

Gdańsk, 17.10.2015r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Ireneusza Sobolewskiego zatytułowanej „Synteza enzymatyczna znakowanego punktowno DNA jako metoda badania fotochemicznych uszkodzeń biopolimeru”

Rozwiązanie struktury przestrzennej DNA przez J. Watsona i F. Cricka w 1953 r. otworzyło drogę współczesnym badaniom nad przekazywaniem informacji genetycznej, natomiast odkrycie enzymów restrykcyjnych przez Meselson i Yuana w 1968 r. dało nam narzędzia umożliwiające manipulacje materiałem genetycznym. Utrzymanie jego integralności i zapewnienie poprawnej replikacji jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania każdej komórki. DNA jest nieustannie poddawany działaniu czynników środowiskowych uszkadzających jego strukturę i zaburzających funkcję. Uszkodzenia łańcucha DNA powstają zarówno w sposób spontaniczny, jak i indukowany. W większości wypadków częstość ich występowania nie jest duża, lecz można ją zwiększyć np. poprzez wprowadzanie do środowiska komórki np. halogenów takich jak brom. Ich duża reaktywność powoduje, że niezwykle łatwo modyfikują one strukturę DNA przyłączając się do zasad azotowych. Takie bromopochodne powodują tautomeryczne zmiany strukturalne zasad azotowych skutkujące zmianą kodu genetycznego w wyniku błędnego parowania zasad. Ich obecność zwiększa także wrażliwość na czynniki powodujące zerwanie nici DNA, takie jak promieniowanie UV. Efekty te mogą działać geno- lub cytotoksycznie, w skrajnym wypadku prowadząc do śmierci komórki. Dlatego tworzenie narzędzi do badania wywoływanych przez nie uszkodzeń oraz poznanie mechanizmów umożliwiających ich naprawę, są jednymi z priorytetów badań nad funkcjonowaniem DNA. Potwierdza to tegoroczna Nagroda Nobla (T. Lindahl, P. Modrich, A. Sancar) z chemii, przyznana właśnie za badania nad mechanizmami naprawczymi uszkodzeń łańcucha DNA.

Rozprawa doktorska mgr Ireneusza Sobolewskiego zatytułowana „Synteza enzymatyczna znakowanego punktowno DNA jako metoda badania fotochemicznych uszkodzeń biopolimeru” powstała w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, którą kieruje prof. dr hab. Janusz Rak.

W wielu miejscach dysertacji widać również idee, opracowane nowatorskie narzędzia i doświadczenie w dziedzinie biologii molekularnej kierownika Katedry Biotechnologii Molekularnej prof. dr hab. Piotra Skowrona, które z pewnością były niezwykle pomocne Kandydatowi w wykonywaniu swoich badań.

Rozprawa zawiera wyniki badań Kandydata nad opracowaniem systemu umożliwiającego punktową inkorporację bromopochodnych nukleotydów (BrdUTP) do długich liczących od kilkuset do prawie tysiąca pz łańcuchów DNA, celem ich foto- i radiouwrażliwienia. Przy jego pomocy Kandydat zsyntezował kilka długich (~400, ~1000 pz) fragmentów DNA punktowo znakowanych przy pomocy BrdUTP. Dodatkowo syntezowane były fragmenty, do których wprowadzano kanoniczne nukleotydy w postaci dUTP i dTTP, celem porównania specyficzności i efektywności stosowanych polimeraz i ligaz DNA. Obecnie stosowane metody syntezy DNA/RNA umożliwiają uzyskanie znakowanych (w tym bromo-) fragmentów o wielkości do kilkudziesięciu nt. Syntezy te są znacznie kosztowniejsze od natywnych fragmentów. Synteza specyficznym znakowanych fragmentów dłuższych niż 100 nt jest praktycznie niemożliwa.

Halogenopochodne nukleotydów (głównie BrdU) są wykorzystywane w badaniach mechanizmów uszkodzeń i naprawy łańcucha DNA ściśle powiązanych z zaburzeniami przepływu informacji genetycznej w komórce, np. z procesami nowotworowymi. Ponieważ procesy te są ściśle związane ze zdrowiem i jakością życia człowieka, są obiektem badań wielu laboratoriów na całym świecie. Z tego punktu widzenia wybór tematyki pracy dokonany przez Kandydata uważam za niezwykle trafny.

Formalna ocena rozprawy

Praca zawiera 8 rozdziałów, wśród których znajdują się wprowadzenie (22 strony), cel pracy (1 strona), materiały (8 stron), metody (19 stron), najobszerniejszy-wyniki i dyskusja (76 str), podsumowanie (7 str), bibliografia (10 stron) i załączniki (15 stron-publicacja wraz 3 zestawami sekwencji DNA). Publikacja, której pierwszym autorem jest Kandydat, została opublikowana w BMC Biochemistry (IF-1,44) i zawiera wyniki eksperymentów dotyczących inkorporacji bromopochodnych nukleotydów do długich łańcuchów DNA.

Dysertacja mgr Ireneusza Sobolewskiego napisana jest poprawnym językiem, dużą starannością edytorską oraz zrozumieniem opisywanych problemów. Szata edytorska wsparta rysunkami i fotografiami o bardzo dobrej jakości jest mocną stroną rozprawy.

Liczba błędów językowych jest niewielka: np. ...usunięcie wodoru (powinno być atomu wodoru) w opisie rys. 14 na str. 120, czy ...nukleozydy „zawieszono” (powinno być rozpuszczone) w buforze w opisie rys. 58 na str. 140.

Wstęp dysertacji zawiera charakterystykę wybranych uszkodzeń łańcucha DNA spowodowanych czynnikami chemicznymi oraz fizykochemicznymi. Wśród nich scharakteryzowane są uszkodzenia będące następstwem komórkowego stresu oksydacyjnego, promieniowania UV czy indukowane wolnymi elektronami. Kandydat opisuje również wpływ bromopochodnych nukleotydów w łańcuchu na podatność DNA na uszkodzenia. Rozdział ten zawiera również krótką charakterystykę jednej z grup enzymów restrykcyjnych REaz podtypu IIS, będących jednym z kluczowych elementów zaproponowanego przez Kandydata systemu syntezy znakowanego DNA. Treść tego rozdziału pozwala czytelnikowi zapoznać się z problematyką uszkodzeń kwasów nukleinowych i uzmysławia, jak dynamiczną cząsteczką jest łańcuch DNA.

W rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” Kandydat w zwięzły sposób prezentuje uzasadnienie budowy proponowanych przez siebie systemów umożliwiających punktowe znakowanie długich fragmentów DNA przy pomocy BrdU oraz przedstawia szczegółowe cele prowadzące do realizacji tego zadania.

Rozdziały „Materiały” i „Metody” niezwykle szczegółowo opisują „eksperymentalną kuchnię” przeprowadzonych przez Kandydata eksperymentów. Ostatni rozdział - „Metody” jest ilustrowany zaprojektowanymi przez Kandydata konstruktami DNA, co ułatwia czytelnikowi zrozumienie prowadzonych przez Kandydata eksperymentów.

Rozdział siódmy zatytułowany „Wyniki i dyskusja” zawiera opis i omówienie uzyskanych przez Kandydata wyników. Jest to najobszerniejszy rozdział dysertacji. Także w tym rozdziale zauważyć można dużą widzę i doświadczenie eksperymentalne Kandydata pozwalające mu na precyzyjne przedstawienie efektów swojej pracy. Szczególnie wyraźnie widać to w miejscach, gdzie Kandydat interpretuje uzyskane przez siebie wyniki, zastanawia się nad przyczyną ewentualnych niepowodzeń, nad ograniczeniami zaproponowanej przez siebie metodologii i proponuje ewentualne korekty odpowiednich procedur. Opisanie w rozprawie eksperymenty są niezwykle pomysłowe i eleganckie i z całą pewnością wymagały od Kandydata poświęcenia dużej ilości czasu na ich wykonanie. Kandydat opisuje w nim eksperymenty, których celem była synteza długich fragmentów DNA punktowo modyfikowanych BrdU. W tym celu Kandydat zaprojektował odpowiednie plazmidowe

wektory, a następnie wykorzystując reakcję PCR zsyntezował fragmenty DNA zawierające miejsca restrykcyjne dla REazy BsaI. Sekwencje te wprowadził do powielanych fragmentów DNA przy pomocy specjalnie zaprojektowanych starterów i termostabilnej polimerazy DNA (Taq). Odpowiednio dobrane produkty PCR Kandydat specyficznie przeciął przy pomocy REazy BsaI generując krótkie jednoniciowe lecz niekompatybilne asymetryczne końce łańcucha. Następnie przy pomocy polimerazy DNA Bst(exo-) charakteryzującej się obniżoną dyskryminacją nienaturalnych nukleotydów i brakiem aktywności egzonukleolitycznej, wprowadził bromopochodną (BrdU) do fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR i ciętych enzymem BsaI. Wprowadzenie BrdU powoduje powstawanie lepkich/komplementarnych końców w produktach PCR. Po użyciu ligazy DNA T4 Kandydat uzyskał długie fragmenty DNA specyficznie znakowane BrdU.

Korzystając z powyższej strategii, Kandydat zaprojektował i zsyntezował długie fragmenty DNA (400, 1000 pz) specyficznie znakowane przy pomocy BrdUTP. Zaproponowana metoda jest uniwersalna i teoretycznie może służyć do wprowadzania do łańcucha DNA dowolnych pochodnych nukleotydów. Jej „wąskim gardłem” jest konieczność stosowania polimerazy DNA o ograniczonej dyskryminacji wobec nienaturalnego trifosforanu nukleozydu. Mimo, że takową Kandydat wykazał dla Bst(exo-) w stosunku do BrdUTP, nie ma gwarancji, że inne bromopochodne będą zachowywały się podobnie. Kandydat podkreśla to ograniczenie w swojej pracy, co świadczy, że dobrze zdaje sobie sprawę z możliwości i ograniczeń zaproponowanego przez siebie systemu syntezy znakowanego DNA.

Eleganckim rozwiązaniem problemu ograniczonej efektywności syntezy znakowanego DNA jest propozycja Kandydata polegająca na wykorzystaniu matrycy plazmidowej i starterów z tzw. wiszącymi końcami. Wykorzystanie wektora plazmidowego pUC19 i starterów z wiszącymi końcami (częściowo komplementarnymi do matrycy) umożliwiło wprowadzenie do syntezowanych fragmentów DNA specyficznych sekwencji cięcia dla BsaI, a w końcowym etapie dużych mikrogramowych ilości znakowanego DNA. Zaletą takiej procedury jest pominięcie żmudnego etapu klonowania molekularnego.

Uzyskanie konstruktów DNA o optymalnej sekwencji/strukturze oraz opracowanie optymalnych warunków reakcji enzymatycznych poprzedzone było wieloma próbami Kandydata, których celem było uzyskanie jak największej wydajności poszczególnych procesów prowadzących do znakowania DNA. Była to żmudna praca, która ostatecznie doprowadziła do uzyskania systemu efektywnie wcielającego BrdU do łańcucha DNA.

Rozdział ten, podobnie jak pozostała część pracy jest bogato i starannie ilustrowany, co pozwala zrozumieć czytelnikowi idee, jakie przyświecały eleganckim konstruktom DNA służących otrzymaniu znakowanego DNA. Zamieszczone ilustracje umożliwiają zrozumienie złożonych zagadnień związanych z manipulacjami strukturą (sekwencją) DNA, nawet osobom nie pracującym na co dzień z tą cząsteczką.

W ostatnim rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie”, Kandydat dokonuje krótkiego podsumowania swoich osiągnięć. W krótkim akapicie przedstawia również perspektywy zastosowania długich bromoznakowanych fragmentów DNA zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych-farmakologicznych.

Uwagi krytyczne i polemiczne do wyników badań opisanych przez Kandydata w dysertacji.

Różnorodne narzędzia w postaci DNA (plazmidy, startery) oraz doświadczenia wykonane przez Kandydata zostały zaprojektowane i wykonane w przemyślany i profesjonalny sposób. Trudno doszukać się tu jakichkolwiek błędów merytorycznych. Również proces selekcji optymalnych enzymów Kandydat przeprowadził stosując racjonalne kryteria ich doboru. W wypadku niepowodzeń spowodowanych np. stosowaniem zbyt krótkich primerów czy małą efektywnością reakcji PCR lub ligacji, trudno było przewidzieć „z góry” taki wynik eksperymentów. Taka jest natura badań eksperymentalnych otwierających nowe ścieżki wiedzy.

Liczba uchybień związanych z opisem eksperymentów jest niewielka i mało znacząca. Na str. 70 widnieje informacja, że na Fot. 1 (str. 73) znajdują się dwa dyskretne prążki o wielkościach 190 i 211 pz, powstałe w wyniku cięcia enzymem BspTNI produktu PCR oznaczonego jako P2a. W którym miejscu są one zlokalizowane? Na Fot. 1 najmniejszym widocznym fragmentem jest prążek odpowiadający wielkością ok. 400 pz. Ta fotografia przedstawia pełnej długości produkty reakcji PCR, a nie produkty reakcji ich cięcia.

Z charakterystyki markera M1 zamieszczonej w części Materiały wynika, że powinien on zawierać prążek 500 pz. Czemu jest on niewidoczny? Jeżeli charakteryzowano produkty P1 i P2a np. na Fot. 1 o wielkościach ok. 400 pz, czyli dużo mniejsze, niż pierwszy widoczny prążek markera M1, to po co stosować ten marker?

Enzymy BsaI i BspTNI są względem siebie izoschizoizomerami (Poproszę o wyjaśnienie na czym polega ta izomeria **w trakcie otwartej części publicznej obrony**) W eksperymentach Kandydat wykorzystywał obie formy. Co było przesłanką wyboru którejs z form w konkretnym eksperymencie cięcia DNA?

Czy kandydat ma informacje lub przemyślenia czy możliwa jest inkorporacja innych niż BrdU halogenopochodnych do łańcucha DNA z wykorzystaniem polimerazy Bst(exo-)?

Czy na podstawie np. Fot 14 (str. 98) można oszacować efektywność inkorporacji BrdUTP w stosunku do dUTP lub dTTP przez Bst(exo-) do tego samego fragmentu DNA w tych samych warunkach?

Czy np. na podstawie Fot. 13 (str. 95) da się oszacować jak efektywna jest ligacja przy pomocy ligazy DNA T4 wypełnionych fragmentów DNA (ścieżka Bst)? Jaki procent substratów ulega ligacji?

Zastosowanie hybrydowej metody HPLC-MS zamiast klasycznej HPLC-UV, pozwoliłoby na wzrost czułości detekcji o kilka rzędów wielkości w zaproponowanej przez Kandydata metodzie oznaczania BrdU w hydrolizatach znakowanego DNA.

Podsumowując tą część rozprawy muszę stwierdzić, że stanowi ona wynik ogromu pracy włożonej przez Kandydata potrafiącego wykorzystywać własną wiedzę do rozwiązywania postawionych problemów z zakresu biologii molekularnej.

Za najważniejsze i wnoszące istotny element nowości naukowej osiągnięcia Kandydata uważam:

- zastosowanie nowego enzymu- REazy BsaI (BspTNI) do specyficznego generowania (po wypełnieniu nukleotydem) lepkich końców DNA
- zastosowanie polimerazy DNA Bst(exo-) do inkorporacji BrdU do łańcucha DNA
- konstrukcję systemu umożliwiającego uzyskiwanie długich fragmentów DNA specyficznie znakowanych BrdU
- syntezę przy pomocy powyższego systemu długich fragmentów DNA specyficznie znakowanych BrdU
- wykorzystanie starterów z wiszącymi końcami do generowania na dużą skalę fragmentów DNA umożliwiających inkorporację BrdU na wektorze plazmidowym pUC19
- opracowanie metodologii wykorzystującej HPLC detekcji niewielkich ilości BrdU w hydrolizatach znakowanych DNA

Powyższe uwagi wynikają jedynie z uważnej i krytycznej analizy rozprawy doktorskiej i w żadnym stopniu nie umniejszają efektów naukowych osiągniętych przez Kandydata. Reasumując, Kandydat postawił przed sobą ambitny cele badawczy i skutecznie go zrealizował. Kandydat wykazał się przy tym nie tylko ogromnym zasobem wiedzy, lecz potrafił również tą wiedzę efektywnie wykorzystać w swoich badaniach. Połączenie wiedzy i

niezwykle dużych praktycznych umiejętności Kandydata czynią z niego doświadczonego i samodzielnego badacza.

Z pełnym, przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zawiera i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Ireneusza Sobolewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Piotr Mucha