



Warszawa, 22.03.2018

dr hab. Adrianna Skoneczna

Pracownia Mutagenezy i Reperacji DNA

27-03-2018

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR ANETY WIECZOREK

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna pełniącego funkcję promotora oraz dr Roberta Łyżenia występującego w charakterze promotora pomocniczego. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U., poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. z roku 2016, poz. 882). Doktorat stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów, opublikowanych w latach 2015 - 2018 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie JCR (*Med. Hypothesis*, *BMC Cell Biol.* oraz *Gene*), o łącznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 6,147. Prace są wieloautorskie, niemniej z oświadczeń Doktorantki oraz pozostałych autorów, jasno wynika jaka była jej rola w powstaniu tych prac. W obu pracach doświadczalnych umieszczonych w cyklu (*BMC Cell Biol.* i *Gene*) Doktorantka jest jednym z dwóch pierwszych autorów, natomiast w pracy przeglądowej współautorem. Doktorantka ma ponadto w swoim dorobku naukowym jeszcze 2 prace (*Biol Trace Elem Res* oraz *Gene*), co sprawia że sumaryczny współczynnik wpływu IF jej publikacji wynosi ponad 10. W drugiej ze wspomnianych prac, opublikowanej w *Gene*, jest ona jednym z dwóch równocennych pierwszych autorów, i choć praca ta nie weszła w skład jej doktoratu, to najwyraźniej stanowi kontynuacją tych samych badań. Taki dorobek naukowy u młodej osoby nie mającej jeszcze stopnia

doktora zwraca uwagę. Należy ten fakt podkreślić tym bardziej, że w większości z prac udział Doktorantki był kluczowy. Mgr Aneta Wieczorek była w nich pierwszym autorem, planowała i przeprowadzała eksperymenty, analizowała wyniki, a w pracy przeglądowej współuczestniczyła również w tworzeniu manuskryptu.

Spełniony jest również, narzucony ustawą obowiązek przygotowania streszczenia doktoratu w języku polskim i angielskim. Takie streszczenia zostały przygotowane. Zaskakuje tylko fakt, że jedynymi pozycjami literaturowymi cytowanymi w tej części pracy są prace własne wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Tymczasem, w streszczeniu Doktorantka nie tylko opisuje wyniki badań własnych, ale również wprowadza czytelnika w temat, powołując się przy tej okazji na wiele wcześniej uzyskanych danych, dla których jednak brak odnośników. Dodatkowo, Pani mgr Aneta Wieczorek zamieściła w doktoracie listę publikacji, które stanowią jej dorobek naukowy. Ostatni element ocenianej tu rozprawy doktorskiej stanowią oświadczenia współautorów wszystkich publikacji składających się na tę pracę przedstawiające zakres udziału poszczególnych osób w ich powstawaniu oraz wskazujący na ważką rolę Doktorantki.

Powiązania pomiędzy metabolizmem komórkowym a mechanizmami gwarantującymi stabilność genetyczną komórek różnych organizmów stały się ostatnio przedmiotem ożywionej dyskusji naukowej. Funkcjonujący przez długi czas pogląd, że zależności te są wynikiem oddziaływań pośrednich, np. równoległe przebiegających szlaków regulacyjnych, z których jeden kontroluje stan DNA, a inny stan metaboliczny komórki, a efektem działania obu jest przygotowanie komórki do następnego podziału, przy czym obserwowane zależności między nimi są w rzeczywistości koincydentalne, został ostatnio zachwiany. Przyczyną takiego stanu rzeczy stały się m.in. badania z wykorzystaniem genomiki funkcjonalnej przynoszące mrowie informacji o fenotypach komórek pozbawionych określonego genu czy niosących konkretną mutację. Napędzająca badaczy chęć poznania funkcji molekularnej produktów każdego z genów, za pomocą badań genomicznych, spowodowała nie tylko napływ informacji o roli komórkowej produktów genów o nieznannej dotąd funkcji, ale nieoczekiwanie, również o nieznanych dotąd rolach białek, których funkcja wydawała się nam już znana. Coraz częściej dowiadujemy się o drugiej roli znanego od dawna białka (ang. moonlighting protein) zaangażowanego w jeden ze szlaków metabolicznych. Coraz więcej danych wskazuje na bezpośredni wpływ enzymów komórkowych na procesy regulujące metabolizm DNA. Do

znanych od kilkudziesięciu lat zależności tego rodzaju, takich jak np. drożdżowe białko akonitaza, enzym mitochondrialny, który oprócz tego, że przeprowadza konkretną reakcję w cyklu TCA, tj. przemianę cytrynianu w izocytrynian, pełni również funkcję nukleoidu wiążąc i osłaniając mtDNA, dołączył długi szereg kolejnych zależności i białek. Wystarczy wspomnieć, że w pracy przeglądowej sprzed 20 lat (Jeffrey CJ, 1999) wymienionych było 20 białek wielofunkcyjnych, gdy tymczasem obecnie znanych ich jest już setki.

Białka wielofunkcyjne wydają się być wyjątkowo przydatne do tego, by regulować i synchronizować różnego rodzaju procesy komórkowe. I rzeczywiście, istnieją przykłady takiej ich roli komórkowej. Przykładem może tu być fumaraza Fum1, enzym cyklu Krebsa, który w sytuacji stresu genotoksycznego jest rekrutowany do jądra, gdzie przeprowadza tę samą reakcję co w mitochondriach. Wyprodukowany w jądrze fumaran działa na DNA osłonowo, przeciwdziałając powstawaniu pęknięć DNA. Mechanizm tej odpowiedzi jest dwojaki. Z jednej strony fumaran prowadzi do aktywacji kinazy AMPK, która chroni komórki przed apoptozą, z drugiej strony działa jako kompetycyjny inhibitor HPH, białka stabilizującego czynnik transkrypcyjny HIF, wpływając tym samym na ekspresję genów związanych z metabolizmem komórkowym, angiogenezą i apoptozą. Inny przykład to syntaza homocytrynianiowa Lys20, katalizująca pierwszy etap biosyntezy lizyny w mitochondriach, która lokalizuje również w jądrze komórkowym, gdzie oddziałuje z chromatyną. Lys20 poprzez oddziaływanie z acetylotransferazą histonów Esa1 i histonem Htz1 przyczynia się do acetylacji histonów i fosforylacji białka Rad53 aktywującego punkt kontrolny cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Zatem enzymy komórkowe potrafią połączyć rolę w metabolizmie komórkowym z rolą regulatora odpowiedzi na stres. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Anety Wieczorek wpisuje się w ten nurt badań, bowiem celem tej pracy jest sprawdzenie czy i jaki wpływ na syntezę DNA mają zaburzenia poziomu enzymów cyklu Krebsa.

Pierwsza z prac wchodzących w skład doktoratu mgr Anety Wieczorek (Konieczna A, Szczepańska A, Sawiuk K, Łyżeń R, Węgrzyn G. (2015) Enzymes of the central carbon metabolism: are they linkers between transcription, DNA replication, and carcinogenesis? *Med Hypotheses*. 84(1):58-67) przedstawia aktualny stan wiedzy o bezpośrednich związkach pomiędzy metabolizmem węgla a regulacją replikacji DNA. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantki i pozostałych współautorów Doktorantka odpowiada za część tej pracy dotyczącą cyklu Krebsa. Z zebranych w publikacji danych literaturowych

wynika, że enzymy zaangażowane w metabolizm węgla, włączając w to te zaangażowane w cykl Krebsa, odgrywają pewną rolę w regulacji transkrypcji, w kontroli replikacji oraz w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Autorzy stawiają też hipotezę, że niektóre enzymy szlaków biochemicznych mogą regulować bezpośrednio metabolizm DNA, a ich niedobory są przyczyną nieprawidłowości w replikacji lub reperaturacji DNA, prowadząc w efekcie do kancerogenezy. Praca stanowi dobre wprowadzenie do prac eksperymentalnych stanowiących dalszą część doktoratu. Pytanie, które nasuwa się czytelnikowi tej pracy brzmi, dlaczego użyto innego różnych skrótów dla tego samego enzymu w tekście i na Rys. 1 (PGI *versus* GPI)?

Druga praca wchodząca w skład doktoratu (Konieczna A, Szczepańska A, Sawiuk K, Węgrzyn G, Łyżeń R. (2015) Effects of partial silencing of genes coding for enzymes involved in glycolysis and tricarboxylic acid cycle on the entrance of human fibroblasts to the S phase. *BMC Cell Biol.* 16:16) jest pracą eksperymentalną. W pracy tej autorzy weryfikowali postawioną w poprzedniej pracy hipotezę systematycznie wyciszając (metodą siRNA) kolejne geny kodujące enzymy szlaków biochemicznych związanych z metabolizmem węgla, a dokładnie enzymy glikolityczne oraz enzymy cyklu Krebsa. Modelem badawczym była linia komórkowa zdrowych ludzkich fibroblastów skóry HDFa (Human Dermal Fibroblasts adult), a badano fenotypy związane z DNA, mianowicie wydajność syntezy DNA (analizując ilość włączanego podczas syntezy znakowanego nukleotydu) oraz zaburzenia cyklu komórkowego (metodą cytometryczną). Doktorantka odpowiadała za część opisanych w pracy eksperymentów dotyczącą cyklu Krebsa. Z sukcesem wyciszyła każdy z genów kodujących enzymy tego szlaku metabolicznego: CS1 (kodujący syntazę cytrynianową 1), ACO2 (kodujący akonitazę 2), IDH2 (kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 2), IDH3B (kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 3B), OGDH (kodujący dehydrogenazę α -ketoglutaranu), SUCLG2 (kodujący syntetazę bursztynylo-CoA 2), SDHA (kodujący podjednostkę A kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej), FH (kodujący fumarazę) i MDH2 (kodujący dehydrogenazę jabłczanową 2). Wykazała, że wyciszenie wymienionych genów nie powoduje efektu cytotoksycznego. Za pomocą analizy włączania BrdU Doktorantka wykazała, że obniżenie poziomu ekspresji genów takich jak ACO2, FH, a w mniejszym stopniu również MDH2 i CS1 powoduje zmniejszenie wydajności syntezy DNA. Wyciszeniu tych genów, a także wyciszeniu genu SDHA, towarzyszą również zmiany w cyklu komórkowym widoczne w analizie

cytometrycznej. Zmiany te świadczą bądź to o opóźnieniu wejścia komórek w fazę S (dla szczepów z wyciszonymi genami FH, CS1, MDH2 i SDHA), bądź też o zmniejszonej frakcji komórek w fazie S czemu towarzyszy wydłużenie fazy G2/M (ACO2, FH). Otrzymane wyniki potwierdzają istnienie związków pomiędzy genami kodującymi enzymy cyklu Krebsa i tymi zaangażowanymi w metabolizm DNA.

Trzecia z prac wchodzących w skład doktoratu (Wieczorek A, Fornalewicz K, Mocarski Ł, Łyżeń R, Węgrzyn G. (2018) Double silencing of relevant genes suggests the existence of the direct link between DNA replication/repair and central carbon metabolism in human fibroblasts. *Gene*. 650:1-6.) zawiera wyniki dalszych badań. Ponieważ ustalono, że wyciszenie genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie węgla, w tym w cyklu Krebsa, ma wpływ na przebieg cyklu komórkowego oraz wydajność syntezy DNA postanowiono dowiedzieć się, które z etapów syntezy lub reperacji DNA nie przebiegają poprawnie pod nieobecność enzymów metabolicznych. Badania przeprowadzono w komórkach zdrowych ludzkich fibroblastów HDFa. Analizowano zależności epistatyczne pomiędzy genami kodującymi enzymy metabolizmu węgla, a wybranymi genami kodującymi enzymy kluczowe dla poprawnego przebiegu replikacji lub reperacji DNA, a mianowicie PRIM2 (gen kodujący prymazę), POLI (gen kodujący DNA polimerazę α), LIG4 (gen kodujący ligazę IV) oraz TOP3B (gen kodujący topoisomerazę III β). Doktorantka odpowiadała za część badań dotyczącą analizy powiązań epistatycznych między genami kodującymi enzymy cyklu Krebsa a PRIM2, POLI, LIG4 i TOP3B. Po sprawdzeniu efektywności wyciszania badanych genów (metodą RT-PCR) i wpływu tego wyciszania na żywotność komórek, sprawdziła takie fenotypy komórek jak ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (metodą cytometryczną) i efektywność syntezy DNA (analiza włączania znakowanego nukleotydu BrdU). Doktorantka wykazała supresorowy efekt wyciszenia IDH2 (gen kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 2) w szczepach z wyciszonymi genami kodującymi badane białka związane z replikacją i naprawą DNA. Wydajność syntezy DNA wzrastała 4-krotnie w porównaniu do poziomu obserwowanego w komórkach z wyciszonym genem PRIM2, POLI, LIG4 czy TOP3B, osiągając ponad 80% wydajności syntezy DNA obserwowanej w niewyciszonym szczepie kontrolnym. Poprawie wydajności syntezy DNA towarzyszyło przywrócenie zdolności komórek do wchodzenia w fazę S cyklu bez opóźnienia. Podobny efekt zaobserwowała Doktorantka w komórkach z wyciszoną parą

genów OGDH i POLI, a efekt częściowej supresji widoczny był m.in. dla par wyciszonych genów SUCLG2 i PRIM2 oraz SUCLG2 i POLI. W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy stosowane są równolegle dwa różne zapisy nazwy jednego genu, np. PRIM i PRIM2, albo SUCL i SUCLG2. Moim zdaniem należy ujednoclić zapisy genów przynajmniej w obrębie jednej publikacji.

Jak wynika z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań fenotypy związane z wyciszeniem genów kodujących enzymy cyklu Krebsa nie zawsze mają efekt stymulujący syntezę DNA w komórkach z wyciszonymi genami kodującymi białka związane z syntezą lub naprawą DNA. Przeciwnie, niektóre z obserwowanych fenotypów są addytywne, inne zaś epistatyczne. Wyciszenie genów CS1, ACO2, SDHA czy FH w komórkach z wyciszonym genem PRIM2 zmniejsza frakcję komórek zdolnych do rozpoczęcia fazy S. Podobny efekt udokumentowano w komórkach z wyciszonym genem TOP3B, w których dodatkowo wyciszono geny CS1 czy SDHA, oraz ACO2 lub FH, choć w tych ostatnich dwóch przypadkach kinetyka progresji cyklu komórkowego jest odmienna. Relacje epistatyczne stwierdzono dla takich par genów jak np. TOP3B i MDH1, LIG4 i FH czy ACO2 i POLI. Otrzymane przez Doktorantkę dane sugerują szereg różnych powiązań genetycznych między replikacją i naprawą DNA a metabolizmem węgla, tu konkretnie cyklem Krebsa. Te powiązania mogą mieć istotne znaczenie dla stabilności genetycznej komórek, w których dochodzi do zaburzenia poziomu ekspresji albo do mutacji zaburzającej prawidłowe funkcjonowanie genów kodujących enzymy cyklu Krebsa.

Niektóre dane, przedstawione na Rys. S3, S6, S9, S12 w pracy opublikowanej w *Gene*, choć wygląd mają zbliżony, są różnie klasyfikowane w Tab. 1. Jakie kryteria zastosowano do oceny przedstawionych na tych rycinach fenotypów? Co zdecydowało o oznaczeniu '+' fenotypu komórek z wyciszonymi genami LIG4 i SUCLG2 czy LIG4 i MDH1, a '0' PRIM2 i SUCLG2 w tej tabeli? Z tym pytaniem wiąże się pytanie o sposób przeprowadzenia analizy statystycznej interpretowanych wyników. Podczas interpretacji uzyskanych danych powinny zostać uwzględnione m.in. wielkość badanej próby i istotność statystyczna obserwowanych różnic. Jak rozumiem, w pracy weryfikowano istotność statystyczną obserwowanych różnic posługując się $p\text{-val}=0,05$, ale choć podano ilość powtórzeń, dla których przeprowadzono analizy (4), nie zaznaczono czy były to powtórzenia biologiczne (niezależnie uzyskane transfektanty) czy powtórzenia techniczne (niezależnie przeprowadzone eksperymenty, w których wykorzystano te same

transfektanty). Chciałabym poznać szczegóły tej analizy podczas obrony pracy. Chciałabym również poznać opinię Doktorantki na temat możliwych przyczyn intrygujących różnic w kinetyce progresji fazy S cyklu komórkowego w komórkach z wyciszoną para genów TOP3B i CS1 vs TOP3B i ACO2.

Rozprawa doktorska mgr Anety Wieczorek została przygotowana w oparciu o dobrą znajomość literatury fachowej w zakresie interakcji między szlakiem metabolizmu węgla a procesami umożliwiającymi komórkom wydajną syntezę i naprawę DNA. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych technik badawczych adekwatnych do badanych problemów (wyciszanie genów za pomocą siRNA, RT-PCR, analiza cyklu komórkowego metodą cytometryczną, analiza efektywności syntezy DNA), zatem strona metodyczna przedstawionej pracy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń. Podkreślić trzeba ogrom pracy wykonanej przez Doktorantkę. Podsumowując same analizy cyklu komórkowego zamieszczone w pracy opublikowanej w *Gene*, które przeprowadziła stwierdzimy, że przebadanie wszystkich układów doświadczalnych wymagało przeprowadzenie kilku tysięcy pomiarów. Wyniki przedstawione w tej pracy są istotnym i nowym wkładem w dziedzinę nauk biologicznych i przyczynią się do lepszego zrozumienia funkcjonowania homeostazy komórkowej oraz mechanizmów warunkujących stabilność genetyczną komórek w obliczu zmian metabolicznych czy w odpowiedzi na dostępne źródła węgla w komórkach ludzkich.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca mgr Anety Wieczorek pt. „Korelacje pomiędzy ekspresją genów kodujących enzymy cyklu Krebsa a kontrolą replikacji DNA w komórkach ludzkich” wykonanej pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna (promotora) i dr Roberta Łyżenia (promotora pomocniczego) w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego dopuszczenie Pani mgr Anety Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, doceniając wartość przedstawionych w pracy wyników wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Slawomir