



RECENZJA

pracy doktorskiej pani mgr Justyny Agaty Wiczek

pt. „*Uszkodzenia radiacyjne i fotochemiczne w DNA modyfikowanym bromopochodnymi zasad nukleinowych. Badania metodami: DHPLC, LC-MS oraz qPCR*”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Wiczek została wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Raka. W ramach projektu doktorskiego przedstawiono do oceny 4 publikacje:

D1. *UV-Induced Strand Breaks in Double-Stranded DNA Labeled with 5-Bromouracil: Frank or Secondary?*

Justyna Wiczek, Justyna Miloch, Janusz Rak

The Journal of Physical Chemistry Letters 2013, 4, 4014–4018 IF 8.54

D2. *Irreversible Electron Attachment – a Key to DNA Damage by Solvated Electrons in Aqueous Solution*

Kinga Westphal, **Justyna Wiczek**, Justyna Miloch, Gabriel Kciuk, Krzysztof Bobrowski, Janusz Rak

Organic & Biomolecular Chemistry 2015, 13, 10362–10369 IF 3.04

D3. Tytuł: *DHPLC and MS Studies of a Photoinduced Intrastrand Cross-Link in DNA Labeled with 5'-bromo-2'-deoxyuridine*

Justyna Wiczek, Justyna Miloch, Janusz Rak

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2014, 130, 86–92 IF3.56

D4. *Quantitative Assay of Photoinduced DNA Strand Breaks by Real-Time PCR*

Justyna Wiczek, Kinga Westphal, Janusz Rak

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 128, 480-484 IF3.17

Publikacje przedstawione do recenzji posiadają bardzo wysoki współczynnik oddziaływania: trzy z nich około 3, praca D1 ponad 8.

Ogólna ocena projektu doktorskiego i dokonań naukowych Doktorantki

Moja ogólna ocena dokonań naukowych pani mgr Justyny Wiczek jest bardzo wysoka. Doktorantka opublikowała 9 publikacji naukowych, w tym 7 w międzynarodowych czasopismach naukowych o bardzo dużym współczynniku oddziaływania (łącna wartość IF wynosi 24.676). Jest również współautorką prezentacji na 16 konferencjach międzynarodowych



Politechnika Łódzka

Instytut Techniki Radiacyjnej

dr hab. inż. Marian Wolszczak

(zagranicznych 2 wystąpienia ustne, 14 plakatów) i 13 krajowych (5 referatów i 8 plakatów). Odbyła staż naukowy w Interdisciplinary Center for Nanotoxicity, Jackson State University, Jackson, Mississippi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (maj-wrzesień, 2014). Pani magister Wiczek brała udział w realizacji czterech grantów badawczych oraz kierowała Projektem dla Młodych Naukowców i Doktorantów Uniwersytetu Gdańskiego. Jest również dwukrotną beneficjentką stypendium dla najlepszych doktorantów macierzystego Wydziału, a także dwukrotną stypendystką dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych. Uzyskała nagrodę za najlepszą pracę doświadczalną na X Rzeszowskiej Konferencji Młodych Fizyków (2015 rok), a jej prezentacja na Konferencji Młodych Naukowców w Krakowie (2014 rok) została wyróżniona. Uczestnictwo w licznych kursach i szkoleniach oraz uzyskanie 9 certyfikatów, dotyczących metod analitycznych w diagnostyce, nauce i przemyśle, świadczą o wyjątkowych kwalifikacjach do prowadzenia prac eksperymentalnych. **Dorobek Doktorantki jest ponadprzeciętny, ze względu na liczbę i wysoki poziom publikacji i prezentacji konferencyjnych.**

Badania zostały precyzyjnie zaplanowane, profesjonalnie wykonane przy użyciu często pionierskich technik pomiarowych, a analiza uzyskanych danych jest wnikliwa. **Na szczególne wyróżnienie zasługuje przedstawienie oryginalnych tez oraz ich wiarygodne uzasadnienie.** Mam tu na myśli szczególnie wyjaśnienie mechanizmu degradacji modelowych oligonukleotydów znakowanych 5-BrdU, 5-bromo-2'-deoksycytydyną (5-BrdC), 8-bromo-2'-deoksyadenozyna (8-BrdA) lub 8-bromo-2'-deoksyguanozyna (8-BrdG) indukowanej solwatowanymi elektronami, a także analizę pojedynczych pęknięć nici indukowanych promieniowaniem UV w polinukleotydach modyfikowanych atomem chlorowca.

Uwagi szczegółowe i dyskusja

Rozprawa doktorska obejmuje 47 stron druku. Jej układ nie budzi zastrzeżeń i odpowiada ogólnie przyjętemu schematowi prezentacji prac naukowych. Otwiera ją wykaz publikacji, będących podstawą pracy. We wstępie Autorka opisuje chemioterapię jako obiecującą alternatywę dla klasycznych metod leczenia chorób nowotworowych. Chemoradioterapia to selektywne uwrażliwienie DNA komórek nowotworowych za pomocą substancji chemicznych (leków), dostarczonych przed ekspozycją na promieniowanie wysokoenergetyczne. Nie jest ona prostą sumą radio- i chemioterapii, ale charakteryzuje się synergizmem działania. Zasady





nukleinowe specyficznym modyfikowane atomem chlorowca (MZN) są grupą związków, które mogą znaleźć zastosowanie w tego typu terapii. MZN ze względu na podobieństwo strukturalne do natywnych zasad nukleinowych mogą być efektywnie wcielane przez polimerazy komórkowe do DNA komórek organizmu ludzkiego. DNA zawierający modyfikowane nukleozydy posiada te same cechy, co jego natywny odpowiednik i dopiero promieniowanie jonizujące lub UV indukuje degradację tkanki nowotworowej. Praca doktorska mgr Wiczek dotyczy tej aktualnej i ważnej tematyki badawczej, i mieści się w szerokim programie badań, jakie prowadzi jej promotor, Pan Prof. Janusz Rak. Jego zespół znany jest z szeregu ważnych dokonań, zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i teoretycznych, dotyczących uszkodzeń DNA. O randze tych badań świadczą m.in. bardzo liczne cytowania.

W ramach pracy doktorskiej Autorka postawiła sobie cztery główne cele:

1. Zbadanie mechanizmu fotochemicznego tworzenia się pojedynczego pęknięcia nici w dupleksie DNA, znakowanym punktowo 5-BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyna).
2. Wyjaśnienie mechanizmu, indukowanej solwatowanymi elektronami, degradacji modelowych oligonukleotydów znakowanych 5-BrdU, 5-bromo-2'-deoksytydyną (5-BrdC), 8-bromo-2'-deoksyadenozyna (8-BrdA) lub 8-bromo-2'-deoksyguanozyna (8-BrdG).
3. Optymalizacja protokołu denaturującej wysokosprawnej chromatografii ciekowej (DHPLC) do prostej i szybkiej analizy uszkodzeń DNA, jako alternatywy dla powszechnie wykorzystywanej elektroforezy żelowej.
4. Opracowanie warunków analizy pojedynczych pęknięć nici, wykorzystującej ilościową łańcuchową reakcję polimerazy (qPCR – ang. *quantitative polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem sondy TaqMan.

W rozdziale 2 mgr Wiczek przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący uszkodzeń DNA, indukowanych promieniowaniem elektromagnetycznym: światłem i jonizującym. Autorka szczególną uwagę poświęciła nukleozydom o właściwościach radio- i fotosensybilizujących. Na pochwałę zasługuje zastosowanie licznych schematów, ułatwiających zrozumienie mechanizmów uszkodzeń DNA, znakowanego atomami chlorowca. Cel pracy został podany w rozdziale 3. Kolejny – 4 rozdział, zatytułowany: *O mechanizmach foto- i radiodegradacji DNA znakowanego bromopochodnymi zasad nukleinowych* jest rodzajem przewodnika, dotyczącego najważniejszych aspektów badań opisanych w publikacjach **D1** i **D2**. Z treści tego rozdziału wynika, że wykorzystanie denaturującej wysokosprawnej chromatografii ciekowej (DHPLC), zamiast powszechnie stosowanej denaturującej elektroforezy



poliakrylamidowej, pozwoliło na wyjaśnienie kontrowersji dotyczących mechanizmu tworzenia się fotouszkodzeń DNA znakowanego 5-bromouracylem. Badania opisane w pracy **D1** pokazały, że uszkodzenie interpretowane jako pierwotne pęknięcie nici DNA, w rzeczywistości jest pęknięciem wtórnym, tworzącym się na skutek termicznej degradacji niestabilnego 2'-deoksyrybonolaktanu. Ta ważna obserwacja została potwierdzona metodą ESI-MS (spektroskopia masowa z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym). Właściwości radiouczulające bromowanych zasad nukleinowych zostały zbadane metodami chemii radiacyjnej z wykorzystaniem trinukleotydów, w których dwie cząsteczki tyminy otaczały natywne zasady nukleinowe (X) lub ich bromowane pochodne (Y). Otrzymane i opisane w publikacji **D2** wyniki wykazały, że reagujące z trinukleotydami elektrony hydratowane nie prowadzą do uszkodzenia badanych natywnych fragmentów DNA. Znaczące zwiększenie podatności na uszkodzenia indukowane przez promieniowanie jonizujące zaobserwowano dla zmodyfikowanych bromem zasad. Spośród przebadanej grupy bromopochodnych nukleozydów wskazano te, które powinny najefektywniej prowadzić do nienaprawialnych uszkodzeń na poziomie komórkowym. Są to 5-bromo-2'-deoksycytydina oraz 5-bromo-2'-deoksyurydina.

W pracy **D3** zbadano produkty fotolizy światłem UVG (300 nm) wodnych roztworów 40-merowego, dwuniciowego oligonukleotydu, punktowo znakowanego 5-BrdU (ds40Br) (5'-GAA TCA GGG GAT AAC GCA GGA GAA AABrU ATG TGA GCA AAA G-3' (ss40Br) oraz jednoniciowego oligonukleotydu-5'-CTT TTG CTC ACA TAT TTT CTC CTG CGT TAT CCC CTG ATT C-3' (ss40komp). Fotoprodukty analizowano za pomocą DHPLC, ESI-MS, chromatografii ciekłowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz denaturującej metody PAGE. Zaproponowana przez Autorkę metodologia eksperymentalna wykorzystująca DHPLC umożliwiła nie tylko detekcję pęknięć nici DNA, ale także innych typów uszkodzeń, takich jak dimery. Przy pomocy trawienia enzymatycznego sprzężonego ze spektroskopią mas udało się dokładnie określić ich strukturę. Wykazano powstawanie wewnątrznicowego dimeru pomiędzy A (adeniną) i U (uracylem). Ta praca (w zgodzie z publikacją **D1**) w pełni zaprezentowała przewagę DHPLC nad elektroforezą żelową w analizie uszkodzeń oligonukleotydów, modyfikowanych chlorowcem.

Rozdział 5 Opisu projektu doktorskiego nosi intrygujący tytuł: *Jak zwiększyć arsenal metod do badań uszkodzeń DNA?*

W omawianym Rozdziale Autorka opisała klasyczne, rutynowe sposoby oznaczania uszkodzeń w biopolimerach. Przeanalizowała w nim wady metod



bazujących na rozdzielach elektroforetycznych z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych, a jako alternatywę dla drogiej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem masowym zastosowała technikę ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR w czasie rzeczywistym).

W publikacji **D4** opisano uszkodzenia typu SSB w DNA. Zaprojektowana sekwencja przedstawiona na Rysunku 17 zawierała zbadany już wcześniej (praca **D1**) reaktywny fotochemicznie motyw (5'-CAABrUA-3'), wbudowany do odcinka, składającego się z 75 par zasad (ds75Br), którego obecność prowadzi do pęknięć nici. Do oznaczenia ilości pęknięć wykorzystano sondę typu TaqMan w której na końcu 5' znajdował się fluorofor zwany reporterem (6-FAM – 6-karboksyfluoresceina), natomiast na końcu 3' – wygaszacz (BHQ-1 – Black Hole Quencher 1-[(4-(2-nitro-4-metylo-fenilo)-azo)-yl-((2-metoksy-5-metyl-fenilo)-azo)]-anilina. W wyniku procesu FRET (rezonansowego przeniesienia energii zgodnie z mechanizmem Förstera) fluorescencja była wygaszona. Na etapie elongacji łańcucha dochodzi do degradacji sondy przez polimerazę Taq, (posiadającą aktywność 5'-egzonukleazy), a uwolniony reporter fluoryzuje. Do hydrolizy sondy może dojść wyłącznie podczas elongacji nieuszkodzonego fragmentu DNA.

Wiarygodność pomiarów wykonanych techniką qPCR, potwierdzono niezależną metodą. Z sukcesem zastosowano technikę DHPLC, sprzężoną z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-MS), która umożliwia ilościowe oznaczenie SSB. W pracy **D4** wykazano, że różnice wartości uszkodzeń mierzone obiema metodami nie przekraczają 1,7 %. Jest to bardzo dobry wynik, świadczący o tym, że wykorzystana metoda qPCR może być z powodzeniem stosowana do ilościowych badań nad degradacją znakowanego DNA. Umożliwia ona również określenie miejsca uszkodzenia DNA.

Praca jest napisana poprawnym językiem, w sposób jasny, wystarczająco zwięzły, bez zbędnych komentarzy co sprawia, że zapoznanie z treścią projektu doktorskiego jest łatwe. Cytowane źródła literaturowe (105 pozycji), ilustrujące omawiane zagadnienia zostały prawidłowo dobrane.

Realizacja zaplanowanych badań wymagała od doktorantki znakomitego przygotowania teoretycznego w zakresie biologii molekularnej, chemii radiacyjnej, spektroskopii optycznej oraz praktycznej umiejętności stosowania zaawansowanych metod analitycznych i fizykochemicznych. Nieliczne błędy stylistyczne i żargonowe są wynikiem prób unikania powtórzeń, gdyż Autorka kilkakrotnie stosuje prawidłowe sformułowania, by zamienić je wkrótce na błędne.



Na stronie 4 znajduje się tekst: *Powstawanie uszkodzeń DNA indukowanych przez rodniki hydroksylowe (OH^\bullet) –indywidua tworzące się w wyniku radiolizy wody – jest utrudnione przy obniżonym stężeniu tlenu w komórce.^{13,14} Z drugiej strony w warunkach hipoksji zaabsorbowane promieniowanie skutkuje powstaniem mało reaktywnych solwatowanych elektronów (e_{sol}) w takiej samej ilości co rodniki OH^\bullet .¹⁵*

Powyższy akapit wskazuje, że skróty myślowe mogą prowadzić do błędnych wniosków. Elektron hydratowany nie jest mało reaktywny, przeciwnie to wyjątkowo reaktywne indywiduum redukujące. Z całą pewnością Autorka o tym wie, pisząc w publikacji **D2**, że e_{aq}^- reaguje z zasadami nukleinowymi ze stałą szybkości, kontrolowaną dyfuzyjnie. Na stronie 24 zamieszczono zdanie: *Otrzymane wyniki wskazują jednoznacznie na brak reaktywności e_{sol} generowanych w wyniku działania promieniowania jonizującego na wodę, wobec natywnego DNA, co sugeruje również ich znikomą rolę w radioterapii.*

Rozumiem intencje Autorki: elektron hydratowany w reakcji z DNA nie prowadzi do znaczących uszkodzeń biopolimeru. Jednakże, stała szybkości reakcji e_{aq}^- z DNA wynosi ponad $10^8 \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Nie jest więc to wartość mała. Poprawnie należałoby powiedzieć, że reakcje elektronu hydratowanego z cząsteczkami zmiatacza, związanego z polielektrolitem są znacząco spowolnione w odniesieniu do układu homogenicznego. Przyczyny tego są dwie: elektrostatyczne odpychanie elektronu hydratowanego od ujemnie naładowanego łańcucha polielektrolitu oraz czynnik geometryczny (będący konsekwencją nałożenia sfer wychwytu elektronu przez cząsteczki zmiatacza skumulowane w strukturze polimeru). W przypadku krótkich fragmentów DNA obniżenie stałej szybkości zmiatania e_{aq}^- powinno być małe w odniesieniu do zasady nukleinowej. Można więc w przypadku trimerów stwierdzić, że elektron hydratowany reaguje z DNA, ale nie uszkadza go.

Ponadto sędzę, że wprowadzanie przez Autorkę własnych skrótów dla elektronu solwatowanego: e_{sol} i rodnika hydroksylowego: OH^\bullet nie było trafne. Skrót e_{sol} nie uwzględnia ładunku, a w skrótce OH^\bullet kropka oznaczająca rodnik powinna być umiejscowiona przy symbolu tlenu. W publikacji Autorka zastosowała poprawne skróty i takowe powinny być wykorzystane również w tekście rozprawy. W mojej opinii, w pracy należało unikać żargonowego określenia „naświetlanie” w odniesieniu do oddziaływania promieniowania jonizującego na DNA. Jest to szczególnie niefortunne, gdyż Autorka w badaniach stosowała zarówno światło (promieniowanie optyczne) jak i promieniowanie jonizujące. W odniesieniu do tego ostatniego, wśród chemików radiacyjnych od lat przyjęty jest termin "napromieniowanie".



Inne drobne błędy to:

- wielokrotnie użyte sformułowanie *Rysunek* zamiast *Rysunku* strony (19, 21, 22, 23, 31, 33, 36, 37)
- strony 22 i 23 występują w pracy podwójnie
- błędnie oznaczono strony suplementu publikacji **D2**
- w tytule publikacji **D3** (strona 2 i oświadczenie Autorki) zamiast *intrastrand* jest *intrastarand*
- użyte na stronie 34 sformułowanie ..., *a uwolniony reporter emituje fluorescencję* jest tautologizmem, wystarczy napisać ..., *a uwolniony reporter fluoryzuje*

Podsumowanie

Od ponad trzydziestu lat stosuję w badaniach techniki radiacyjne oraz spektroskopii optycznej i sędzę, że upoważnia mnie to do stwierdzenia, że materiał doświadczalny został zebrany w sposób **profesjonalny i wyjątkowo rzetelny**. Dużym sukcesem jest wykorzystanie w analizie pęknięć nici DNA denaturującej wysokosprawnej chromatografii cieczowej zamiast klasycznej elektroforezy poliakrylamidowej. Na szczególne wyróżnienie zasługuje pionierskie zastosowanie techniki RT-PCR do analizy ilościowej uszkodzeń indukowanych światłem w znakowanym DNA. Autorka nie tylko zastosowała te wymienione powyżej metody pomiarowe, ale wyniki badań potwierdziła alternatywnymi, klasycznymi sposobami. Załączone publikacje zawierają niezbędne informacje, umożliwiające powtórzenie pomiarów w niezależnych badaniach. Chciałbym stwierdzić, że rozprawa pani mgr Justyny Wiczki stanowiła dla mnie zajmującą lekturę ze względu na zawarty w niej bardzo bogaty materiał doświadczalny i zagadnienia związane z ciekawą, a nową dla mnie tematyką, dotyczącą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy. Nie ulega wątpliwości, że doktorantka w pełni zrealizowała zamierzony cel badań, uzyskując bardzo ciekawe i cenne wyniki, które stanowią znakomitą podstawę do dalszych badań z tego zakresu.

Autorka konkluduje swoją pracę doktorską ostrożnym stwierdzeniem: ” *W ten sposób komórka nowotworowa mogłaby zostać pozbawiona naturalnych mechanizmów naprawczych, a wówczas już stosunkowo niewielkie dawki promieniowania powinny prowadzić do efektów letalnych. Zatem moje badania powinny przyczynić się do opracowania nowej, bezpieczniejszej terapii przeciwnowotworowej.*” W mojej ocenie wyniki pracy doktorskiej dostarczyły cennych informacji rokujących praktyczne zastosowanie zmodyfikowanych zasad nukleinowych w leczeniu chorób nowotworowych. Gratulując Autorce **świetnej** pracy doktorskiej, życzę jej,



Politechnika Łódzka

Instytut Techniki Radiacyjnej

dr hab. inż. Marian Wolszczak

aby któryś z przebadanych związków okazał się lekiem stosowanym w medycynie (układem modelowym w dalszych pracach już są)!

Oceniając wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej w konkluzji stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa spełnia standardy stawiane pracom doktorskim oraz wymogi *art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 (Dz U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami)* i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Justyny Wiczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska pani mgr Justyny Agaty Wiczek zarówno swym zakresem, poziomem badań jak i rangą osiągnięć naukowych wykracza poza poziom typowych prac doktorskich. **W związku z tym wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.**

Marian Wolszczak

