



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
Ul. Stefanowskiego 2/22, Łódź

Łódź, dnia 25.07.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michał Szewczuka „Wpływ 5',8-cyko-2'-deoksy puryn na aktywność glikozylaz w naprawie uszkodzeń zespolonych DNA”

**wykonanej w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Bolesława T. Karwowskiego.**

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, prof. dr hab. Anny Kilanowicz-Sapota z prośbą o przyjęcie funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Szewczuka.

Zasadność podjętej tematyki

Zapewnienie stabilności genomu i prawidłowe przekazywanie informacji genetycznej zależy od procesu naprawy DNA. Nasze rozumienie podstaw życia organizmów żywych, zarówno w ich fizjologicznym, jak i patologicznym wymiarze, zostało całkowicie zmienione przez badania nad mechanizmami naprawczymi DNA, co daje nadzieję na odkrycie skutecznych metod leczenia najgroźniejszych schorzeń, w tym chorób nowotworowych. Poprawnie działające systemy naprawcze, w tym naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER) oraz naprawa przez wycinanie zasady (BER), jest w stanie usunąć wiele uszkodzeń DNA wywołanych przez czynniki endo- i egzogenne. Z drugiej strony, obecność w materiale genetycznym uszkodzeń bądź mutacji w genach kodujących białka naprawcze prowadzi do rozwoju schorzeń neurodegeneracyjnych, rozwoju nowotworów czy chorób takich jak *Xeroderma pigmentosum*, zespół Blooma, zespół Cockayne'a, trichotiodystrofia, zespół Nijmegen, zespół ataksja–teleangiektazja, czy zespół Wernera.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr inż. Michała Szewczuka wykonana została pod kierunkiem prof. Bolesława Karwowskiego w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zespół kierowany przez prof. Karwowskiego od wielu lat prowadzi z sukcesem badania nad zjawiskiem naprawy

uszkodzeń zespolonych DNA. Pan Szewczuk podjął się zadania oceny wpływu obecności uszkodzeń zespolonych w postaci 5',8-cyko-2'-deoksyipuryn (cdPus) w strukturze DNA na aktywność enzymów naprawczych związanych ze szlakiem BER oraz oceny wpływu obecności cdPus w strukturze DNA na aktywność wybranych enzymów restrykcyjnych. Wybranie celu badań i metod badawczych jest znakomitym tematem pracy doktorskiej, który wpisuje się w nurt badań mogących stać się podstawą poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja zawiera 10 podstawowych rozdziałów. Praca składa się ze 165 stron tekstu wzbogaconego o 37 rysunków i 36 tabel. Układ rozdziałów został przygotowany w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych. Po spisie treści pojawiają się kolejno rozdziały zatytułowane „Cel i założenia pracy”, „Dorobek naukowy”, „Część teoretyczna”, „Dyskusja”, „Część doświadczalna”, „Dane tabelaryczne”, „Wykaz skrótów”, „Wykaz rysunków”, „Wykaz tabel” oraz „Bibliografia”. Należy w tym miejscu zauważyć, że wśród wymienionych rozdziałów brak jest pozycji zatytułowanej „Wyniki”. W rzeczywistości informacje o uzyskanych wynikach można znaleźć w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja”, który wg. mnie został mylnie nazwany i powinien nosić nazwę „Wyniki i Dyskusja”.

W części literaturowej omówione zostały zasadnicze zagadnienia związane z genezą powstawania uszkodzeń DNA, ich charakterystyką, mechanizmami naprawczymi oraz zwięzłą charakterystyką jednostek chorobowych, których patogenezą związana jest z nagromadzeniem uszkodzeń w materiale genetycznym, będących wynikiem mutacji genów kodujących białka systemów naprawczych. Zaprezentowane treści są bardzo dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i dyskusji wyników. Opracowując wstęp teoretyczny Doktorant nie ustrzegł się jednak błędów. W wielu akapitach brak jest odnośników literaturowych do prezentowanych treści (np. na stronach 13-15 widnieje tylko jedna pozycja literaturowa). Mankament ten powtarza się również w kolejnych rozdziałach. Poza tym podrozdział 3.1 zatytułowany „Uszkodzenia materiału genetycznego organizmów żywych” w rzeczywistości zawiera tylko jeden końcowy akapit poświęcony uszkodzeniom, a pozostałe jego treści wypełnione są bardzo podstawowymi informacjami na temat struktury DNA, procesów replikacji i ekspresji genów oraz mutacji, które w pracach takich jak rozprawy doktorskie można z powodzeniem pominąć.

Poza tym w wielu miejscach położenie rysunków i tabel często jest nieadekwatne do opisu tekstowego, np. rys 9 i Tabela 1 znajdują się w innym podrozdziale niż odwołania do nich na wcześniejszych stronach. Ten mankament także powtarza się w pracy kilka razy, co znacznie utrudnia czytelnikowi śledzenie treści zawartych w pracy. Odnośnie zaś samej Tabeli 1 uważam, że zasadne byłoby zawrzeć w niej więcej szczegółowych informacji o porównywanych w niej systemach naprawczych. Również Rysunek 6 i 7 zawierają w większości te same struktury, więc z powodzeniem można było je połączyć.

Moje uwagi dotyczą również tytułów podrozdziałów 3.4.4. „Organizmy eukariotyczne” oraz 3.4.5. „Organizmy prokariotyczne”, które uważam za zbyt mało precyzyjne. Również treści w nich zawarte zawierają często informacje podręcznikowe.

Oдноśnie wstępu teoretycznego proszę o skomentowanie następujących uwag:

- Str 15: Autor dysertacji pisze, iż „Zmiany informacji genetycznej zapisanej w DNA mogą prowadzić do zakłócenia procesów transkrypcji i translacji. W efekcie, syntezowane łańcuchy aminokwasów mogą ulec nieprawidłowemu pofałdowaniu tworząc niefunkcjonalne cząsteczki białek”. Czy tylko proces fałdowania białek może ulec zmianie pod wpływem zmian sekwencji DNA?
- Strona 34: Autor dysertacji pisze, iż „... naprawa uszkodzeń dotyczy całego genomu i może zachodzić zarówno w obrębie fragmentów DNA kodujących konkretne geny, jak również w obrębie fragmentów niekodujących (tzw. wyciszonych).” Czy termin „gen wyciszony” jest tożsamy z „niekodujący” i co oznacza DNA kodujący konkretne geny?
- Str 41: Autor dysertacji pisze „Wirusy infekujące bakterie ... mogą na przykład prowadzić do wbudowywania własnych cząsteczek DNA w genom bakterii..... Podobny mechanizm działania mogą wykazywać wirusy komórek eukariotycznych, jednakże nie dochodzi w ich przypadku do wbudowywania materiału genetycznego w genom gospodarza”. Czy rzeczywiście w przypadku komórek eukariotycznych nie dochodzi do integracji genomu wirusa z genomem gospodarza?

Kolejnych rozdział zatytułowany „Dyskusja” stanowi w rzeczywistości opis uzyskanych wyników połączonych z elementami dyskusji. Po tym rozdziale zamieszczono „Część doświadczalną” opisującą odczynniki, materiał biologiczny (enzymy) oraz procedury poszczególnych eksperymentów.

Na wstępie rozdziału „Dyskusja” Pan Szewczuk przedstawia charakterystykę enzymów, który były obiektem Jego badań, a mianowicie enzymy szlaku BER: glikozylazy DNA uracylowej (UDG), apurynowej/apirymidynowej endonukleazy I (APE1), glikozylazy 8-oksoguaninowa I (OGG1), glikozylazy DNA formamidopirymidynowej (FPG) oraz endonukleazy restrykcyjnej SspI i BsmAI.

W tym miejscu chciałabym zaznaczyć, iż niejasna dla mnie jest informacja na stronie 49 „Produkt komercyjny został wytworzony i wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*, u których jest kodowany przez gen *UNG*” oraz na stronie 54 „Produkt komercyjny został wytworzony oraz wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*, u których jest kodowany przez gen *APE1*”. Na podstawie w/w informacji można odnieść wrażenie, że geny *UNG* i *APE1* występują w bakteriach, a nie zostały do nich wprowadzone.

Jako recenzent pracy chciałabym też zwrócić uwagę na zastosowaną w tej części pracy konwencję dotyczącą nomenklatury genów, która jest błędna. Autor zamiennie używa kursywy oraz prostego kroju czcionki oraz błędnie małych i wielkich liter. Przykładami mogą być Tabela 3, Tabela 4, Tabela 6 i Tabela 7. Dlatego proszę, aby podczas publicznej obrony Pan Szewczuk przypomniał zasady nazewnictwa genów i białek ludzkich, zwierzęcych i bakteryjnych. Poza tym w/w tabelach nazwa kolumny „Oznaczenie” powinna raczej zastąpiona przez „Nazwa białka”.

Mimo powyższych uwag krytycznych część pracy obejmująca opis wyników stanowi bardzo interesujący element pracy doktorskiej Pana Michała Szewczuka. Należy podkreślić, że umiejętne zaplanowanie badań, sformułowanie tez pracy i konsekwentne ich realizowanie dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym. Na uwagę zasługuje osiągnięcie trzech głównych celów, czyli określenie wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność glikozylaz UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny (dU), określenie wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG) oraz określenie wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność endonukleaz restrykcyjnych BsmAI i SspI.

Autor dysertacji zastosował podejście, w którym 40-nukleotydowe jednoniciowe oligonukleotydy zmkowane na końcu 5' końcu za pomocą kinazy polinukleotydowej T4 poddawano hybrydyzacji a następnie inkubacji z badanymi enzymami. Wydajność cięcia analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, a wyniki elektroforezy wizualizowano za pomocą autoradiografii. Oligonukleotydy stanowiące materiał badawczy zaprojektowano w taki sposób, aby 2'-deoksyurydyna występowała w tej samej nici co cdPus, tworząc jednoniciowe uszkodzenia zespolone w dwuniciowej strukturze modelowego DNA. Pan Szewczuk wykazał, że aktywność UDG, hAPE1, OGG1 i FPG wobec dwuniciowych oligonukleotydów zawierających cdPus była wyższa niż w przypadku substratów nie zawierających tych uszkodzeń. W przypadku substratów oligonukleotydowych zawierających w swojej sekwencji pojedynczą cząsteczkę dU, uzyskane wyniki wskazują, że obecność cdPus wpływa na mechanizm hydrolizy miejsca AP przez hAPE1 w większym stopniu niż na mechanizm usuwania cząsteczek uracylu przez UDG. Równie interesujące okazały się wyniki analiz z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych, które stanowią bardzo nowatorski element dysertacji i wskazują, że inhibicja aktywności endonukleaz restrykcyjnych zachodzi przede wszystkim w przypadku obecności uszkodzenia dsDNA w pobliżu miejsca hydrolizy substratu przez enzym. W tym miejscu proszę o skomentowanie wyboru konkretnych enzymów restrykcyjnych w postaci SspI i BsmAI

O znaczeniu uzyskanych wyników świadczy fakt, że zostały one już wcześniej wysoko ocenione przez co najmniej dwóch recenzentów czasopism *Acta Biochimica Polonica* i dwukrotnie *Molecules*. W artykułach opublikowanych w tych czasopismach Pan Michał Szewczuk jest pierwszym autorem. Jednocześnie chciałabym podkreślić, iż pozostały dorobek naukowy Pana Szewczuka również zasługuje na wyrazy uznania. W tym miejscu chciałabym zapytać, dlaczego Doktorant nie zdecydował się na przedstawienie dysertacji w formie cyklu monotematycznych publikacji?

Pan Szewczuk nie ustrzegł się też przed błędów edytorskich i nieścisłości, który z powinności recenzenta przytaczam poniżej

- Str 8: 5,8-cyklo-2'-deoksyguanozyny
- Str 14: Jamer Dewey Watson
- Str 14: anglik
- Str 17: brak rozwinięcia skrótu HZE

- Str 23: urazyłu
- Str 23: „przykład pozytywnej modyfikacji DNA” (w jakim kontekście użyto to sformułowanie?)
- Str 24: węgiel w pozycji 5' cząsteczki cytozyny
- Str 24: brak rozwinięcia po raz pierwszy użytego skrótu 5hmc
- Str 24: i 5-karboksylicytozyny zamiast 5-karboksylocytozyny
- Str 26: brak rozwinięcia po raz pierwszy użytego skrótu SSB i AP
- Str 27: nukleotydu w postaci 7,8-dihydro8-okso-2'-deoksyguanozyny
- Str 30: cysplatyny
- Str 32: komórom
- Str 33 i 56: miejsca
- Str 40: nie udało się rozstrzygnąć (chyba potwierdzić)
- Str 40: wpływu
- Str 42 ulegach
- Str 47 szkrzeli
- Str 49 i 146: Rusynek
- Str 50: Ludzka AP endonukleaza 1, oznaczana jako hAPE1 (ang. human apurinic/apyrimidinic (AP) 51 endonuclease 1) posiada swój analog w komórkach drożdży (m. in. *S. cerevisiae* i *S. pombe*) - raczej homolog a nie analog
- Str 52: statnu, biako
- Str 56: W przypadku
- Str 70: rusynku
- Str 82: dwunioniowe
- Str 92: enzumów
- Str 96: enzm
- Str 103: środowisko
- Str 106 prędkość wirowania wyrażona w obr/min bez podania nazwy sprzętu (w tym przypadku należało użyć x g)
- Używanie zamiennie mol/dm³ i M oraz dsDNA i ds-DNA
- Część stron bez numeracji

Niemniej jednak moje uwagi krytyczne i komentarze nie podważają bardzo pozytywnej oceny wartości naukowej pracy.

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Dlatego prosiłabym Doktoranta o kilka zdań na temat możliwości wykorzystania w praktyce uzyskanych wyników.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pana Michała Szewczuka stwierdzam, że Doktorant trafnie wybrał tematykę badań, jasno sformułował cel pracy, dobrze zaplanował i wykonał doświadczenia, wykazał się umiejętnością interpretacji i dyskusji oraz wyciągania właściwych wniosków, a także umiejętnie sformułował podsumowanie pracy. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest kompleksowym opracowaniem stanowiącym

wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki określone w art. 187 ustawy ust.1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) i wnoszę wniosek do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Michała Szewczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Edyta Gendaszewska-Dammach