



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

dr hab. inż. Marian Wolszczak

RECENZJA pracy doktorskiej pani mgr Kingi Westphal pt. Radio- i fotoliza znakowanego DNA. Od syntezy modyfikowanych oligonukleotydów do zależności sekwencyjnej fotouszkodzeń

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Westphal została wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Raka. Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna, o dużym aspekcie poznawczym i jest istotna z punktu widzenia potencjalnych zastosowań farmakologicznych modyfikowanych nukleotydów.

Prof. Janusz Rak i jego zespół znany jest z szeregu ważnych dokonań, zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i teoretycznych, dotyczących reakcji rodnikowych w układach biologicznie ważnych. O randze tych badań świadczą m.in. bardzo liczne cytowania. Profesor Rak współpracuje także z wiodącymi światowymi ośrodkami zajmującymi się oddziaływaniem promieniowania jonizującego i światła z biomolekułami. Jego Pracownia jest jednym z najważniejszych miejsc prowadzących takie badania.

Wykaz publikacji składających się na projekt doktorski obejmuje trzy następujące pozycje:

1. *The sequence dependence of photoinduced single strand break in 5-bromo-2'-deoxyuridine labeled DNA supports that electron transfer is responsible for the damage*

Kinga Westphal, Samanta Makurat, Janusz Rak

Journal of Physical Chemistry B, 2017, 121, 9169-9174. IF 3.146

2. *Radiation damage to single stranded oligonucleotide labeled with 5-iodopyrimidines*

Kinga Westphal, Konrad Skotnicki, Krzysztof Bobrowski, Janusz Rak

Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14, 9331-9337. IF 3.423

3. *Chemically-enzymatic synthesis of photosensitive DNA*

Kinga Westphal, Magdalena Zdrowowicz, Agnieszka Żylicz-Stachula, Janusz Rak

Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2017, 167, 228-235. IF 3.165



Ogólna ocena projektu doktorskiego i dokonań naukowych Doktorantki

Dorobek naukowy magister Westphal obejmuje dziewięć publikacji (siedem z listy filadelfijskiej – Thomson Reuters Scientific Master Journal List) w tym rozdział w książce Handbook of Computational Chemistry 2017. Prace były cytowane 40 razy. Indeks Hirsha doktorantki wynosi 4, a łączny wskaźnik oddziaływania publikacji jest bliski dwudziestu (19.134).

Jest ona współautorką prezentacji na 12 konferencjach międzynarodowych i 11 krajowych. W dorobku ma dwa staże zagraniczne: pierwszy w ramach programu Maria Curie Actions NanoBRIDGES – building Bridges between specialists on computational and empirical risk assessment of engineered-nanomaterials – Jackson State University, Jackson, USA, który odbył się w terminie od maja do września 2014 roku, oraz drugi, który w ramach programu Visiting Research Graduate Traineeship realizowany jest od lipca 2017 w Centrum Chorób Neurodegeneracyjnych w Dallas (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA). Pani mgr Westphal brała udział w pięciu projektach badawczych w tym dwóch przyznawanych przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 3, numer UMO-2012/05/B/ST5/00368 oraz Maestro 6, numer: 2014/14/A/ST4/00405). W projektach w których instytucją przyznającą był Uniwersytet Gdański pełniła rolę kierownika (projekty 538-8227-B728-15, 538-8227-B099-15/16 oraz 538-8277-B433-16/17). Jest również dwukrotną beneficjentką stypendium dla najlepszych doktorantów macierzystego Wydziału, a także trzykrotną stypendystką dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych. Praca magisterska Autorki, zatytułowana „*Opracowanie warunków powielania i delecyjnej mutagenyzy syntetycznego genu kodującego bifunkcyjną endonukleazę TaqI*” została przez Polskie Towarzystwo Chemiczne (oddział Gdański) uznana za najlepszą pracę dyplomową 2014 roku. W 2016 roku na Konferencji Młodych Fizyków organizowanej przez Uniwersytet Rzeszowski jej prezentacja plakatu była najlepszą pracą o charakterze eksperymentalnym.

Dorobek Doktorantki jest ponadprzeciętny, ze względu na liczbę i wysoki poziom publikacji naukowych.

Uwagi szczegółowe i dyskusja

Autorka w ramach projektu doktorskiego postanowiła zrealizować trzy podstawowe zagadnienia:

1. Wyznaczenie wydajności powstawania fotoindukowanych pęknięć w dwuniciowym fragmencie DNA, znakowanego motywem 5'-XGAABrUY-3', w którym X i Y wpływają na potencjał jonizacji guanozyny oraz powinowactwa elektronowego modyfikowanego nukleozydu (mNz).
2. Przeprowadzenie jakościowej i ilościowej analizy procesu radiolizy jednoniciowych fragmentów DNA znakowanych komercyjnie dostępnymi jodopochodnymi zasad azotowych.
3. Synteza znakowanych fragmentów DNA o dowolnej sekwencji, które umożliwią testowanie właściwości modyfikowanych foto-/radiosensybilizujących nukleozydów.

Opisując zadanie 1 Autorka stwierdziła, że wprowadzenie do DNA 5-bromo-2'-deoksyurydynyny zwiększa podatność biopolimeru na degradację indukowaną promieniowaniem UV w zakresie >290 nm. Jednoniciowe pęknięcia DNA powstają na skutek długozasięgowego transferu elektronu z reszty guaniny do wzbudzonej

światłem ultrafioletowym reszty BrdU. W wyniku transferu elektronu powstaje wysoce niestabilny anionorodnik BrdU, który dysocjuje na anion bromkowy i reaktywny rodnik urydylowy. Ten ostatni jest stabilizowany przez oderwanie atomu wodoru od sąsiadującej reszty cukrowej. Prowadzi to do przzerwania helisy DNA. W ramach projektu poddano naświetleniu UV siedem dwuniciowych fragmentów DNA zawierających 25 par zasad, w strukturze których znajdował się stały fragment 5'-XCAABrUY-3' (Schemat 1), gdzie symbole X lub Y reprezentują zasady A, G, C lub T. Zlokalizowane w obrębie motywu dwie grupy A stanowią łącznik między donorem elektronu (guaniną zlokalizowaną w nici komplementarnej) a modyfikowanym nukleozydem, umożliwiając wydajny transfer elektronu. Nukleotyd komplementarny do X modyfikuje potencjał jonizacji guaniny zaś nukleotyd Y zmienia powinowactwo elektronowe 5-BrdU. Analiza wyników chromatografii cieczowej (sprzęgniętej ze spektrometrią mas) naświetlonych roztworów badanych łańcuchów DNA wykazała, że największą wydajność zrywania nici odnotowano w przypadku sekwencji zawierającej motyw 5'-CCAABrUT-3'. W tym eksperymencie prawie 30% znakowanego oligonukleotydu uległo uszkodzeniu. Natomiast jeśli zamiast reszty tymidyny z 5-BrdU sąsiaduje guanozyna, wydajność kwantowa uszkodzenia oligonukleotydu znacząco maleje - do 2% [praca 1]. Stosując teorię Marcusa, Autorka potwierdziła, że za proces uszkodzenia DNA odpowiada fotoindukowany transfer elektronu. Uogólniając, wydajność fotouszkodzeń zmodyfikowanego DNA jest mała a sekwencja zasad azotowych w łańcuchu DNA warunkuje fotouczulające właściwości znacznika. Stochastyczny charakter modyfikacji DNA w komórce sprawia, że prawdopodobieństwo wystąpienia sekwencji o dużej wydajności zrywania nici jest bardzo małe. Wyjaśnia to dlaczego modyfikowane nukleozydy wciąż nie znajdują zastosowania w praktyce klinicznej.

Publikacja [2] została wykonana we współpracy z grupą badawczą profesora Krzysztofa Bobrowskiego z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Praca dotyczyła radiolizy odtlenionych, wodnych roztworów jednoniciowych trinukleotydów znakowanych 5-IdU lub 5-IdC w obecności zmiatacza rodników hydroksylowych. Warunki eksperymentu pozwoliły śledzić reakcję badanych nukleotydów jedynie z elektronami hydratowanymi. W wyniku ilościowej analizy chromatograficznej (sprzężonej ze spektrometrią mas) zidentyfikowano związki świadczące o uszkodzeniu struktury analizowanych trinukleotydów. Wykazano, że następuje przerwanie ciągłości nici. Jest to bardzo cenna informacja. Strukturę każdego z produktów radiolizy potwierdzono przy użyciu wzorców chromatograficznych. Dwa razy większa wydajność powstawania radiacyjnych uszkodzeń jodopodstawionych zasad nukleinowych w stosunku do degradacji bromopodstawionych wskazuje, że oligonukleotydy znakowane 5-IC lub 5-IU mogą być skutecznymi lekami w radioterapii nowotworów.

Kolejnym etapem projektu doktorskiego mgr Kingi Westphal była synteza dwuniciowych DNA składających się z trzydziestu lub siedemdziesięciu pięciu par zasad, zawierających zmodyfikowaną jednostkę 5-BrdU. W tym celu zoptymalizowano opisaną w literaturze [1] metodę enzymatycznej syntezy DNA co pozwoliło wprowadzić 5-BrdU w ściśle określoną pozycję helisy. Autorka potwierdziła mechanizm degradacji DNA, zgodnie z którym światło UV prowadzi do wzbudzenia mNZ i jego konwersji do U z jednoczesnym uwolnieniem reszty adeniny,

co skutkuje powstaniem dwóch krótszych fragmentów: ss13P (5'-TAT CTA GAC AGC A-P-3') oraz ssP16 (5'-P-UAACTC ATA TCA GTC A-3') [publikacja 3].

Autorka projektu doktorskiego umiejętnie posługuje się językiem ojczystym co sprawia, że pracę czyta się łatwo. Niestety często stosuje skróty myślowe, które prowadzą do tworzenia nieprecezyjnych sformułowań. I tak na stronie dziewiątej stwierdza, że radioliza jest reakcją. Mam pełną świadomość, że Pani mgr Westphal wie jak złożonym procesem jest oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią. Przy użyciu zapisu typowego dla reakcji chemicznej, można jedynie zaprezentować np. jakie produkty radiolizy wody i w jakiej ilości powstają. Wśród produktów radiolizy wymieniony został tlen. Radioliza wody w warunkach beztlenowych, przy zastosowanym przez Autorkę rodzaju promieniowania jonizującego, nie prowadzi do generowania tlenu. W roztworach napowietrzonych czy nasyconych tlenem wśród produktów radiolizy wody formalnie pojawia się tlen. Jest to wynikiem reakcji następczych rodników $O_2^{\cdot-}$ lub HO_2^{\cdot} . Należy podkreślić, że w tym przypadku nie powstają dodatkowe cząsteczki tlenu. Molekuły tlenu są regenerowane. Tlen może być generowany w warunkach beztlenowych jedynie podczas radiolizy układów wodnych przy zastosowaniu promieniowania o dużej wartości LET [1]. Brak mi w opisie projektu doktorskiego widm absorpcyjnych badanych związków. Jest to istotne gdyż widmo dupleksu DNA zawierającego 5-BrdU [3] wykazuje maksimum dla 290 nm ale jest asymetryczne i sięga do 340 nm. Absorbancja dla 320 nm jest mała i trudno oszacować jaka część światła użytego do wzbudzenia jest pochłonięta. W aneksie do publikacji (3) zamieszczono informację o molowych współczynnikach absorpcji modyfikowanych nukleotydów, ale nie podano długości fali dla których zostały one obliczone.

W opisie projektu doktorskiego Autorka zasugerowała, że badane przez nią modyfikowane nukleozydy (mNz) mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych. Wymieniła dwie terapie, radioterapię i terapię fotodynamiczną (PDT). Interesuje mnie w jaki sposób można wykorzystać mNz w PDT? Wiadomo, że światło UV nie przenika w głąb skóry czy tkanek (np. pęcherza). Użyte w pomiarach światło (320 nm) wnika w tkankę na kilkadziesiąt μm . Czy można zerwać wiązanie C-I w mNz z wykorzystaniem procesów wielofotonowych przy zastosowaniu światła z zakresu widzialnego?

Bardzo wysoko oceniam przegląd literatury (zawarty w rozdziale 2.2 i 2.3.1.1) dotyczący antynowotworowych właściwości modyfikowanych atomami chlorowca nukleotydów. Przegląd dotyczy m.in. radiolizy roztworów DNA, w składzie którego występują zasady nukleotydowe modyfikowane atomem chlorowca. Autorka opisuje w nim reakcje DNA i nukleotydów z elektronem hydratowanym. Jest to uzasadnione bo te elektrony stosuje w pomiarach. Prosiłbym Autorkę aby podczas publicznej obrony pracy skomentowała reaktywność elektronów suchych z badanymi nukleotydami. Interesuje mnie to w kontekście terapii nowotworowej z wykorzystaniem mikrowiązek promieniowania X lub jonów oraz z powodu czysto naukowego -dysocjatywnego wychwytu elektronu.

Drobne uwagi edytorskie i redakcyjne

Skrót min. zapisywany z kropką oznacza wyrazy minimum, minimalny lub... minister. Skrót min stosowany bez kropki oznacza minutę. Taki skrót powinien być zastosowany w przedstawionym do recenzji projekcie. Domyślam się, że ten drobny

błąd został spowodowany tym, iż skróty godziny, miesiąca czy roku zapisujemy z kropką (odpowiednio godz., m. lub r.), lecz skróty te nie mają statusu symboli wielkości fizycznych.

Na stronie 6 brakuje symbolu (-) w zapisie elektronu solwatowanego.

Na stronie 7 zamiast „fotouczulającą” winno być „fotouczulające”

W schemacie zaprezentowanym na rysunku 1 „zaginał” symbol X i znak (-) a na rysunku 3 Br⁻.

W przedstawionym na Rysunku 5 schemacie brakuje atomu jodu (pierwszy etap heterolizy).

Opis rysunku 3 na stronie 14 jest niepoprawny. To nie jest fotoindukowany mechanizm... a Mechanizm fotoindukowanego powstawania rybonolaktonu i erytrozy

Skrót PSET (strona 15) może być pominięty, gdyż nie użyto go w tekście ani razu.

Na stronie 15 napisano sekwenjach zamiast sekwencjach.

Na stronie 17 opis do rysunku jest zbyt lakoniczny, możemy na nim dostrzec więcej niż wiązanie C-I.

Terminologia fotochemiczna i radiacyjna w języku polskim jest dość dobrze zdefiniowana. Istniejące glosariusze i podręczniki pozwalają na weryfikację intuicyjne stosowanych terminów z tymi zalecanymi. Autorka w pracy doktorskiej używa pojęcia fotowrażliwość. Jest to pojęcie medyczne i oznacza wystąpienie zmian w odpowiedzi na fotostymulację organizmu. Właściwym pojęciem jest fotosensybilizacja lub fotouczulenie. Stosowanie odpowiednich terminów jest trudne i zdecydowanie wymaga odwołania się do źródeł. Dobrym przykładem jest omawiane pojęcie. Autorka w publikacji angielskojęzycznej stosuje termin *photosensitizer* (fotosensybilizator, fotouczulacz) oraz *photosensitivity* tłumacząc ten drugi wyraz formalnie prawidłowo („dosłownie”) jako fotowrażliwość. Z treści publikacji wynika, że fotoczulość jest lepszą nazwą. Jednorazowo termin ten został w pracy wykorzystany. W mechanistycznej fotochemii termin „fotosensybilizacja” jest ograniczany do przypadków, w których fotosensybilizator nie jest zużywany. Kolejnym przykładem trudnego pojęcia jest termin: ekspozycja łac. *expositio* = wyłożenie, ma w języku polskim bardzo wiele znaczeń. W kontekście fotograficznym oznacza naświetlanie, więc można powiedzieć ekspozycja światłem. Tak chemicy radiacyjni zwykli ten termin stosować podczas opisu napromieniania (np. ekspozycja dawką). Oczywiście, termin ekspozycja na promieniowanie UV stosowany konsekwentnie w pracy jest również prawidłowy, bo oznacza poddanie/wystawienie na działanie czegoś. Jako osoba starej daty nie jestem zwolennikiem wprowadzenia do języka specjalistycznego zbyt dużej ilości pojęć adaptowanych z języka angielskiego. Mam świadomość, że terminy naukowe aktualnie stosowane w języku polskim to wyrazy obce, przyswojone dawno. Autor ma prawo stosować w opisie wyników badań nowe terminy, ale tylko wtedy gdy je objaśnia. Brak mi definicji pojęcia „fotolit” czy „suplementowany”.

W odnośniku 74 popełniono dwa błędy, Bryan jest imieniem autora o nazwisku Oronsky, natomiast w nazwisku Knox pominięto ostatnią literę.

Lista publikacji

1. N. Suzuki and M. Fukushima, *Simple and rapid enzymatic method for the synthesis of single-strand oligonucleotides containing trifluorothymidine* Nucleos. Nucleot. Nucl., 29 (2010) 896-904
2. J. Meesungnoen and J.-P. Jay-Geri, *High-LET Ion Radiolysis of Water: Oxygen production in Tracks* Radiation Res. **171** (2009) 379-386
3. P. Storoniak, J. Rak, K. Polska and L. Blancafort, *Local Excitation of the 5-Bromouracil Chromophore in DNA. Computational and UV Spectroscopic Studies* J. Phys. Chem. **115** (2011) 4532-4537

Podsumowanie

W projekcie doktorskim Autorka zaplanowała trzy ambitne cele, które w pełni zrealizowała. Materiał doświadczalny został zebrany w sposób profesjonalny i wyjątkowo rzetelny. Dużym sukcesem pracy jest wyjaśnienie dlaczego 5BrU i inne stosowane dotychczas w praktyce klinicznej mNz nie były skuteczne. Na szczególne wyróżnienie zasługuje usystematyzowanie radiouczulających właściwości jodopodstawionych nukleozydów: 5-IdC i 5-IdU. Mgr Westphal wykazała, że te nukleozydy są dwukrotnie efektywniejszymi zmiataczami w reakcji z elektronami hydratowanymi niż ich bromowane odpowiedniki. Opracowanie nowej, enzymatycznej metody syntezy dupleksów DNA o długości 30 i 75 zawierających modyfikowane zasady nukleinowe punktowo zlokalizowane w wybranym miejscu helisy stanowi znakomitą podstawę do dalszych badań.

Chciałbym stwierdzić, że rozprawa pani mgr Kingi Westphal stanowiła dla mnie zajmującą lekturę ze względu na zawarty w niej bardzo bogaty materiał doświadczalny i zagadnienia związane z bliską mi tematyką. Nie ulega wątpliwości, że doktorantka w pełni zrealizowała zamierzony cel badań, uzyskując bardzo ciekawe i cenne wyniki w intensywnie badanej na Świecie dziedzinie.

Oceniając wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej stwierdzam, że przedstawiony przez Doktorantkę projekt doktorski 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 Westphal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Łódź 16-07-2018

Marian Włoch