

10-03-2018

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

Łódź, 16 marca 2018

Ocena

pracy doktorskiej mgr Karoliny Fornalewicz

„Związek szlaku pentozofosforanowego z regulacją replikacji DNA w ludzkich fibroblastach”

Nośnikiem pierwotnej informacji genetycznej u człowieka jest DNA, więc przekazywanie tej informacji, związane z utrzymywaniem gatunku, jest ściśle związane z przekazywaniem DNA w procesie semi-konserwatywnej replikacji DNA. Dokładność tego procesu i procesów z nim stowarzyszonych, warunkowana wielkością genomu, jest nieporównywalna z żadnym innym procesem. Osiągnięcie takiej dokładności wymaga szeregu kompleksowych oddziaływań, z których wiele jest albo słabo, albo wręcz w ogóle nieznanymi. Oddziaływania te można uważać za mechanizmy regulacji replikacji DNA i badania nad nimi z pewnością należą do fundamentalnych. Wyniki szeregu badań przeprowadzonych w ostatnich latach sugerują, że sieć regulacji replikacji DNA może być większa niż przypuszczano i zawierać elementy zjawisk i procesów uważanych dotąd za niezwiązane bezpośrednio z replikacją ani z sobą. Dlatego podjęcie tematu mechanizmów kontroli replikacji DNA przez doktorantkę, Panią mgr Karolinę Fornalewicz i promotora Jej rozprawy Pana profesora Grzegorza Węgrzyna uważam za uzasadnione. Doktorantka w swej pracy badała udział enzymów szlaku pentozofosforanowego (PPP), będącego składową centralnego metabolizmu węgla w regulacji replikacji DNA w fibroblastach człowieka. Jak zaznaczyłem jest to temat ważny i niezbyt głęboko poznany, a większość prac z tej tematyki została przeprowadzona na innych niż człowiek organizmach. W szerokim rozumieniu oryginalności, tematyka pracy może być postrzegana jako oryginalna.

Tytuł rozprawy jest dość ogólny, ale prawidłowo sformułowany i dostecznie jasny.

Rozprawę doktorską Pani Fornalewicz stanowią 3 publikacje, w jednej z nich Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej – drugim i jednej – trzecim. Dwie z tych prac są firmowane przez 5 współautorów, a jedna, ta której pierwszym autorem jest Doktorantka – przez czterech. Praca w której Doktorantka jest pierwszym autorem oraz jeszcze jedna praca ukazały się w *Gene*, IF ok. 2,3 (MNIŚW 20 pkt), natomiast pozostała praca w *Medical Hypotheses* (IF ok. 1,1, MNIŚW 15). 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.

Prace przedstawione jako rozprawa doktorska przeszły procedurę recenzji w redakcjach *Gene* i *Medical Hypotheses* i nie zamierzam występować jako ich superrecenzent. Uważam, że ranga czasopism, w których zostały opublikowane prace stanowiące rozprawę doktorską, jest wystarczająca dla

tego celu. Jak wspomniałem, udział Doktorantki w powstaniu tych prac można uważać jako znaczący. Niemniej przeto, chciałbym zwrócić uwagę na niektóre aspekty tych prac, które mogą być istotne w ich rozważaniu w kontekście pracy dyplomowej.

Publikacja „*Enzymes of the central carbon metabolism and they linkers between transcription, DNA replication and carcinogenesis*”, która ukazała się w *Medical Hypotheses* jest w dużej mierze oparta na przeglądzie piśmiennictwa, lecz w moim przekonaniu przeglądową nie jest, czy może lepiej – nie jest li tylko przeglądową. W pracy tej Autorzy snują bardzo interesujące rozważania na temat wspólnych mechanizmów replikacji DNA, transkrypcji i centralnego metabolizmu węgla, spekulując na temat ich potencjalnej roli w transformacji nowotworowej. Znaczący współudział w tworzeniu tej pracy bardzo dobrze świadczy o potencjale naukowym Doktorantki, Jej dojrzałości w doborze tematyki, poprawności formułowania hipotez i dostrzegania problemów. Dodatkowo, w pracy tej znajduje się kompendium wiedzy dotyczącej centralnego metabolizmu węgla i jego znaczenia w metabolizmie DNA, które jest konsekwencją trafnego wyboru źródeł i właściwego ich wykorzystania.

Praca „*Silencing of the pentose phosphate pathway genes influences DNA replication in human fibroblasts*”, której Doktorantka jest pierwszym autorem, została opublikowana w *Gene* i zawiera wyniki prac eksperymentalnych nad udziałem PPP w replikacji i, w zamierzeniu Autorów, naprawie DNA, w fibroblastach człowieka. W pracy tej badano progresję cyklu komórkowego do fazy S fibroblastów zatrzymanych w G0/G1 z powodu niedobory surowicy w pożywce. W pracy jednoznacznie sformułowano hipotezę badawczą o udziale PPP w replikacji i naprawie DNA i przeprowadzono jej weryfikację. Autorzy wyciszali szereg genów PPP i genów biorących udział w replikacji *G6PD*, *RBKS*, *H6PD*, *PRPS1*, *RPE*, *TALDO*, *DERA*, *PGLS*, *RPIA* i *TKT* zatem pracę można określić jako pracę o szerokim zakresie, stwarzającą możliwości otrzymania wielu wyników, a co za tym idzie, stawiającą wyzwania interpretacyjne. Autorzy z sukcesem podjęli te wyzwania, dokonując rzeczowej oceny otrzymanych wyników i prowadząc ich dojrzałą i twórczą dyskusję.

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 K. Fornalewicz jest drugim autorem. Praca ta jest kontynuacją poprzedniej pracy, w której dalej weryfikowano hipotezę o związku szlaków centralnego metabolizmu węgla z replikacją i naprawą DNA w komórkach człowieka. Tak jak poprzednio, badano panel genów, których ekspresję regulowano poprzez siRNA. Fibroblasty człowieka synchronizowano i badano replikację DNA testem BrdU. W pracy tej Pani mgr Fornalewicz, wspólnie z Panią mgr Wieczorek pracowała nad czterema genami, które nazywa „replikacyjnymi” *LIG4*, *TOP3B*, *POLI* i *PRIM2*, a następnie obserwowała zmiany w replikacji DNA przy modulowanej ekspresji genów szlaku PPP.

Jak zaznaczyłem, nie jest moim zamiarem dokonywanie merytorycznej oceny prac stanowiących rozprawę doktorską, chciałbym jednak zwrócić uwagę na dwa ich aspekty. Po pierwsze, jak piszą Autorzy i co jest niemal oczywiste, jeden z możliwych związków centralnego szlaku metabolizmu węgla z replikacją i naprawą DNA jest konsekwencją konieczności syntezy ich prekursorów i dostarczenia energii dla ich przeprowadzenia. Autorzy wyciszali różne geny i obserwowali zmiany w progresji cyklu

komórkowego fibroblastów człowieka do fazy S i zmiany w syntezie DNA związanej z proliferacją komórek, a więc głównie, o ile nie wyłącznie, replikacji. Uważam, że otwarte pozostaje pytanie, czy obserwowane przez Autorów zmiany nie były konsekwencją zaburzeń bilansu energetycznego i procesów syntezy prekursorów replikacji DNA? Czy zatem teza o bezpośrednim udziale enzymów centralnego szlaku metabolizmu węgla w kontroli replikacji jest wystarczająco udokumentowana? Po drugie Autorzy piszą także o związku tych enzymów z naprawą DNA, mniemam że na podstawie obserwacji w konsekwencji wyciszania genów, których produktu *mogą* brać udział w naprawie DNA. Nie znalazłem w rozprawie doświadczalnego potwierdzenia modulacji procesu naprawy DNA przy manipulowaniu ekspresją genów szlaku PPP. Naprawa DNA, poza szlakiem bezpośredniej rewersji uszkodzenia i niektórymi mało prawdopodobnymi przypadkami, wymaga syntezy DNA, nazywanej czasem syntezą naprawczą (USD), w odróżnieniu od syntezy replikacyjnej. Synteza naprawcza u ludzi jest prowadzona zazwyczaj przez replikazę, a więc polimerazę DNA syntetyzującą nową nić w replikacji DNA. Wszelako, nie można utożsamiać syntezy naprawczej prowadzonej przez replikazę z syntezą podczas semikonserwatywnej replikacji DNA. Oprócz tego, polimeraza jota to polimeraza TLS, czyli zdolna do syntezy DNA na uszkodzonej matrycy. Jednakże nazywanie akcji polimeraz TLS naprawą uszkodzenia DNA jest raczej ryzykowne. Lepszym określeniem jest raczej tolerancja uszkodzenia DNA. Teza o związku enzymów centralnego metabolizmu węgla, w tym enzymów szlaku PPP, byłaby lepiej poparta wynikami otrzymanymi z doświadczeń nad funkcjonalnymi systemami naprawy DNA, a w najprostszym przypadku – nad globalną kinetyką naprawy DNA. Takie doświadczenia można przeprowadzić z zastosowaniem stosunkowo prostych technik. Naprawa DNA nie występuje jednak w tytule rozprawy doktorskiej Pani K. Fornalewicz, jednakże pojawia się ona w Streszczeniu, towarzyszącemu publikacjom wchodzącym w jej skład. W podsumowaniu stwierdzam, że konieczne są dalsze badania dla poparcia tezy o związku między enzymami centralnego metabolizmu węgla, w tym enzymów szlaku PPP i mechanizmami replikacji i naprawy DNA

Wspomniane Streszczenie towarzyszące kopiom publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej przedstawia główne elementy zawarte w tych publikacjach, które mogą zostać przypisane Doktorantce. Streszczenie to nie jest napisane najlepszym językiem – i to nie tylko z punktu widzenia „pani od polskiego”, ale także języka naukowego. Zawiera one jednak szereg niefortunnych sformułowań – weźmy choćby pierwsze zdanie, z którego można przecież wywnioskować, że u prokariotów replikacja nie zachodzi w (ich) jądrze komórkowym. Podobnie rzecz się ma z angielską wersją streszczenia, choć jest ono raczej wolne od „karkołomnych zawłości” wersji polskiej. Streszczenie zawiera bardzo ważny element pomocniczy rozprawy – deklarację Doktorantki dotyczącego Jej wkładu w publikacje wchodzące w skład rozprawy. Deklaracja ta nie jest dokonana *explicite*, ale informacje zawarte w Streszczeniu wraz z oświadczeniami współautorów prac dają obraz udziału Pani mgr K. Fornalewicz w powstaniu publikacji rozprawy.

Repertuar metod zastosowanych przez Doktorantkę w badaniach w swojej rozprawie doktorskiej jest obszerny: wyciszanie ekspresji genów przez siRNA, metody immunocytochemiczne, PCR w czasie

rzeczywistym, test wbudowywania BrdU do DNA, cytometria przepływowa, hybrydyzacja typu Western.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Fornalewicz jest bardzo pozytywnym wynikiem naukowym jej promotora Pana profesora Grzegorza Węgrzyna i rzecz jasna Jej samej. Największym osiągnięciem rozprawy są wyniki otrzymane z oryginalnych badań, które mogą wnieść do naszej wiedzy o wzajemnych powiązaniach między różnymi procesami życiowymi. To ważne. Replikacja DNA zajmuje w tych związkach szczególne miejsce, ze względu na jej znaczenie dla utrzymania gatunku i jej precyzyjna regulację dającą nadzwyczajną dokładność. Uważam, że wyniki uzyskane przez Panią mgr K. Fornalewicz stanowią podstawę i uzasadnienie dalszych badań nad powiązaniem regulacji syntezy DNA, zarówno replikacyjnej, jak i naprawczej, z szlakiem pentozofosforanowym i ogólnie centralnym metabolizmem węgla. Podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę i Promotora uważam za trafne i uzasadnione. Wyniki uzyskane przez Panią K. Fornalewicz zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym o wymiarze międzynarodowym. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Fornalewicz zatytułowana „Związek szlaku pentozofosforanowego z regulacją replikacji DNA w ludzkich fibroblastach” spełnia warunki 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. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku o dopuszczenie mgr Karoliny Fornalewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Janusz Błasiak

