



**Politechnika Łódzka**

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

dr hab. inż. Małgorzata Zakłós-Szyda, prof. uczelni  
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka

Łódź, dnia 07.08.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Boguszewskiej  
„Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksy puryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń  
zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Bolesława T. Karwowskiego. Pani Karolina Boguszewska uzyskała tytuł magistra w 2015 roku na kierunku Biotechnologia w specjalności Biotechnologia Molekularna i Biochemia Techniczna na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

Mitochondria odgrywają kluczową rolę w komórkach eukariotycznych. Wiadomo, że zachodzące w mitochondriach reakcje fosforylacji oksydacyjnej dostarczają energii potrzebnej do procesów komórkowych. Ponadto, mitochondria są zaangażowane w inne ważne procesy, jak sygnalizacja komórkowa, śmierć komórki czy też regulacja odpowiedzi immunologicznej. Mitochondria posiadają własny materiał genetyczny zwany mitochondrialnym DNA (mtDNA) kodujący głównie podjednostki białek mitochondrialnego łańcucha oddechowego, ale również rybonukleinowe cząsteczki transportujące. Charakteryzuje się on wielokopijnością zależną od typu komórek, a jednocześnie bezwzględnie wysoką podatnością na mutacje wynikającą z narażenia na bezpośrednie działanie reaktywnych form tlenu wytwarzanych podczas oddychania komórkowego. Mutacje w mtDNA są związane z licznymi schorzeniami, w tym z chorobami neurodegeneracyjnymi, przyspieszonym procesem starzenia, zaburzeniem metabolizmu i przede wszystkim nowotworami. Mimo to wiedza dotycząca mechanizmów naprawy mtDNA ciągle pozostaje ograniczona. Pomimo zaangażowania wielu laboratoriów naukowych w

badania nad terapiami wywołującymi uszkodzenia DNA lub markerami związanymi z jego uszkodzeniem (np. podczas radioterapii czy też chemioterapii), to temat ten pozostaje wciąż jednym z największych wyzwań w aspekcie medycznym (w tym genetyki populacyjnej), ale także społeczno-ekonomicznym. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Boguszewskiej wpisuje się właśnie w ten nurt badań zmierzający do poznania i scharakteryzowania roli oraz mechanizmu działania systemu naprawy uszkodzeń mtDNA w komórkach eukariotycznych. Ponieważ uszkodzenia DNA mają różną genezę, to Doktorantka w pracy badawczej skupiła się na zanalizowaniu wpływu 5',8-cyko-2'-deoksy puryn (cdPu), które są wynikiem utworzenia wiązania kowalencyjnego między C5' i C8 w reszcie cukrowej i zasadzie nukleinowej w obrębie pojedynczego deoksynukleozydu/deoksynukleotydu w wyniku reakcji z rodnikiem hydroksylowym. Wagę prowadzonych analiz podkreśla również fakt, iż cdPu istotnie zniekształcają strukturę dwuniciowej helisy DNA blokując replikację i transkrypcję, a także sam proces naprawy DNA. W szczególności, mgr inż. Boguszewska podjęła się badań dotyczących naprawy przez system BER (związany z wycięciem zasady) zespolonych uszkodzeń mtDNA, a więc charakteryzujących się wystąpieniem dwóch bądź więcej uszkodzeń DNA w obrębie jednego bądź dwóch skrętów helisy. Swego rodzaju podsumowaniem analiz było przeprowadzenie analizy porównawczej wpływu diastereoizomerów (5'R) i (5'S) cdPu na proces naprawczy i częstotliwość powstawania mutacji podczas procesu naprawczego prowadzonego przez komórki bakteryjne *E.coli*, traktowane tu jako modelowe prekursorzy mitochondriów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w języku polskim w oparciu o cykl czterech prac, w tym jednej pracy przeglądowej i trzech artykułów oryginalnych. Z tego powodu do pracy załączono oświadczenia wszystkich Współautorów z wyszczególnionym opisem wkładu każdego z nich oraz takie same oświadczenia Doktorantki. We wszystkich czterech publikacjach mgr inż. Boguszewska jest pierwszym autorem, zaś Jej udział procentowy wynosi nie mniej niż 50%.

Komentarz do rozprawy obejmuje łącznie 94 strony maszynopisu i obejmuje tradycyjny układ rozdziałów, jak uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej i cel naukowy pracy, wyniki badań i ich dyskusję, opis materiału badawczego i metod, streszczenia w j. polskim i angielskim, a także bibliografię. Na uwagę zasługuje staranność przygotowanego komentarza (oraz wszystkich towarzyszących mu materiałów, w tym rysunków i tabel, oświadczeń), choć jego zwięzłość wzbudziła mój niedosyt szczególnie w zakresie przekazanej treści metodycznej, na podstawie której bez dodatkowych wyjaśnień niemożliwym jest odtworzenie żadnego z przytoczanych eksperymentów. Uzupełnienie listy

skrótów o terminy angielskie także by mogło wpłynąć na łatwiejsze śledzenie przedstawianej wiedzy teoretycznej, która jest niezwykle bogata w formy skrótowe.

Komentarz do rozprawy w znacznej mierze przybliży obecny stan wiedzy w obszarze oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz mechanizmów ich naprawy poprzez wycięcie zasady (BER) lub nukleotydów (NER). W szczególności dość dokładnie Doktorantka zaprezentowała mechanizmy związane z systemem naprawy mtDNA, a także wskazała na istotny udział mutacji w genach mitochondrialnych na rozwój stanów patologicznych. Materiał badaczy stanowił zestaw odpowiednio wyznakowanych 15 dwuniciowych oligonukleotydów (40 pz) zsyntetyzowanych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi zgodnie ze schematem umożliwiającym zlokalizowanie uszkodzeń zawierających cdPu wg pozycji bezzasadowego miejsca naprawy AP (dU jako prekursor), przy czym badano jedno- i dwuniciowe uszkodzenia w odległościach od 1 do 10 pz. Chciałabym zwrócić uwagę na swobodę, z jaką Doktorantka omawia wyniki własnych prac badawczych oraz z jaką dokonuje ich porównania z danymi literaturowymi, zachowując wartość merytoryczną.

Cykl publikacji wraz z komentarzem, składające się na recenzowaną rozprawę doktorską, przedstawiają wyniki badań porównujących obecność diastereoizomerów ( $5'S$ ) i ( $5'R$ ) badanych uszkodzeń cdPu oraz ich lokalizację w obrębie uszkodzeń zespolonych wobec miejsca naprawy AP na proces naprawy prowadzonej przez enzymy obecne w ekstraktach cytoplazmatycznych, jądrowych i mitochondrialnych uzyskanych z komórek modelowych, tj. komórek epitelialnych jajnika chomika chińskiego linii xrs5, komórek prawidłowych fibroblastów ludzkich linii BJ, komórek fibroblastów ludzkich pozyskanych od pacjenta cierpiącego na skórę pergaminową C linii XPC. Dodatkowo zbadano wpływ oligonukleotydów na proces naprawczy i częstotliwość powstawania mutacji podczas procesu naprawczego prowadzonego przez komórki bakteryjne *E.coli*. Do osiągnięcia założonych celów Doktorantka wykorzystwała szeroką gamę technik z zakresu chemii, biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i biochemii. Biorąc powyższe pod uwagę do najważniejszych osiągnięć w ramach przedłożonej do oceny pracy zaliczam:

- przedstawienie aktualnego stanu wiedzy w zakresie budowy, działania i systemów naprawczych DNA (szczególnie BER) ludzkich mitochondriów i ich ewolucyjnych protoplastów – bakterii;
- porównanie efektywności mechanizmów naprawczych uszkodzeń zespolonych BER zawierających AP i cdPu pod względem obecności diastereoizomerów ( $5'S$ ) i ( $5'R$ ) przez ekstrakty jądrowe, cytoplazmatyczne i mitochondrialne uzyskane z modelowych komórek;

- porównanie mechanizmów naprawczych uszkodzeń zespolonych BER zawierających AP i cdPu umieszczone w różnej lokalizacji względem miejsca AP (obejmujące jedno- i dwuniciowe uszkodzenia) przez ekstrakty jądrowe, cytoplazmatyczne i mitochondrialne uzyskane z modelowych komórek;

- określenie aktywności poszczególnych białek systemu BER odpowiedzialnych za proces rozcięcia, wydłużenia, naprawy i degradacji badanych oligonukleotydów, w tym ich lokalizacji komórkowej;

- określenie wpływu diastereoizomerów ScdA i RcdA na proces naprawy uszkodzeń zespolonych przez komórki bakteryjne *E. coli*, (RcdA naprawiane efektywniej), w tym wykazanie porównywalnej aktywności mutagennej (dla cdA zokalizowane 0-1 pz od AP) w odniesieniu do analizowanych systemy enzymatyczne frakcji mitochondrialnych eukariotycznych.

Praca badawcza mgr inż. Boguszeńskiej zrealizowana ww. zakresie została już oceniona i zweryfikowana przez recenzentów w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, w których wyniki zostały opublikowane, co tym bardziej ułatwia mi recenzowanie przedłożonej dysertacji. Na podkreślenie zasługuje fakt, że całkowity współczynnik IF dla cyklu publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 13,849, co odpowiada 290 pkt MEiN, a wyniki zostały otrzymane w oparciu o realizację projektu finansowanego z Narodowego Centrum Nauki pod kierownictwem prof. dr hab. n. farm. B.T. Karwowskiego.

Reasumując, nie ulega wątpliwości, że mgr inż. Boguszeńska przedstawiła do oceny spójny cykl publikacji prezentujących wyniki zaawansowanych badań dość wszechstronnych metodologicznie i w których to pełniła kluczową rolę, zaś osiągnięte rezultaty stanowią cenny wkład w reprezentowaną dziedzinę nauki. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana, gdyż otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Ponadto, podczas lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, o których skomentowanie proszę:

- w jaki sposób można wykorzystać w praktyce uzyskane wyniki?
- w jaki sposób zostały oznaczone poszczególne aktywności enzymatyczne (np. endonukleazy, polimerazy, itd.) przedstawione w tabelach (np. Tabeli 2.)
- czy można prowadzić analogiczne eksperymenty w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem czystych preparatów enzymatycznych dodawanych kaskadowo?
- dlaczego do prac nie wykorzystano linii komórek nowotworowych lub komórek poddanych działaniu czynnikiem stresogennym, jak *tert*-BOOH lub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>?

- czy jest możliwość zbadania mechanizmu naprawy w odniesieniu do uszkodzeń typu cdPu i w jaki sposób?

Chciałabym jednak zaznaczyć, że moje uwagi mają charakter dyskusyjny i w niczym nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy. Co więcej, biorąc pod uwagę dorobek naukowy mgr inż. Karoliny Boguszewskiej zaznaczam, że wykracza on znacząco poza zwyczajowo przyjęte osiągnięcia naukowe. Poza cyklem publikacji stanowiących przedmiot rozprawy jest Ona współautorem jeszcze czterech oryginalnych prac naukowych i dziesięciu prac przeglądowych (w tym sześciu anglojęzycznych).

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Boguszewskiej pt.: „Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksyrydyny na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych” jest kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o nadanie stopnia naukowego doktora mgr inż. Karolinie Boguszewskiej. Jednocześnie wnioskuję by wyróżnić recenzowaną pracę doktorską z uwagi na jej wysoką wartość naukową i praktyczną oraz znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy naukowej.

*Małgorzata Winiarska*