

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Boguszewskiej

pt. „Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksyrydyn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych”

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Boguszewskiej pt. „Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksyrydyn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych” została wykonana w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Bronisław Karwowski.

Od strony formalnej przedstawiona rozprawa doktorska nie budzi żadnych wątpliwości. Praca zawiera wszystkie istotne elementy: wykaz stosowanych skrótów, część teoretyczną, cele naukowe pracy, zastosowane metody badawcze, wyniki wraz z podsumowaniem, kopie opublikowanych artykułów będących podstawą przedstawionej dysertacji, bibliografię.

W pracy stwierdziłam niewielką liczbę błędów stylistycznych, interpunkcyjnych oraz edytorskich nie wpływających w sposób znaczący na możliwość prawidłowego odbioru jej treści.

Do pracy dołączono oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie publikacji.

Mgr inż. Karolina Boguszewska jest pierwszym autorem wszystkich artykułów składających się na Jej rozprawę doktorską. Wszyscy współautorzy wyrazili opinię, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr inż. Boguszewskiej zarówno w wykonanie części eksperymentalnej, jak również w części dotyczącej interpretacji wyników prac. Zgodne oświadczenia Promotora i Autorki wskazują również na udział mgr inż. Karoliny Boguszewskiej w tworzeniu koncepcji i planu badań.

Podstawę przedstawionej rozprawy doktorskiej stanowi spójny tematycznie cykl czterech prac opublikowanych w naukowych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

Pierwsza publikacja - Boguszewska K, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT. Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model. Acta Biochim Pol. 2022 Oct 7;69(4):865-869. doi: 10.18388/abp.2020_6382

Druga publikacja - Boguszewska, K.; Karwowski, B.T.; Kaźmierczak-Barańska, J. The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5' ,8-Cyclo-2' -deoxyadenosine. Chemosensors 2022, 10, 204. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10060204>

Trzecia publikacja - Boguszewska K, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study. Molecules. 2021 Nov 22;26(22):7042. doi: 10.3390/molecules26227042

Czwarta publikacja - Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair. Molecules, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857

Wszystkie przedstawione prace zostały opublikowane w języku angielskim. Łączny, wysoki współczynnik oddziaływania IF wynosi dla cyklu 13,849, natomiast punktacja MEiN 290 (zgodnie z rokiem opublikowania).

Jedna z prac ma charakter poglądowy, natomiast trzy pozostałe są pracami doświadczalnymi.

Praca przeglądowa (publikacja czwarta) to rzetelnie przeprowadzona analiza porównawcza systemu BER w komórkach bakteryjnych i w mitochondriach. Praca świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w aktualnej literaturze przedmiotu oraz stanowi doskonały wstęp teoretyczny w przedstawionej rozprawie.

5',8-cyklo-2'-deoksypuryny (cdPu) to uszkodzenia DNA występujące w DNA jako wynik działania promieniowania jonizującego np. w trakcie terapii przeciwnowotworowej. Powstają przez utworzenie wiązania kowalencyjnego między C5' i C8, co usztywnia strukturę nukleotydu i prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie heliksu DNA. Uszkodzenia te są z niewielką efektywnością usuwane z DNA komórki przez enzymy naprawcze szlaku NER. Diastereoizomery 5'S and 5'R cdPu powstają w DNA z różną częstością oraz są naprawiane z różną intensywnością.

Jako że cdPu zmieniają lokalnie strukturę heliksu DNA mogą wpływać na proces naprawy innych uszkodzeń DNA znajdujących się w niewielkiej odległości od tego

uszkodzenia. Obecność cdPu ma szczególne znaczenie w przypadku komórek z defektywnym systemem NER oraz w przypadku mitochondriów, w których nie obserwuje się aktywności tego systemu naprawy DNA.

W pracy badano wpływ diastereoizomerów 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na efektywność naprawy miejsc AP w dwuelementowych zespołach uszkodzeń DNA, definiowanych jako „uszkodzenia zespolone”, składających się z 2'-deoksyurydyny (dU) będącej prekursorem miejsca AP oraz wariantu adeninowego lub guaninowego cdPu.

Cele pracy zostały postawione w sposób precyzyjny. Zastosowano profesjonalne metody, adekwatne do stawianych celów w tym autoradiografię, sekwencjonowanie DNA, elektroforezę DNA oraz spektroskopię masową.

Część doświadczalna pracy została wykonana w warunkach *in vitro* z użyciem syntetyzowanych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi dwuniciowych oligonukleotydów DNA zawierających badane warianty uszkodzeń zespolonych zawierających 2'-deoksyurydynę (dU) i 5',8-cyklo-2'-deoksypurynę (cdPu).

Badano cdPu zawierające pochodne adeniny lub guaniny w różnych wariantach odległości od dU (do 10 nukleotydów w kierunkach końców 3' lub 5'). Zsyntetyzowane oligonukleotydy były stabilne w warunkach eksperymentu.

Zbadano efektywność naprawy dU obecnej w dwóch wariantach takich uszkodzeń – jednoniciowych, w których dU i cdPu znajdowały się w obrębie tej samej nici DNA oraz dwuniciowych, w których dU i cdPu znajdowały się na przeciwległych niciach.

Efektywność naprawy DNA przez system BER badano z zastosowaniem ekstraktów mitochondrialnych, jądrowych i cytoplazmatycznych otrzymanych z linii komórkowych xrs5, BJ i XPC oraz w komórkach *E. coli* transformowanych wektorami plazmidowymi z wbudowanymi insertami zawierającymi badane uszkodzenia DNA. Linia komórkowa BJ posłużyła jako kontrola ze sprawnymi systemami naprawy DNA, linia komórkowa XPC posiadała defekty w naprawie DNA za pomocą szlaku NER natomiast linia xrs5 ze względu na brak białka Ku80 nie miała zdolności do naprawy pęknięć DNA.

W pracy dokonano również analizy podobieństw między systemem BER w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych w celu oszacowania możliwości ekstrapolacji wyników badań naprawy DNA na drodze BER, otrzymanych w układzie prokariotycznym do systemów mitochondrialnych w komórkach eukariotycznych oraz oceniono potencjał mutageny badanych uszkodzeń.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów poczyniono następujące obserwacje:

1. Wydajność naprawy miejsca AP w obrębie uszkodzenia zespolonego jest zależna od struktury przestrzennej cdPu i jest wyższa dla stereoizomeru S.
2. Naprawa miejsca AP może być hamowana, jeżeli znajduje się ono naprzeciwko cdPu lub w odległości 1 nukleotydu w kierunku końca 5' przeciwległej nici DNA.
3. Efektywność odtworzenia poprawnej sekwencji DNA jest niższa dla uszkodzeń znajdujących się w odległości mniejszej niż 10 nukleotydów w kierunku 5' od cdPu w porównaniu do uszkodzeń zlokalizowanych w tej samej odległości w kierunku końca 3'.
4. Białka zaangażowane w naprawę zespolonych uszkodzeń DNA są aktywne w ekstraktach cytoplazmatycznych.
5. Zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach skuteczna naprawa dsDNA zawierającego dwuniciowy model uszkodzenia zespolonego zależy od pozycji i odległości pomiędzy cdPu a miejscem AP.
6. Trendy całkowitej aktywności białek naprawczych w cytoplazmie są zbieżne z trendami dla ekstraktów jądrowych komórek linii xrs5, BJ i XPC.
7. Trendy całkowitej aktywności enzymatycznej poszczególnych etapów naprawy mitochondrialnego systemu BER są zgodne z trendami obserwowanymi w przypadku ekstraktów cytoplazmatycznych i jądrowych linii komórkowej xrs5.
8. Oligonukleotydy w ekstraktach cytoplazmatycznych są degradowane ze skutecznością zależną od pozycji składowych uszkodzenia zespolonego.
9. Skutki uszkodzeń zespolonych zawierających cdA i dU umiejscowionych naprzeciwko siebie lub oddalonych o 1 nukleotyd, zlokalizowanych w przeciwległych niciach DNA, są zbieżne w przypadku eukariotycznych modeli *in vitro* oraz modelu bakteryjnego.
10. CdA zlokalizowane 0 lub 1 nukleotydu od dU w przeciwległej nici DNA w obrębie uszkodzenia zespolonego ma wysoki potencjał mutageny.
11. Potencjał mutageny trudnych do naprawy uszkodzeń zespolonych jest wyższy dla stereoizomeru S.
12. Odległość 4 nukleotydów między cdA i dU w obrębie uszkodzenia zespolonego została oceniona jako wystarczająca do prawidłowego działania enzymów naprawczych.

Za jedno z najbardziej ciekawych efektów osiągniętych przez mgr inż. Karolinę Boguszewską w przedstawionej rozprawie uważam nowatorskie wyniki dotyczące naprawy DNA w ekstraktach cytoplazmatycznych, ze względu na ich potencjalne znaczenie

w planowaniu nowoczesnych strategii terapeutycznych z udziałem oligonukleotydów oraz promieniowania jonizującego. Nienaprawione uszkodzenia powstałe na skutek promieniowania mogą przyczynić się do braku możliwości oddziaływania oligonukleotydu z miejscem docelowym i stanowić przyczynę braku efektu leczniczego, a z drugiej strony mogą, jak wykazała w przedstawionej pracy Pani Boguszewska, hamować działanie systemów naprawy DNA wzmagając efekt działania leków cytostatycznych czy promieniowania. Mam nadzieję, że ten kierunek będzie kontynuowany w toku dalszych badań.

Większość badań procesów naprawy uszkodzeń zespolonych prowadzonych jest z wykorzystaniem systemów jądrowych stąd bardzo cenne z poznawczego punktu widzenia są również osiągnięte przez mgr inż. K. Boguszewską wyniki dotyczące mechanizmu naprawy zespolonych uszkodzeń DNA w wyniku działania systemów mitochondrialnych.

Pewien niedosyt odczuwam w związku z tym, że mgr inż. Boguszewska nie odniosła się we wnioskach w sposób bezpośredni do jednego z deklarowanych celów pracy. Stąd moje pytanie do doktorantki: *Jak w świetle przeprowadzonych badań ocenia Pani zasadność ekstrapolacji badań przeprowadzanych na modelach bakteryjnych do eukariotycznych (mitochondrialnych) systemów naprawy DNA?*

Na koniec mojej oceny chcę zwrócić uwagę na bogaty ogólny dorobek publikacyjny doktorantki. Oprócz prac, które weszły w skład pracy doktorskiej mgr inż. Boguszewska jest współautorką 4 prac oryginalnych, 10 przeglądowych i 4 komunikatów zjazdowych. Łączny, wysoki IF wszystkich prac wynosi 56,565, a liczna punktów MEiN/MNiSW 1450.

Podsumowując stwierdzam, że w mojej opinii rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Boguszewskiej 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.).

Wobec tego stawiam do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Boguszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Renata Krupa

