dla kwadrupeksów i związana jest przede wszystkim z kinetyką ich tworzenia. Brak jest informacji o tym, czy w trakcie pomiarów Doktorantka stosowała różne szybkości schładzania próbki, czy też swoją hipotezę opiera o jeden typ pomiaru.

Chciałabym dowiedzieć się, na jakiej podstawie Doktorantka stwierdza, że oligonukleotydy o sekwencjach Tel2 tworzą struktury zbudowane z dwóch podjednostek kwadrupeksów, a oligonukleotydy o sekwencji Tel3 struktury zbudowane z trzech podjednostek kwadrupeksów.

Wymienione przeze mnie w recenzji uwagi w żaden sposób nie wpływają na ogólną ocenę merytoryczną wartości rozprawy. Doktorantka ma wszelkie cechy dobrego badacza. Zrealizowanie założeń pracy wymagało od niej wszechstronnych umiejętności badawczych. Mgr Kosman wykazała się dobrą znajomością wielu metod eksperymentalnych. Dla przeprowadzenia wnikliwej i krytycznej analizy otrzymanych wyników niezbędna była wiedza z różnych dziedzin z pogranicza biochemii i chemii. W każdym z tych obszarów badawczych Doktorantka potwierdziła swoje kompetencje. Wyniki prac Doktorantki zamieszczone w rozprawie zostały już częściowo opublikowane.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Kosman do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia /daniela