

15-03-2018

Prof. dr hab. Janusz Błasiak  
Katedra Genetyki Molekularnej  
Uniwersytet Łódzki  
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

Łódź, 12 marca 2018

## Ocena

pracy doktorskiej mgr Anety Wieczorek

### **„Korelacje pomiędzy ekspresją genów kodujących enzymy cyklu Krebsa a kontrolą replikacji DNA w komórkach ludzkich”**

Replikacja DNA jest podstawowym mechanizmem przesyłania informacji genetycznej z jednego pokolenia na drugie. Jest ona także ściśle związana z podziałem komórki na komórki potomne. Ponieważ nie ma danych wskazujących na różny sposób replikacji obszarów kodujących i niekodujących naszego genomu, można założyć, że przebiega ona podobnie w obydwu tych częściach, czyli innymi słowy, układ przeprowadzający replikację nie rozróżnia genów od obszarów pozagenowych. Ponieważ przesyłanie informacji genetycznej powinno być z założenia pozbawione błędów, to prawidłowa replikacja powinna charakteryzować się częstością błędów 1 na około 10 miliardów zasad. Nie ma chyba procesu, od którego wymagałoby się tak wiele i co ważniejsze, nie ma chyba drugiego procesu, który by te wymagania spełnił, bo replikacja DNA człowieka może osiągać taką dokładność. Replikacja szeroko rozumiana, także z procesami naprawy DNA w jej trakcie zaraz po jej zakończeniu. Oczywiście jest, że taka precyzja jest wynikiem działania złożonego mechanizmu, który musi podlegać precyzyjnej kontroli. Dlatego podjęcie tematu wiążącego się z mechanizmami kontroli replikacji DNA przez doktorantkę, Panią mgr Anetę Wieczorek i promotora jej rozprawy Pana profesora Grzegorza Węgrzyna oraz promotora pomocniczego Pan doktora Roberta Łyżenia uważam za uzasadnione. Doktorantka w swej pracy badała udział enzymów centralnego metabolizmu węgla w kontroli replikacji DNA u człowieka. Jest to temat ważny i jeszcze stosunkowo słabo poznany – niezbyt liczne prace z tej tematyki dotyczą głównie innych niż człowiek organizmów, zatem nie mam wątpliwości, że tematyka rozprawy może być uważana za oryginalną w szerokim rozumieniu znaczenia tego słowa. Prace o zbliżonej problematyce badawczej, co przedstawiona w rozprawie doktorskiej, ukazały się kilka lat przed podjęciem tematu rozprawy, lecz dotyczą one bakterii.

Praca podaje jako źródło finansowania Narodowe Centrum Nauki, grant Maestro, rozumiem że chodzi o grant Pana profesora Grzegorza Węgrzyna.

Tytuł rozprawy nie jest dla mnie w pełni jasny – Autorka pisze o korelacji pomiędzy ekspresją genów a kontrolą replikacji, czyli korelacji pomiędzy wielkością mierzalną, a procesem. To w sensie ogólnym jest oczywiście zrozumiałe, ale z dbałości o precyzję języka naukowego, należałoby chyba to inaczej sformułować. Może zatem „Udział genów cyklu Krebsa w kontroli replikacji DNA u człowieka”?

Rozprawę doktorską Pani Wieczorek stanowią 3 publikacje, w jednej z nich Doktorantka jest pierwszym autorem, w pozostałych dwóch – drugim. Każda z prac jest firmowana przez 5 współautorów. Praca w której Doktorantka jest pierwszym autorem ukazała się w *Gene*, IF ok. 2,3 (MNiSzW 20 pkt), natomiast pozostałe prace w *Medical Hypotheses* (IF ok. 1,1, MNiSzW 15) i *BMC Cell Biology* (IF ok. 2,7, MNiSzW 25). Z oświadczeń współautorów tych prac wynika, że wkład Doktorantki w ich powstanie był znaczący. Oprócz tych oświadczeń, odbitkom prac stanowiących rozprawę doktorską towarzyszy streszczenie w językach polskim i angielskim oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Nie uważam, aby rolą recenzenta rozprawy doktorskiej przedstawianej jako zbiór publikacji, było powtórne ich recenzowanie, ale z drugiej strony, oprócz ogólnej oceny wartości tych prac, zdeterninowanej głównie przez rangę czasopism, w jakich zostały opublikowane, oraz oceny udziału Doktorantki w ich powstaniu, uważam za celowe podniesienie tych ich aspektów, które mogą mieć znaczenie dla oceny tych prac jako składowych pracy dyplomowej.

Praca „*Enzymes of the central carbon metabolism and they linkers between transcription, DNA replication and carcinogenesis*” opublikowana w *Medical Hypotheses* stawia bardzo odważną hipotezę zasygnalizowaną w jej tytule. Praca ta zgodnie z przyjętym podziałem prac na “doświadczalne” i “przeglądowe”, powinna być zaliczona do tej drugiej kategorii, ale chciałbym zwrócić, że praca ta ma znacznie poważniejszy twórczy niż dokumentalistyczny aspekt, charakteryzujący niestety wiele prac przeglądowych. Jak wspomniałem, w pracy tej postawiono odważną hipotezę i w elegancki sposób ją zweryfikowano, co bardzo dobrze świadczy o jej autorach, a więc także Doktorantce, będąc świadectwem dojrzałości w doborze tematyki, poprawności formułowania problemów i hipotez. Dodatkowo, autorzy przedstawili tam kompendium wiedzy dotyczącej centralnego metabolizmu węgla i jego znaczenia w metabolizmie DNA poprzez trafny wybór źródeł i właściwe ich wykorzystanie.

Praca „*Effect of partial silencing of genes coding for enzymes involved in glycolysis and tricarboxylic acid cycle on the enterance of human fibroblasts to the S phase*” opublikowana w *BMC Cell Biology* jest pracą doświadczalną. W pracy tej jasno postawiono hipotezę badawczą i sposób jej weryfikacji na właściwie dobranym modelu doświadczalnym, co było jej celem. Na podkreślenie zasługuje zakres tej pracy – nie jest łatwo wyciszać 20 różnych genów przez siRNA. Niemniej przeto autorom udało się uzyskać wyniki, potwierdzające udział enzymów szlaku centralnego metabolizmu węgla w regulacji replikacji DNA poprzez wpływ na kontrolę progresji fibroblastów człowieka do fazy S cyklu komórkowego. Dyskusja otrzymanych wyników ma bardzo oryginalny, a więc i twórczy charakter. Pani Wieczorek deklaruje, że sama zajmowała się genami cyklu Krebsa *CS1*, *ACO2*, *SUCLG2*, *SDHA*, *FH*, *MDH1/2*, *IDH2/3B* i *OGDH*

Trzecia praca „*Double silencing of relevant genes suggests the existence of the direct link between DNA replication/repair and central carbon metabolism in human fibroblasts*” została opublikowana w *Gene* i w pracy tej Pani A. Wieczorek jest pierwszym autorem. W pracy tej postawiono odważną tezę o związku szlakami centralnego metabolizmu węgla z replikacją i naprawą DNA w komórkach człowieka, która była zweryfikowana doświadczalnie. Podobnie jak w poprzedniej pracy, w tych badaniach

zastosowano podejście wyciszania ekspresji genów przez siRNA i badanie replikacji DNA przez synchronizację komórek i kolorymetryczne śledzenie wprowadzania bromodeoksyurydyny w czasie syntezy DNA. W pracy tej doktorantka wspólnie z Panią mgr Fornalewicz pracowała nad ośmioma genami, które nazywa „replikacyjnymi i reperacyjnymi” *CDC6, DNA2, HELQ, LIG1/4, TOP3B, POL1* i *PRIM2*, a następnie już z czterema spośród nich *POL1, LIG4, TOP3B* i *PRIM* w połączeniu z wyciszaniem genów cyklu Krebsa.

Jak wspominałem, nie zamierzam dokonywać merytorycznej oceny prac stanowiących rozprawę doktorską, chciałbym jednak dwie syntetyczne uwagi, dotyczącego przesłania rozprawy, a więc wszystkich trzech prac wchodzących w jej skład. Po pierwsze, jak słusznie piszą Autorzy, jeden z możliwych związków centralnego szlaku metabolizmu węgla z replikacją i naprawą DNA jest oczywisty i wynika z konieczności syntezy prekursorów tych procesów i zapewnienia energii dla ich przeprowadzenia. Autorzy wyciszali geny centralnego szlaku metabolizmu węgla i obserwowali zmiany w progresji cyklu komórkowego do fazy S i zmiany w syntezie DNA związanej z proliferacją komórek, a więc głównie, o ile nie wyłącznie, replikacji. Czy jednak obserwowane przez nich zmiany nie były właśnie skutkiem zaburzeń bilansu energetycznego i procesów syntezy prekursorów replikacji DNA? Czy teza o udziale enzymów centralnego szlaku metabolizmu węgla w kontroli replikacji, jak zrozumiałem bezpośrednim udziale, nie jest jednak zbyt odważna? Po drugie Autorzy piszą o związku nie tylko z replikacją ale też naprawą DNA. W żadnej z prac nie doszukałem się doświadczeń z funkcjonalnymi ocenami naprawy DNA, są tylko wyniki dotyczące wyciszania niektórych genów, których produkty mogą brać udział w naprawie DNA, choć i to określenie jest nieco problematyczne. Prawie zawsze proces naprawy DNA wymaga syntezy DNA, która u ludzi jest prowadzona w większości przypadków przez replikazę, a więc polimerazę DNA syntetyzującą nową nić w replikacji DNA. Jednakże nawet w przypadku syntezy naprawczej prowadzonej przez replikazę, nie zawsze można utożsamiać jej działania z działaniem w czasie syntezy w semikonserwatywnej replikacji DNA. Innymi słowy, synteza DNA nie jest dobrym zjawiskiem do przenoszenia pewnych związków z replikacji na naprawę DNA i rzecz oczywista *vice versa*. Dodatkowo, polimeraza jota należy do grupy polimeraz TLS, czyli polimeraz prowadzących syntezę na uszkodzonej matrycy. W zbiorze efektów reakcji komórki na uszkodzenia DNA (DDR), takie działanie jest raczej tolerancją uszkodzeń, a nie ich naprawą, która poprzez syntezę prowadzi do zachowania integralności DNA, jednakże taki „naprawiony” DNA różni się znacznie od DNA będącego produktem kanonicznych systemów naprawy. Wydaje mi się, że przeprowadzenie funkcjonalnych ocen systemów naprawy DNA pomogłoby w przyjęcie tezy o związku z naprawą. Chciałbym podkreślić, że naprawa DNA nie występuje w tytule rozprawy, jednakże występuje ona w Streszczeniu, towarzyszącemu publikacjom wchodzącym w jej skład, w którym często jest traktowana na tym samym poziomie, co replikacja DNA. Reasumując, myślę że dla ustalenia tego niezwykle ważnego związku pomiędzy enzymami centralnego metabolizmu węgla i kontrolą replikacji DNA, a nie tylko procesem syntezy DNA, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań. To samo dotyczy naprawy DNA.

Wspomniane Streszczenie towarzyszące publikacjom wchodzących w skład rozprawy doktorskiej przedstawia główne elementy zawarte w tych publikacjach, które mogą zostać przypisane Doktorantce. Zawiera one jednak szereg niefortunnych sformułowań, na przykład „podczas fazy S inter-fazy”, „primaza”, działanie topoizomerazy w replikacji DNA nie sprowadza się bezpośrednio do stabilizacji chromosomu, lecz usuwania struktur DNA wyższego rzędu i regulowania superskręcenia, „roz-mnażanie komórek”, „na drodze komplementarności”, „łączy fragmenty Okazaki oraz katalizuje two-żenie wiązań fosfodiesterowych” – to tylko niektóre niefortunne lub wprost nieprawdziwe sformu-łowania z pierwszej strony Streszczenia. Streszczenie w języku angielskim, *Abstract*, również dołączone do prac, jest w większości wolne od tego typu niezręczności. Streszczenie to ma szczególne znacze-nie, gdyż nie jest ono streszczeniem publikacji wchodzących w skład rozprawy, lecz jak wspomniałem, wydziela z nich wkład Doktorantki.

Repertuar metod zastosowanych przez Autorkę w badaniach w swojej rozprawie doktorskiej jest bogaty: wyciszanie ekspresji genów przez siRNA, metody immunocytochemiczne, PCR w czasie rze-zywistym, test wbudowywania BrdU do DNA, cytometria przepływowa, analiza białek.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Anety Wieczorek jest sukcesem naukowym jej promotora Pana profesora Grzegorza Węgrzyna i Jej samej. Największym osiągnięciem rozprawy jest przeprowa-dzenie oryginalnych badań, których wyniki mogą rzucić światło na wzajemne powiązania pozornie odległych procesów biologicznych. W takim kontekście szczególnie ważne wydaje się umiejscowienie procesu replikacji DNA, ze względu na jego znaczenie i niespotykaną dokładność, wymagające precy-zyjnej regulacji. Myślę, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią dobrą podstawę do kontynu-owania badań nad powiązaniem regulacji syntezy DNA, zarówno replikacyjnej, jak i naprawczej, z cy-klem Krebsa. Podjęcie tej tematyki uważam za trafne i uzasadnione. Wyniki uzyskane przez Dokto-rantkę oraz ich interpretacja a także rozważania uzasadniające wagę podjętej przez Nią problematyki zostały opublikowane w czasopismach mających dobrą renomę w międzynarodowej społeczności na-ukowej. Doktorantka zastosowała w swej pracy szereg nowoczesnych technik biologii molekularnej i to zastosowała ze znanstwem. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Anety Wieczorek spełnia wa-runki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767. Dla-tego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku o dopuszcze-nie mgr Anety Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Janusz Błasiak

