



POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. inż. Paweł Sachadyn
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
email: psach@pg.gda.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 7 września 2015

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Ireneusza Sobolewskiego pt. „Synteza enzymatyczna znakowanego punktowo DNA jako metoda badania fotochemicznych uszkodzeń biopolimeru”

Rozprawa doktorska Doktorskiej mgr Ireneusza Sobolewskiego pt. „Synteza enzymatyczna znakowanego punktowo DNA jako metoda badania fotochemicznych uszkodzeń biopolimeru” wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Katedry Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Janusza Raka stanowi interesujący przykład aplikacji technik biologii molekularnej z wykorzystaniem endonukleazy restrykcyjnych klasy IIS do punktowego znakowania DNA pochodnymi halogenowymi zasad. Celem badań było opracowanie metodyki otrzymywania fragmentów DNA znakowanych bromodeoksyurydyną (BrdU) w dokładnie zdefiniowanej pozycji w sekwencji nukleotydowej, na jednej lub obu niciach. Zarysowano też perspektywiczny cel zastosowania opracowanej metody, czyli użycie tak zmodyfikowanego DNA w badaniu molekularnych mechanizmów radiacyjnego uszkodzenia DNA oraz w terapii nowotworów.

Rozprawa doktorska mgr Ireneusza Sobolewskiego liczy, bez załączników, 166 stron i składa się z następujących rozdziałów: Spis Treści, Wykaz Skrótów, Wprowadzenie (27 stron), Cel pracy, Materiały (9 stron), Metody (20 stron), Wyniki i Dyskusja (85 stron), Podsumowanie (7 stron) i Bibliografia (10 stron), która obejmuje ponad 200 pozycji. W manuskrypcie umieszczono 68, w zdecydowanej większości oryginalnych, rysunków, 26 fotografii oraz 20 tabel, a ponadto załącznik w postaci artykułu naukowego stanowiącego publikację wyników pracy doktorskiej mgr Sobolewskiego: Sobolewski, I., Polska, K., Żylicz-Stachula, A., Jeżewska-Frąckowiak, J., Rak, J., & Skowron, P. (2011). Enzymatic synthesis of long double-

stranded DNA labeled with haloderivatives of nucleobases in a precisely pre-determined sequence. BMC biochemistry, 12(1), 47.

Wprowadzenie zawiera szczegółowy i systematyczny przegląd rodzajów i mechanizmów uszkodzeń oksydacyjnych DNA ze szczególnym uwzględnieniem aspektu radiosensybilizacji, czyli modyfikacji zasad azotowych prowadzących do uwrażliwienia DNA na uszkodzenia radiacyjne. Należy bardzo wysoko ocenić wnikliwy opis mechanizmów chemicznych i radiacyjnych uszkodzeń DNA oraz bogaty materiał ilustracyjny ułatwiający ich zrozumienie. Wprowadzenie zawiera też zwięzłą charakterystykę endonukleaz restrykcyjnych oraz prezentację różnych typów endonukleaz klasy II, czyli kluczowych narzędzi molekularnych wykorzystanych w tej pracy.

Kolejne rozdziały, „Materiały” oraz „Metody” stanowią rzetelnie przygotowane wykazy użytych materiałów, instrumentów oraz metod laboratoryjnych. Opis metodyki nie budzi zastrzeżeń, a dbałość o szczegóły i precyzję są godne uwagi.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Autor przedstawia w niezwykle dokładny i wyczerpujący sposób przebieg przeprowadzonych eksperymentów i analizę uzyskanych rezultatów. Szczegółowo wyjaśnione są projekty i poszczególne etapy doświadczeń oraz ich optymalizacja. Poświęcenie tak dużej części szczegółom metodycznym należy uznać za uzasadnione, gdyż opracowanie metody było tu celem pracy.

Prezentowana metoda polega na znakowaniu fragmentów DNA za pomocą BrdU przez częściowe wypełnienie lepkich końców wytworzonych przez trawienie dwóch fragmentów DNA przy użyciu enzymu restrykcyjnego klasy IIS w miejscach tak dobranych, aby zachować kompatybilność częściowo wypełnionych lepkich końców pozwalającą na ich ligację. Procedura obejmuje otrzymywanie i oczyszczanie produktów PCR przeznaczonych do znakowania, trawienie ich endonukleazą klasy IIS, częściowe wypełnianie powstałych lepkich końców przy użyciu trójfosforanu 5-bromo-2'-deoksyurydyny i dobranej do tego celu polimerazy DNA, oczyszczanie tak zmodyfikowanych fragmentów DNA, ich ligację za pomocą ligazy DNA oraz ponowne oczyszczanie. Opis eksperymentów jest uzupełniony znakomitymi schematami oraz bogato udokumentowany za pomocą licznych elektroforegramów. Autor relacjonuje przebieg prac prowadzących do otrzymania kilku różnych fragmentów DNA i optymalizację poszczególnych etapów ich produkcji. Efektem doskonalenia metody jest uzyskanie kilkudziesięciu mikrogramów DNA precyzyjnie znakowanego bromodeoksyurydyną o rozmiarze kilkuset pb przeznaczonego do dalszych badań. Następnie pokazana jest bardzo staranna analiza chromatograficzna HPLC produktów enzymatycznej hydrolizy zmodyfikowanego DNA wykazująca niezbitą efektywną inkorporację BrdU. Wyniki te są ilustrowane szeregiem chromatogramów.

W prezentowanych badaniach na szczególne uznanie zasługuje wykonanie świetnie zaprojektowanych doświadczeń kontrolnych świadczące o wysokich umiejętnościach naukowca i rzetelności eksperymentatora. Emblematycznym przykładem mogą być tu rozdziały chromatograficzne

hydrolizatów DNA zmodyfikowanego BrdU i kontroli DNA niezmodyfikowanego, wzorców, a także, co bardzo cenne, preparatu kontrolnego przygotowanego bez dodawania DNA, który wykazuje obecność nukleotydów (ale nie BrDU), zapewne pochodzących ze stosowanych preparatów enzymatycznych.

Język i poprawność terminologiczna rozprawy mgr Ireneusza Sobolewskiego nie budzą zastrzeżeń. Występuje wprawdzie pewna liczba błędów typograficznych, ale ogólny poziom edytorski i estetyka manuskryptu zasługują na wyróżnienie. Chciałbym jedynie zwrócić uwagę na użycie przez Autora nieprawidłowej formy „akrylamidowy”, zamiast „akryloamidowy” oraz „na żelu” zamiast „w żelu” w odniesieniu do rozdziału elektroforetycznego DNA. Ponadto natknąłem się na kilka drobnych usterek, które jako Recenzent muszę tu wymienić:

s. 30 „20 czynnych i potencjalnych R-M” (restryktaz-metylaz), zamiast „20 czynnych i potencjalnych genów R-M”

s. 66 „rozpatrując grupę REaz podtypu IIS (...)wybór padł”, zamiast np. „rozpatrując grupę REaz podtypu IIS (...) wybrano”

s. 119 „ligaza działa bez zarzutu”

s. 138 „skrócenie układu” zamiast „skrócenie długości otrzymywanego fragmentu DNA ”

s. 155 „rezultaty testów klinicznych nie są zbyt zachęcające prawdopodobnie ze względu na niezrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za radiouczulanie”. Niezrozumienie mechanizmów, może wpłynąć na interpretację lub projekt, ale nie na wynik eksperymentu.

Należy jednak podkreślić, że te drobne potknięcia językowe lub skróty myślowe są bardzo nieliczne i nie obniżają wysokiej oceny recenzowanej rozprawy.

Opisy doświadczeń i wyników oraz ich interpretacje są nienagane. Proponowana koncepcja i metoda otrzymywania fragmentów DNA modyfikowanych BrdU skłaniają jednak do zadania kilku pytań.

1. Opiswane przykłady inkorporacji BrdU dotyczą fragmentów DNA rzędu kilkuset pz, tymczasem Autor twierdzi, że metoda pozwala na modyfikowanie fragmentów DNA do 100 tysięcy pz. Skąd taki limit i w jaki sposób należałoby rozwinąć metodę, aby znakować fragmenty o takich rozmiarach, znacznie przekraczających możliwości standardowej metody PCR?
2. Końcowym etapem otrzymywania zligowanych fragmentów DNA modyfikowanych BrdU jest ekstrakcja z żelu agarozowego, co wiąże się z ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe, które z kolei powoduje uszkodzenia DNA, szczególnie w wypadku obecności inkorporowanych pochodnych halogenowych zasad azotowych. Jaka jest ocena tego ryzyka i czy można tego rodzaju uszkodzenia DNA zminimalizować lub wyeliminować?
3. Sztuczna synteza umożliwia wprowadzenie BrdU na wybrany koniec lub wewnątrz oligodeoksyrybonukleotydu. Jak Autor ocenia atuty swojego rozwiązania wobec możliwości użycia syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów znakowanych BrdU?

4. Sugerowaną perspektywiczną aplikacją opracowanej metody jest terapia nowotworów. Jakie byłyby korzyści z użycia proponowanej metody punktowego znakowania DNA BrdU w porównaniu z inkorporacją BrdU następującą podczas replikacji DNA?
5. Czy Autor może przedstawić przykład koncepcji zastosowania DNA punktowo znakowanego BrdU do badania mechanizmów uszkodzeń kwasów nukleinowych? Jakiej ilości znakowanego DNA wymagałby pojedynczy eksperyment tego typu?

Oryginalna i nowatorska metoda punktowego znakowania DNA pochodnymi zasad azotowych opracowana przez mgr Ireneusza Sobolewskiego spełnia niezbędne kryteria nowości naukowej. Należy podkreślić, że opracowanie nowej i efektywnej metody modyfikacji DNA zaprezentowane przez mgr Ireneusza Sobolewskiego wymagało dużego nakładu pracy, doskonałego warsztatu laboratoryjnego i wielkiej staranności w prowadzeniu eksperymentów. Na szczególne wyróżnienie zasługują niezwykle precyzyjne opisy doświadczeń i ich wyników oraz bardzo staranna dokumentacja, a w szczególności świetnie zaprojektowane eksperymenty kontrolne i znakomite, perfekcyjnie wykonane ilustracje i schematy.

Dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 5 doniesień konferencyjnych oraz trzy publikacje z listy filadelfijskiej, dotyczące tematyki modyfikacji enzymatycznych DNA, w tym artykuł w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. W jednym z tych artykułów, zamieszczonym w czasopiśmie *BMC Biochemistry*, który stanowi publikację wyników jego rozprawy doktorskiej, Ireneusz Sobolewski jest pierwszym autorem.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr Ireneusza Sobolewskiego pt. „Synteza enzymatyczna znakowanego punktowo DNA jako metoda badania fotochemicznych uszkodzeń biopolimeru” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Ireneusza Sobolewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

