



Dr hab. Anna Bielak-Żmijewska, profesor instytutu
Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
a.bielak@nencki.edu.pl

Warszawa, 21.08.2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Doroty Dziuban-Lech

pt. Charakterystyka statusu redoks oraz profilu wybranych lipidów u myszy z deficytem białka naprawy DNA – ERCC1

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej oraz w Zakładzie Biochemii Lipidów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Speiny.

W przedstawionej do oceny rozprawie, mgr Dorota Dziuban-Lech podjęła się badania zmian towarzyszących starzeniu, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w profilu i metabolizmie wybranych lipidów. Badanie procesu starzenia, oprócz tego że jest ciekawe z biologicznego punktu widzenia, posiada również bardzo ważne aspekty praktyczne. Społeczeństwo starzeje się, ludzie żyją coraz dłużej i w związku z tym rośnie zapadalność na choroby charakterystyczne dla wieku podeszłego. Jedną z najbardziej atrakcyjnych strategii, w myśl zasady lepiej zapobiegać niż leczyć, jest próba spowolnienia starzenia, co w efekcie mogłoby opóźnić lub nawet wyeliminować choroby związane z wiekiem. Żeby taką strategię wdrożyć, potrzebne jest bardzo dogłębne i wielowymiarowe poznanie zmian pojawiających się wraz z wiekiem. Jest jeszcze wiele niewiadomych i nie do końca znamy odpowiedź na pytanie, dlaczego się starzejemy. Wiadomo już jednak, że ważną rolę odgrywają zmiany na poziomie komórkowym i starzenie komórek budujących tkanki i narządy. Jedną z głównych przyczyn starzenia komórkowego jest akumulacja uszkodzeń DNA, u podłoża której leżą zarówno podwyższony przewlekły stan zapalny i zwiększona produkcja wolnych rodników (odpowiedzialnych za powstawanie uszkodzeń), jak i spadek naprawy DNA i obniżona ochrona antyoksydacyjna. I taki właśnie model przyspieszonego starzenia wywołanego akumulacją uszkodzeń DNA, myszy *Ercc1*^{-/-}, wykorzystywała Doktorantka. Celem było pogłębienie wiedzy o tym, jak brak naprawy DNA wpływa na zmiany w innych makrocząsteczkach na poziomie komórkowym oraz w wybranych narządach. Zaproponowany model jest już dobrze poznany i zaakceptowany przez biogerontologów. U zwierząt z usuniętym genem *Ercc1*, kodującym białko zaangażowane w naprawę DNA i wchodzące w skład kompleksu z XPF (ERCC1-XPF), głównej endonukleazy niezbędnej do naprawy



uszkodzeń DNA typu NER (Nucleotide Excision Repair), dochodzi do akumulacji uszkodzeń podwójnej nici DNA, zahamowania proliferacji komórek i zaburzenia wzrostu organizmu. W efekcie pojawiają się objawy przedwczesnego starzenia, choroby neurodegeneracyjne i wzrasta zapadalność na niektóre typy nowotworów, co obserwowano u myszy z delecją, ale również u człowieka z brakiem funkcjonalnej endonukleazy. Badania zespołu w którym pracowała Doktorantka pokazały, że embrionalne fibroblasty myszy *Ercc1*^{-/-} są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny niż fibroblasty otrzymane od myszy typu dzikiego, a podanie antyoksydantów opóźnia starzenie zarówno na poziomie komórki jak i organizmu. Istnieją podejrzenia, że przyczyną przedwczesnego starzenia myszy *Ercc1*^{-/-} jest stres oksydacyjny wywołany ekspozycją na tlen atmosferyczny. Do zbudowania takiej hipotezy posłużyły dane pokazujące, że u myszy *Ercc1*^{-/-} rozwój prenatalny przebiega prawidłowo, a zmiany charakterystyczne dla progerii (przedwczesne starzenie) pojawiają się dopiero po zakończeniu życia płodowego.

Celem pracy było uzupełnienie wiedzy dotyczącej mechanizmu przyspieszonego starzenia myszy z deficytem ERCC1-XPF oraz próba wyjaśnienia roli stresu oksydacyjnego w uszkodzeniach makrocząsteczek budulcowo-strukturalno-funkcjonalnych komórki tzn. wpływu na peroksydację lipidów oraz uszkodzenia białek. Doktorantka chciała zbadać, czy takie zmiany mogą przyczyniać się do przedwczesnego starzenia myszy *Ercc1*^{-/-}. Jednym z głównych celów była analiza metabolizmu i składu lipidów u zwierząt z delecją, w tym wybranych lipidów szlaku mewalonowego, takich jak: skwalen, cholesterol i dolichole, co do tej pory nie było badane w tym modelu. Istnieją dowody wskazujące na to, że podczas starzenia dochodzi do zmian w składzie i ilości lipidów. Dotychczas nie było danych na temat metabolizmu lipidów w komórkach/narządach zwierząt z uszkodzonym kompleksem endonukleazy i to skłoniło Doktorantkę do podjęcia takich badań.

Odnosząc się do strony formalnej rozprawy, ma ona układ typowy dla tego rodzaju opracowań i zawiera: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, opis materiałów i metod, wyniki i dyskusję, po której znajduje się podsumowanie i wnioski. Ostatnim elementem jest spis literatury, który zawiera ok. 300 pozycji, z czego ok 40% stanowią prace opublikowane w ostatnich 10-ciu latach. Wstęp poprzedzony jest bardzo drobiazgowym, starannie przygotowanym i konsekwentnym wykazem stosowanych skrótów oraz tabelą z wyszczególnionymi, omawianymi później, kwasami tłuszczowymi. Rozprawa doktorska liczy 202 strony. Dysertacja napisana jest w sposób przejrzysty, w zdecydowanej większości Doktorantka posługuje się jasnym, poprawnym językiem naukowym. Pod względem edytorskim praca przygotowana jest bardzo starannie i zawiera tylko nieliczne

literówki, co przy tak obszernym dziele jest dużym osiągnięciem. Kilka błędów dotyczących m.in. sformułowań, terminologii lub przejęczyń znajduje się w uwagach szczegółowych, przekazanych do wiedzy Doktorantki. Ryciny przygotowane są również bardzo starannie, z dużą dozą estetyki i wszystkie są zrobione w podobnej konwencji, co umożliwia łatwe zorientowanie się w wynikach i zwiększa ich czytelność. Wyniki zostały starannie opracowane od strony statystycznej.

Należy podkreślić, że interpretacja wyników jest rzeczowa, pozbawiona nadinterpretacji, co wskazuje na krytyczne podejście do otrzymanych danych oraz dojrzałość naukową Doktorantki.

Wstęp przedstawiono na prawie 40 stronach. Jest on bogato ilustrowany niezbędnymi wzorami i schematami, co pozwala lepiej śledzić prezentowany temat. Wprowadzenie napisane jest bardzo jasno i umożliwia zapoznanie się z obecnym stanem wiedzy. Doskonale wprowadza w temat pracy i pozwala zrozumieć przesłanki jakie towarzyszyły podjęciu badań. Można dyskutować nad kolejnością poruszanych zagadnień (np. czy nie lepiej najpierw omówić model), ale trudno się nie zgodzić, że wprowadzenie jest usystematyzowane, logiczne i zawiera wszystko to, co jest niezbędne do zrozumienia tematu.

Cele pracy są określone w jasny sposób, dodatkowo wyszczególniono etapy pracy doświadczalnej, a przesłanki do badań są przekonujące i poparte wynikami własnymi i zaczerpniętymi z literatury.

Materiały i metody są opisane skrupulatnie i szczegółowo. Zawierają wiele szczegółów technicznych umożliwiających powtórzenie danej metody. Metodyka jest adekwatna do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Pewien niedosyt budzi opis hodowli komórkowej. Brak informacji o specyfice hodowli fibroblastów, zarówno pierwotnych jak i unieśmiertelnionych (w szczególności komórek Erc177). W jakiej gęstości hodowano komórki? Jak często je przesiewano? Ile razy się dzieliły (liczba pasaży lub podwojenia populacji)? Na którym pasażu wykonywano doświadczenia? Jak szybko komórki się starzeją?

Rozdział Wyniki jest bardzo obszerny, opisany na ok. 70 stronach i jest zobrazowany 33 rycinami, w większości są one złożone i składają się z kilku wykresów. Wyniki są również przedstawione w 25 tabelach, które są przygotowane w identycznej konwencji i są bardzo czytelne. Wszystkie opisy pod rycinami i tabelami w pełni pozwalają się zorientować, co dany wykres/tabela zawiera (wariant, liczba zwierząt). Jedynym udoskonaleniem jakie mogłabym zaproponować w przypadku rycin złożonych jest, aby opis, czego poszczególne wykresy dotyczą (np. badany narząd – wątroba, mózg, nerki, np. Ryc. 4.11. lub płeć – kohorta, samce,



samice, np. 4.17.) znajdował się nie tylko w legendzie pod rysunkiem, ale również obok wykresu. Układ opisu wyników jest logiczny i Doktorantka w konsekwentny sposób omawia kolejne etapy badań. Opracowanie wyników nie budzi zastrzeżeń, są one przekonujące, prawidłowo zinterpretowane. Część doświadczalna jest przygotowana rzetelnie i w uporządkowany sposób.

W ramach pracy doktorskiej mgr Dorota Dziuban-Lech wykazała, że brak prawidłowej naprawy DNA ma charakter wielowymiarowy i prowadzi, poprzez wzrastającą produkcję wolnych rodników, do uszkodzeń również innych makrocząsteczek, w tym białek kluczowych do utrzymania homeostazy. Wzrost RFT powoduje peroksydację lipidów, która jest dodatkowym czynnikiem wpływającym na stres oksydacyjny i uszkodzenia kolejnych makrocząsteczek. Doktorantka wykazała, że zwiększona wrażliwość na stres oksydacyjny wynikający z akumulacji uszkodzeń DNA, pociąga za sobą zmiany w metabolizmie lipidów. Zmiany w profilu lipidowym są zależnie od płci oraz badanego narządu, co jest bardzo ciekawą obserwacją. Praktyczny potencjał posiadają również wyniki dotyczące zmian w składzie i ilości dolicholi (najbardziej spektakularne zmiany wykryto w mózgu). Zaobserwowano przesunięcie profilu dolicholi w kierunku długołańcuchowych, ale na razie trudno stwierdzić, jakie to ma znaczenie. Otrzymane dane wspierają wcześniejsze doniesienia, że związki te mogą być rozpatrywane jako potencjalne markery starzenia. Doktorantka pokazała, że mysie fibroblasty zarodkowe *Ercc1^{-/-}* mają większą wrażliwość na stres oksydacyjny i na produkty peroksydacji lipidów. Ale w badanych narządach myszy z brakiem funkcjonalnej endonukleazy poziom markera peroksydacji lipidów, MDA, nie zmienia się. Wykryto za to w mózgu więcej adduktów HNE z białkami. Podczas analizy profilu lipidowego w komórkach, ale nie narządach, zaobserwowano zmniejszoną ilość kwasów tłuszczowych nienasyconych (zarówno jedno- jak i wielonienasyconych), ale nie było zmian w poziomie kwasów tłuszczowych nasyconych. W komórkach nie wykryto istotnych zmian w poziomie cholesterolu, mimo że obserwowano wzrost poziomu jego prekursora, skwalenu, co sugeruje zaburzony szlak syntezy cholesterolu powyżej skwalenu lub jego większą degradację. W badanych narządach ilość skwalenu rosła tylko w mózgu samic, ale było to skorelowane ze wzrostem ilości cholesterolu. W mózgu samców obserwowano tendencję spadkową zarówno skwalenu jak i cholesterolu, ale jego ilość wzrastała znacząco w wątrobie. Podsumowując, metabolizm lipidów, który jest kluczowy dla utrzymania homeostazy, podlega zmianom podczas procesu starzenia wynikającego z braku funkcjonalnego enzymu odpowiedzialnego za

naprawę DNA. Badania pozwoliły rozszerzyć wiedzę dotyczącą przyczyn starzenia myszy *Ercc1^{-/-}*.

Dyskusja mieści się na 20 stronach. Poprowadzona jest w poprawny i ciekawy sposób, choć skrócenie jej wpłynęłoby pozytywnie na odbiór. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą i skrupulatnością, oraz konsekwencją w odnoszeniu się do danych obecnych w literaturze. Skonfrontowała wyniki własne z opisanymi dotychczas oraz omówiła w kontekście tego, co wiadomo o znaczeniu konkretnych zmian w procesie starzenia. Jedynym punktem do krytyki jest powtarzanie w Dyskusji informacji zawartych wcześniej w Wynikach oraz Wstępie. Trochę brakuje zbiorczych podsumowań i uogólnień pokazujących, jakie jest globalne znaczenie otrzymanych wyników oraz jak otrzymane wyniki można wykorzystać, a także co jest najbardziej ciekawym punktem wyjścia do dalszych badań.

Rozdział Podsumowanie i wnioski jest tak naprawdę samym podsumowaniem, które jest dość długie i zawiera liczne powtórzenia. Bardzo brakuje wypunktowanych wniosków i mam nadzieję, że pojawią się one w prezentacji podczas obrony. Można to oczywiście przypisać ostrożności w formułowaniu kategorycznych stwierdzeń, ale szkoda nie zamknąć tej bogatej i ciekawej rozprawy choćby małą liczbą wniosków. Należy podkreślić, że Doktorantka bardzo dobrze porusza się w badanym temacie i niewątpliwie posiada dużą wiedzę w tym zakresie, jak i operuje nią w sposób swobodny. Po podsumowaniu znajduje się tabela przedstawiająca zbiorczą analizę profilu lipidowego, uwzględniająca różnice między myszami *Ercc1^{-/-}* i typu dzikiego. Jest bardzo czytelna i pomocna.

Przedstawiona praca jest bardzo interesująca i wnosi sporo nowego do analizy wpływu stresu oksydacyjnego na uszkodzenia makrocząsteczek w komórce i analizie zmian towarzyszących przyspieszonemu starzeniu myszy *Ercc1^{-/-}*. Podczas czytania pracy nasunęło mi się parę pytań, które, mam nadzieję, przyczynią się do ciekawej dyskusji podczas obrony.

- Czy możliwe jest, aby inny mechanizm niż tylko zmiana stężenia tlenu atmosferycznego był odpowiedzialny za to, że fenotyp *Ercc1^{-/-}* ujawnia się dopiero w okresie postnatalnym?
- We wstępie Doktorantka podzieliła starzenie na fizjologiczne i patologiczne. Od jakiegoś czasu toczy się dyskusja, czy możemy rozdzielić starzenie w taki sposób. Coraz częściej zwycięża pogląd, że molekularne i komórkowe podstawy starzenia są takie same u wszystkich osób, lecz tempo i nasilenie tych procesów może być różne. Starzenie może ponadto przebiegać w sposób przyspieszony (progeria) i być wynikiem np. wrodzonej wady genetycznej (progeria Hutchinsona-Gilforda, zespół Wernera) lub jak w przypadku modelu wykorzystanego przez Doktorantkę, manipulacji prowadzącej do powstania niefunkcjonalnego

białka. Doktorantka wprowadziła we wstępie również pojęcie „starzenie pozytywne (zwyczajne)”. Trudno się zgodzić, że jest to trafne określenie. Raczej unikałabym takiego pojęcia.

- Czy starzenie organizmu rzeczywiście jest wynikiem zwiększonej apoptozy i nekrozy (taka informacja pojawiła się we wstępie na stronie 28)? W przypadku neurodegeneracji można zgodzić się z takim stwierdzeniem, ale czy są dowody na to, że starzenie organizmu jest skutkiem masowego umierania komórek (pomijając aspekt przyspieszonego starzenia jako skutku terapii np. przeciwnowotworowej)? Wysoki poziom RFT może wywołać apoptozę, ale również starzenie komórkowe. Ale według obecnej wiedzy, to starzenie komórkowe, a nie masowa apoptoza, jest przyczyną starzenia organizmu. Uważa się, że stare komórki akumulują się w organizmie i są odpowiedzialne za zwiększony stan zapalny (efektem jest zwiększona produkcja białek prozapalnych, tzw. fenotyp sekrecyjny, Senescence-associated secretory phenotype, SASP), który może być przyczyną indukcji starzenia w komórkach sąsiadujących i nie tylko. Czy Doktorantka mogłaby ustosunkować się do tego zagadnienia?
- Doktorantka napisała, że karbonylacja białek podczas starzenia i stresu oksydacyjnego wydaje się być procesem selektywnym (str. 34). Czy mogłabym prosić o rozwinięcie tego zagadnienia? Jaki mechanizm jest/mógłby być odpowiedzialny za taką selektywność? Podobną selektywność sugerowano przy omawianiu wyników z traktowania HNE i tworzeniu adduktów. Dochodzi do uszkodzenia białek zaangażowanych w różne procesy i chyba trudno mówić tu o selektywności w stosunku do enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów.
- Dlaczego enzymy szlaku miewalonowego badano tylko na poziomie ekspresji genów? Jak sama Doktorantka napisała, ich działanie może być regulowane na wielu poziomach. Spadek ekspresji nie musi oznaczać spadku aktywności. I odwrotnie, wzrost ekspresji genu nie musi wpływać na zwiększoną aktywność. Bez informacji o aktywności enzymu trudno wyciągać wnioski. Co wiadomo o regulacji aktywności tych enzymów?
- Czy przy analizie skupisk γ H2AX brano pod uwagę liczbę skupisk w pojedynczej komórce, czy tylko komórki, w których skupiska były obecne. Liczba skupisk mówi bardzo wiele o tym, co w komórce się dzieje. Gdy jest ich mało, istnieje szansa, że są przejściowe. Gdy całe jądro jest wypełnione ufosforylowanym histonem można przypuszczać, że jest to komórka, która ulegnie apoptozie. W pracy podano tylko liczbę komórek, w których znaleziono skupiska.
- Dość trudno się zorientować i można tylko zgadywać, jaki materiał był w rzeczywistości analizowany. Raz Doktorantka pisała o analizie tkanek takich jak mózg, wątroba nerki, ale to



nie są tkanki tylko narządy. Z kolei opisy przy wykresach mówią, że analizie poddano wątrobę, mózg i nerki, czyli jednak narządy. Z opisu nie wynika, że analizowano poszczególne tkanki i raczej można domniemywać, że chodzi o skrawki całych narządów. Czy tak właśnie należy to rozumieć? Pojawia się również sformułowanie pula tkanek.

- W Dyskusji brak jest próby odniesienia się do wyników dotyczących zmian w metabolizmie lipidów w zależności od płci. Skąd mogą wynikać te różnice w przypadku myszy z delecją? Czy można znaleźć dla nich wytłumaczenie/uzasadnienie? Jaka może być funkcja/znaczenie?
- Duże zainteresowanie budzi niezidentyfikowany związek, którego poziom znacząco wzrasta. Jaki jest pomysł na dalsze badanie znaczenia tego związku?
- Zaobserwowano, że poziom dolicholi wzrasta w mózgu myszy *Erccl^{-/-}* oraz zmienia się ich skład. Na razie nie wiadomo, jakie to może mieć znaczenia funkcjonalne. Ale może Doktorantka ma jakąś hipotezę lub pomysł i pokusiłaby się o spekulacje, dlaczego tak się dzieje?

Uwagi

- Zdecydowanie narząd, nie organ.
- Opisując analizowane narządy, w tym przypadku mózg i wątroba, stosujemy liczbę pojedynczą. Jedynie w przypadku nerek może być liczba mnoga, bo to narząd parzysty. Czyli powinno być: np. skład lipidów analizowano w mózgu i wątrobie, a nie w mózgach i wątrobach myszy.
- Doktorantka używa terminu ekstrakty bezkomórkowe i komórkowe. To może wprowadzać w błąd. Co to znaczy ekstrakty bezkomórkowe? To jednak są ekstrakty z komórek, tylko wnioskuję, że pozbawione białek związanych z błonami, organellami, chromatyną. W przeciwieństwie do ekstraktów całokomórkowych (nazywanych przez Doktorantkę komórkowymi). Sugerowałabym użycie terminów ekstrakty całokomórkowe vs. frakcja pozbawiona białek związanych z błonami i organellami (cytozolowe może być niewystarczające, gdyż nie jest to czysta frakcja białek cytoplazmatycznych).

Podsumowując, podjęty temat jest bardzo aktualny i interesujący. Doskonale wpisuje się w tematykę badań dążących do rozszyfrowania problemu dlaczego się starzejemy i jakie zmiany towarzyszą starzeniu. Badania podjęte przez Doktorantkę są nowatorskie i poszerzają wiedzę dotyczącą zmian wynikających z podwyższonej produkcji wolnych rodników, jak i obniżeniu efektywności mechanizmów obronny antyoksydacyjnej na makrocząsteczki inne niż DNA. Badania prowadzone były na myszach z progerią, zespołem przedwczesnego starzenia, ale



otrzymane wyniki mogą być przełożone na starzenie nie tylko przyspieszone. Bardzo interesujące są analizy ilościowe i jakościowe składu lipidów, których zmiany podczas starzenia były już sygnalizowane. Na uznanie zasługuje dobry wybór modelu doświadczalnego, a analiza na poziomie zarówno komórkowym jak i całego organizmu dodaje badaniom dodatkowego znaczenia i atrakcyjności. Zaplanowane doświadczenia były pracochłonne, ale ich analiza wymagała równie dużego wysiłku. Mimo że nie wszystkie wyniki pokazują spektakularne różnice, to przedstawiona praca jest przykładem solidnego i rzetelnego podejścia do zagadnienia. Jednym z celów była próba odpowiedzi na pytanie, czy zmiany w profilu lipidowym i uszkodzenia białek mogą być przyczyną starzenia myszy z delecją *Ercc1*. Na to pytanie nie udało się odpowiedzieć w sposób jednoznaczny, gdyż jednak pierwotną przyczyną są w tym przypadku uszkodzenia DNA. Niemniej, Doktorantka wykazała szereg zmian, które z pewnością przyczyniają się do całościowego obrazu fenotypu zwierząt z progerią. Wyniki są wartościowe, mają szansę być dobrze odebrane przez środowisko biogerontologów oraz mają duży potencjał naukowy i praktyczny, a wyrażone przeze mnie uwagi krytyczne w żadnym stopniu nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Część wyników została już opublikowana w 2018 roku w czasopiśmie *Free radical biology and medicine*.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr Doroty Dziuban-Lech spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Doroty Dziuban-Lech do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

Anna Bielak-Żmijewska

Anna Bielak-Żmijewska