Łódź, 01.02.2021

Prof. dr hab. Adam Jaworski
Emerytowany prof. zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie (w ramach umowy wykładowca)
Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska w Przemyślu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Sobolewskiej
pt. „Regulacja polimeraz z rodziny Y, zdolnych do syntezy poprzez uszkodzenia matrycy, w cyklu komórkowym Saccharomyces cerevisiae".

Praca doktorska mgr Aleksandry Sobolewskiej została wykonana w Pracowni Mutagenezy i Reparacji DNA, Instytutu Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie po kierunkiem prof. dr hab. Ewy Śledziewskiej-Gójskiej, Funkcję promotora pomocniczego w tym przewodzie doktorskim wypełniała dr Justyna Mcintyre. Od wielu lat jestem dość często recenzentem projektów badawczych zgłaszanych przez zespoły naukowe Zakładu Mutagenezy i Reparacji DNA IBB, a także bardzo pilnym czytelnikiem publikowanych, znakomitych prac doświadczalnych i innych artykułów. Na modelach prokariotycznej i eukariotycznej komórki drożdżowej od lat prowadzone są bardzo konsekwentnie ważne badania poznawcze uniwersalnych systemów i mechanizmów replikacji, wierności tego procesu, czynników i mechanizmów mutagenezy, a także złożonych systemów naprawy błędów i uszkodzeń DNA. W realizację nośnych projektów badawczych pracownicy i doktoranci wprzęgają systematycznie nowe metody i techniki badawcze, w tym nowe „narzędzia" molekularne i informatyczne.

Powierzenie mi przez Radę Naukową Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN recenzji kolejnej pracy doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Śledziewskiej-Gójskiej przyjąłem, szczególnie w tych trudnych czasach pandemii, jako wyróżnienie, które sprawiło mi naukową satysfakcję. Z dużą naukową przyjemnością przestudiowałem treści przesłanej mi pracy doktorskiej mgr Aleksandry Sobolewskiej, a także pracę doświadczalną opublikowaną w ubiegłym roku *w Curr Genet.* (2020), w której Doktorantka jest pierwszym autorem.

Już sama nazwa Zespołu prof. dr hab, Ewy Śledziewsjkiej - Gójkiej „*Odpowiedź komórek bakteryjnych i komórek drożdży na uszkodzenia DNA. Koordynacja procesów naprawy DNA w komórkach eukariotycznych*", a następnie tytuł pracy doktorskiej oraz tytuł opublikowanej pracy doświadczalnej: *„Regulation of the abudance of the Y-family polumerases in cell cycle of budding yeast in response of DNA demage"* – wzbudziły moją naukową ciekawość z racji użytych pojęć naukowych *(koordynacja procesów naprawy, regulacja polimerac DNA rodzinyY..*). Ponadto, wcześniej przeczytałem bardzo dobrą pracę doświadczalną, opublikowaną w czasopiśmie DNA Repair w 2015 roku przez Zespól naukowy prof. dr hab. Ewy Śledziewskiej - Gójskiej pt. „*The steady-state level and stability of TLS polymerase eta are cellcycle dependent in the yeast S. cerevisiae".*

Doktorantka pisze na stronie 35 tej pracy doktorskiej (*Cel pracy*), że wyniki wyżej cytowanej pracy oraz podobne wyniki opublikowane przez zespół wybitnego specjalisty w tej dziedzinie wiedzy, Grahama Walkera, były impulsem dla postawienia ważnego pytania, które stało sie kierunkowym celem Jej pracy doktorskiej.

„Celem pracy doktorskiej, jak pisze Doktorantka, było określenie, w jaki sposób regulowany \jest poziom polimeraz z rodziny Y (Pol eta i Rev1) w cyklu komórkowym, w odpowiedzi na stres genotoksyczny w komórkach Saccharomyces cerevisiae".

Podjęty cel badań należy uznać za trudny, na miarę poważnego wyzwania naukowego, z racji złożoności układu badawczego i konieczności analizy poziomu syntezy badanych polimeraz TLS na poziomie zarówno mRNA, jak i białek akumulowanych w komórkach w różnych fazach cyklu komórkowego *S. cerevisiae,* w odpowiedzi na stres genotoksyczny wywołany działaniem promieniowania UV i hydroksymocznika. Synchronizacja komórek na poszczególnych etapach cyklu komórkowego, oraz konieczność przeprowadzenia serii równoległych doświadczeń w warunkach normalnych hodowli drożdży, nie poddanych stresowi genotoksycznemu były, jak sądzę, nie tylko dodatkowym wyzwaniem, ale także potwierdzeniem „biegłości" warsztatowej mgr Aleksandry Sobolewskiej. Co więcej, dodatkowym, ciekawym celem przeprowadzonych badań było poszukiwanie odpowiedzi na temat roli białek kontrolnych fazy S (Mrc1 i Rad 9) w aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego (PKCK). Cel ten zrealizowano na modelu skonstruowanych mutantów drożdży, odpowiednio, z wyłączonymi ścieżkami odpowiedzi na uszkodzenia DNA.

Jednak do najważniejszych, bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń zaliczam te, w których progresję cyklu komórkowego drożdży zatrzymywano w określonej fazie, komórki naświetlano wcześniej ustaloną dawką UV, a efekty w postaci indukcji i akumulacji mRNA badanych polimeraz, analizowano w czasie rzeczywistym metodą real-time PCR, RT-qPCR.

Praca doktorska mgr Aleksandry Sobolewskiej ma postać monografii, (106 stron), napisanej poprawnym językiem naukowym i ładną polszczyzną. Układ pracy jest typowy, przyjęty dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Obejmuje starannie opracowane rozdziały: zwarte *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, część teoretyczną pracy (*Wstęp*), w której Doktoranta przedstawiła aktualne dane, obficie cytowanej literatury światowej (306 pozycji) na temat zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych przyczyn oraz źródeł różnego rodzaju uszkodzeń DNA, punktów kontroli cyklu komórkowego, złożonego systemu tolerancji uszkodzeń DNA, możliwych ścieżek odpowiedzi komórek na te uszkodzenia, a także budowy oraz roli biologicznej i regulacji badanych Pol eta i Rev1. Z dużym, naukowym zainteresowaniem przeczytałem treści tego bardzo dobrze opracowanego rozdziału. Z racji moich zainteresowań naukowych rolą biologiczną różnych sekwencji powtórzonych, w tym sekwencji mikrosatelitarnych w mutagenezie i genetycznej niestabilności genomów, z należną uwagą zapoznałem się z nowymi dla mnie, zaskakującymi danymi, na temat niekanonicznych funkcji polimerazy Pol eta, w tym w generowaniu mutacji w regionach bogatych w pary A-T, prowadzących do różnicowania genów kodujących przeciwciała w procesie somatycznej hypermutacji, a także generowaniu rearanżacji strukturalnych w łamliwych miejscach chromosomów, w tym w procesie inicjacji procesu transformcji nowotworowej. Sadzę. że podobny mechanizm może być odpowiedzialny za pojawianie się rearanżacji strukturalnych w przypadku łamliwego chromosomu X (ang. *chromosom X syndrome*), a także w wielotorbielowatości nerek (ang. *PKD syndome*). Dodam w zakończeniu tej części mojej recenzji, że zamieszczone w części teoretycznej pracy bardzo ładne, kolorowe rysunki ułatwiają czytelnikowi lepsze zrozumienie złożonych, molekularnych mechanizmów działania polimeraz TLS i odpowiedzi komórek na różnorakie uszkodzenia DNA. Bardzo klarowny rysunek zamieszczony na stronie 11 p.t. „*Wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe źródła uszkodzeń DNA*", proponowałbym uzupełnić jeszcze możliwością tworzenia przestrzennych struktur DNA (*Z-DNA, triplex, harpin stucture*) w wielu regionach genomów, noszących trakty różnych sekwencji powtórzonych. Struktury te, jak dowiedziono. stanowią przestrzenną zawadę dla widełek replikacyjnych, stopują ciągłość replikacji, co w konsekwencji skutkuje w postaci licznych pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA.

Nie mam wątpliwości, że mgr Aleksandra Sobolewska posiada dużą, aktualną wiedzę w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki oraz wystarczające zawodowe doświadczenie w prowadzeniu doświadczalnych badań poznawczych. Uważam więc, że może z powodzeniem podejmować kolejne, ważne projekty badawcze w dziedzinie mutagenezy i funkcjonowania

systemów naprawy błędów i uszkodzeń DNA w „zdrowiu i w chorobie" komórek, nieustannie poddawanych działaniu różnorodnych egzogennych i endogennych czynników i stresów.

Nie mam żadnych uwag krytycznych dotyczących zastosowanych w doświadczeniach metod i technik hodowlanych i molekularnych. Stwierdzam z uznaniem, że nowoczesne metody i techniki dla analizy DNA, mRNA, i białek badanych polimeraz Pol eta i Rv1 zostały dobrze dobrane, właściwie zastosowane i dokładnie opisane w rozdziale *Materiały i Metody.*

Ze zwykłej ciekawości chciałbym zapytać o naturę i mechanizm działania dość „tajemniczego" czynnika α, wyprodukowanego w Zakładzie Biofizyki IBB, a użytego przez Doktorantkę do zatrzymania komórek drożdży w fazie G1 cyklu komórkowego. Drugie pytanie dotyczy badania zawartości DNA metodą cytometrii przepływowej. Czy ta metoda jest dokładniejsza lub szybsza w porównaniu dz tradycyjnymi metodami ilościowej analizy DNA? Trzecie pytanie jest związane z dość istotną informacją, przedstawioną na 54 stronie ocenianej pracy doktorskiej. Mgr Aleksandra Sobolewska pisze, że „ze względu na bardzo niski poziom Pol eta oraz związany z tym problem z detekcją natywnej formy tej polimerazy w analizie western blot - wszystkie dane literaturowe dotyczące regulacji tej polimerazy oparte były o eksperymenty z wykorzystaniem białek fuzyjnych". Pisze dalej, „w naszej Pracowni wykazano różnice w stabilności pomiędzy różnymi formami Pol eta. Stąd, opracowano metodę detekcji natywnej Pol eta, eksprymowanej z naturalnego promotora, którą zastosowano w niniejszej pracy doktorskiej do oznaczania poziomu tej polimerazy. Pytam więc, czy różnice w stabilności rożnych fuzyjnych form Pol eta, wobec natywnej formy tej polimerazy, okazały się na tyle istotne, że należałoby skorygować niektóre literaturowe dane, a może nawet niektóre bardziej ogólne wnioski ?

Jak pisałem wcześniej, znaczna część wyników bardzo dobrze udokumentowanych wyników, opisanych i przedyskutowanych w rozdziałach *Wyniki* i *Dyskusja* monografii doktorskiej mgr Aleksandry Sobolewskiej, została opublikowana w 2020 roku w specjalistycznym, „rankingowym" czasopiśmie naukowym *Current Genetics.* Czuję się więc zwolniony z ponownej, szczegółowej oceny wartości naukowej wszystkich rezultatów. Po uważnej analizie wszystkich wyników opisanych w rozdziale *Wyniki*, podsumowanych na 79 stronie w postaci 5 uprawnionych wniosków końcowych, a także bardzo umiejętnie zrekapitulowanych w postaci autorskiego rysunku, („*Modelu regulacji poziomu polimeraz rodzinyY*"), ograniczę swoją ocenę zaledwie do kilku, moim zdaniem, oryginalnych wyników, do których zaliczam:

- Wykazanie, że indukcja polimerazy Pol eta na poziomie transkrypcji zachodzi przede wszystkim w komórkach traktowanych UV w fazie S cyklu komórkowego.

- Wykazanie, że po działaniu UV poziom polimerazy Rev 1 zwiększa się nieznacznie we wszystkich fazach cyklu komórkowego, ale najwyższą wartość osiąga także w komórkach naświetlanych UV w fazie S.

Zatem, regulacja obydwu polimeraz na poziomie transkrypcji, w odpowiedzi na uszkodzenia DNA promieniowaniem UV, jest podobna. Stres genotoksyczny blokuje lub spowalnia fazę S, przesuwa akumulację polimeraz Y z fazy G_2 do fazy S, Stąd, największa kumulacja transkryptów ma miejsce w fazie S, wydłużonej pod wpływem działania UV.

- Za bardzo interesujące, dla mnie nawet zaskakujące, wyniki uznaję te, które dowodzą, że w warunkach wysokiego stresu genotoksycznego, w rezultacie zastosowania bardzo wysokich dawek promieniowania UV, dochodzi do bardzo silnego zahamowania akumulacji badanych polimeraz Y.

Sugestię Doktorantki, że obniżeniu poziomu polimeraz o niskiej wydajności „naprawczej" rozległych, masowych uszkodzeń DNA, może towarzyszyć preferencyjne korzystanie przez komórki bardziej wiernych, wydajniejszych systemów naprawy jak TS (ang. Template

Switching), umożliwiających ukończenie replikacji ich genomów poprzez syntezę DNA na matrycy nieuszkodzonej nici, siostrzanej chromatydy - uznaję jako prawdopodobną, ale wymagającą eksperymentalnego potwierdzenia.

- Za równie ważne uważam wyniki, które jednoznacznie wskazują, że supresja badanych polimeraz w komórkach drożdży, traktowanych wysokimi dawkami promieniowania UV, jest warunkowana aktywacji ścieżki „ sygnalingu" zależnej od białka regulatorowego Rad 9.

Myślę, że doświadczalne wyjaśnienie roli tego białka mediatorowego w regulacji badanych polimeraz Y będzie celem dalszych badań, których wyniki mogą zaowocować w postaci kolejnej, wartościowej publikacji.

Nie do końca zrozumiałem jednak stwierdzenie Doktorantki, sformułowane w *Dyskusji*, (strona 76), że bardziej prawdopodobny mechanizm ograniczający poziom polimeraz Y, w następstwie traktowania komórek promieniowaniem UV, działa raczej na poziomie białka, a nie na poziomie mRNA.

Proszę więc mgr Aleksandrę Sobolewską o bliższe, dokładniejsze uzasadnienie tej interesującej sugestii.

Wniosek końcowy

W oparciu o dokonaną analizę rezultatów przedstawionych w monografii doktorskiej mgr Aleksandr Sobolewskiej, w znacznej części opublikowanych w 2020 roku w pracy doświadczalnej , w specjalistycznym czasopiśmie naukowym Current Genetics stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie formalne i naukowe wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych,. Z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Aleksandry Sobolewskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.