

Warszawa, 10 sierpnia 2020 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Doroty Dziuban-Lech

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

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Wiceprzewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Pani prof. dr hab. Joanny Kruszewskiej, z dnia 15 lipca 2020 roku (pismo nr RN/SPD-12-678/2020), w związku z decyzją Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Doroty Dziuban-Lech.

Rozprawa doktorska Pani mgr Doroty Dziuban-Lech została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej oraz w Zakładzie Biochemii Lipidów w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, pod kierunkiem Pani dr hab. Elżbiety Speiny. Rozprawa jest obszernym, 202-stronicowym dziełem, obejmującym streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, 39 stron wstępu, poświęconego zagadnieniom stresu oksydacyjnego, uszkodzeniom makromolekuł w procesie starzenia komórek i organizmu, metabolizmowi lipidów oraz funkcjonowaniu endonukleazy ERCC1-XPF, 18 stron opisu materiałów i metod oraz 92 stron opisu uzyskanych wyników i ich dyskusji. Opis eksperymentów jest wystarczająco szczegółowy, aby można było ocenić stronę doświadczalną i dobrze zilustrowany (33 ryciny i 25 tabel). To zestawienie mówi wiele o ogromnym jak na doktorat materiale doświadczalnym i szerokim spektrum metod badawczych. Literatura przedmiotu jest bardzo dobrze dobrana. Autorka wybrała 290 pozycji, nie ograniczając się do prac najnowszych. Język pracy jest poprawny, a zakres przeprowadzonych badań oraz dyskusja i wnioski przedstawione są klarownie. Cel pracy został sprecyzowany jasno i konkretnie. Treść założeń, rozumowań i wniosków jest jednoznaczna i stąd dobrze zrozumiała. Praca od strony edytorskiej jest bardzo starannie opracowana, a układ graficzny i rozplanowanie tekstu zasługują na bardzo dobrą ocenę.

Przedmiotem pracy było poznanie mechanizmu przyspieszonego starzenia u organizmów z deficytem endonukleazy ERCC1-XPF. Problem jest bardzo ciekawy z poznawczego punktu widzenia, ponieważ pomimo wielu lat badań nad etiologią starzenia, które niezaprzeczalnie wiąże się z występowaniem chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych, mechanizmy tego procesu są wciąż słabo poznane. Problem ten jest również bardzo interesujący z punktu widzenia praktycznego wykorzystania uzyskanej wiedzy do opracowania w przyszłości nowych strategii terapeutycznych.

Część doświadczalna pracy obejmowała 6 następujących etapów:

- określenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach po traktowaniu wybranymi produktami peroksydacji lipidów, takimi jak *trans*-4-hydrokso-2-nonenalem, dialdehydem malonowym oraz wodoronadtlenkiem *tert*-butylu,
- określenie potencjału antyoksydacyjnego peroksydazy glutationowej, S-transferazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach po potraktowaniu wybranymi prooksydantami,
- zbadanie zawartości grup karbonylowych w tkankach i komórkach,
- określenie profilu kwasów tłuszczowych tkanek i komórek myszy o genotypie *Ercc1*^{-/-} oraz myszy o genotypie typu podstawowego WT poprzez analizę jakościową i ilościową,
- analizę ilościową profilu wybranych lipidów szlaku mewalonowego – skwalenu, cholesterolu i dolicholi,
- analizę poziomu ekspresji genów szlaku biosyntezy cholesterolu – syntazy skwalenowej, reduktazy 24-dehydrocholesterolowej, steroido-5-alfa-reduktazy 3, *cis*-prenylotransferazy, oraz receptora NogoB.

Materiał do badań stanowiły tkanki mózgu, wątroby i nerek, pobrane od myszy o genotypie typu podstawowego (WT) i myszy o genotypie *Ercc1*^{-/-} oraz 2 linie komórkowe: pierwotne mysie zarodkowe fibroblasty (PMEFs) oraz mysie zarodkowe fibroblasty (MEFs) unieśmiertelnione wirusem SV40. Komórki zostały wyizolowane z zarodków myszy o genotypach *Ercc1*^{-/-} oraz WT. Doktorantka posłużyła się bardzo wieloma metodami badawczymi, takimi jak metody hodowli komórek *in vitro*, metody biochemiczne, metody chromatograficzne (chromatografia cienkowarstwowa, chromatografia gazowa, chromatografia HPLC-UV oraz chromatografia HPLC z detektorem masowym z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym - HPLC/ESI-MS), metoda Western blot, metoda Real-Time PCR, mikroskopia fluorescencyjna, cytometria przepływowa, metody spektrofotometryczne oraz metoda spektrometrii mas. Metody te zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań.

Punktem wyjścia do badań były obserwacje wskazujące na związek między deficytem endonukleazy ERCC1-XPF u myszy, a symptomami przedwczesnego starzenia i wzrostem zachorowania na nowotwory, które doprowadziły do postawienia hipotezy, według której głównym czynnikiem prowadzącym do powstania fenotypu myszy z deficytem endonukleazy ERCC1-XPF jest stres oksydacyjny i wynikające z niego konsekwencje, takie jak peroksydacja endogennych lipidów. Obecnie w literaturze naukowej nie ma danych na temat metabolizmu lipidów u organizmów z uszkodzonym kompleksem endonukleazy ERCC1-XPF. W związku z tym Doktorantka podjęła próbę scharakteryzowania profilu lipidowego tkanek i komórek myszy *Ercc1*^{-/-} oraz próbę określenia odpowiedzi komórek *Ercc1*^{-/-} na wybrane produkty peroksydacji lipidów, które powstają podczas stresu oksydacyjnego.

Pierwszy etap badań dotyczył analizy indukcji stresu oksydacyjnego w mysich embrionalnych fibroblastach unieśmiertelnionych wirusem SV40 oraz w pierwotnych mysich zarodkowych fibroblastach. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę jednoznacznie wykazały, że produkty peroksydacji lipidów, tj. *trans*-4-hydrokso-2-nonenalem, dialdehyd malonowy oraz wodoronadtlenek *tert*-butylu, generowały w sposób zależny od dawki znaczące ilości reaktywnych form tlenu w mysich embrionalnych fibroblastach unieśmiertelnionych wirusem SV40. Doktorantka nie stwierdziła natomiast istotnych różnic w ilości reaktywnych form tlenu pomiędzy genotypami *Ercc1*^{-/-} i WT. Podobnie jak w przypadku unieśmiertelnionych fibroblastów, produkty peroksydacji lipidów zwiększyły poziom reaktywnych form tlenu w pierwotnych mysich zarodkowych fibroblastach obu

genotypów, ale wzrost był znacznie wyższy w komórkach *Ercc1*^{-/-} niż WT. Analiza porównawcza wykazała, że poziom stresu oksydacyjnego w pierwotnych fibroblastach obu genotypów był około 3-krotnie wyższy w porównaniu do fibroblastów unieśmiertelnionych. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników, Doktorantka zastosowała zmiatacz wolnych rodników, XJB-5-131, i wykazała za pomocą metody H2DCFDA, że zwiększony poziom reaktywnych form tlenu był tłumiony w fibroblastach pierwotnych z brakiem *Ercc1*. Potwierdzeniem tych wyników są rezultaty testu gamma-H2AX. Test gamma-H2AX służy do detekcji podwójnoniciowych pęknięć DNA i polega generalnie na liczeniu liczby ognisk gamma-H2AX w komórce przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej, lub poziomu całkowitej fluorescencji za pomocą cytometrii przepływowej. Doktorantka natomiast liczyła liczbę komórek z ogniskami gamma-H2AX. Ciekawi mnie, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na taki sposób przedstawienia wyników. Czy analiza liczby ognisk w komórkach nie była możliwa?

Kolejnym aspektem pracy było zbadanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, usuwających reaktywne formy tlenu oraz produkty peroksydacji lipidów w unieśmiertelnionych mysich zarodkowych fibroblastach. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach *Ercc1*^{-/-} nie różniła się od aktywności tego enzymu w komórkach WT. Aktywność peroksydazy glutationowej zależnej od selenu była istotnie niższa w komórkach *Ercc1*^{-/-}, w porównaniu do komórek WT. Autorka nie zaobserwowała natomiast statystycznie istotnej różnicy w aktywności niezależnej od selenu izoformy GPx pomiędzy komórkami *Ercc1*^{-/-} i WT. Pomiar aktywności S-transferazy glutationowej wykazał znaczące różnice w aktywności pomiędzy komórkami WT i *Ercc1*^{-/-}. Mysie fibroblasty pozbawione genu *Ercc1* miały ponad dwukrotnie niższą aktywność S-transferazy glutationowej niż komórki typu podstawowego. Jest to bardzo ciekawy wynik, ponieważ zmniejszona aktywność tego enzymu może wpływać na kumulację związków toksycznych dla organizmu. Doktorantka słusznie sugeruje, że w komórkach pozbawionych *Ercc1* poziomy reaktywnych form tlenu oraz produktów peroksydacji lipidów mogą być zwiększone ze względu na zmniejszoną ochronę antyoksydacyjną, co następnie może prowadzić do ich reakcji z biokomponentami komórkowymi, które ulegają destabilizacji lub tracą pełnione przez nie funkcje.

Ponieważ zwiększony poziom reaktywnych form tlenu oraz zmniejszona ochrona antyoksydacyjna może prowadzić do peroksydacji lipidów, Doktorantka bardzo słusznie podjęła próbę analizy zawartości głównych produktów peroksydacji lipidów w ekstraktach tkankowych z mózgu, wątroby i nerek myszy o genotypie podstawowym oraz o genotypie *Ercc1*^{-/-}. Uzyskane wyniki są zaskakujące, ponieważ analiza zawartości dialdehydu malonowego nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekstraktami z wątroby, mózgu i nerek myszy o genotypie WT i *Ercc1*. W pełni zgadzam się z Doktorantką, że konieczna jest analiza większej ilości materiału i zwiększenie puli badanych organów, aby potwierdzić zaobserwowane zależności. Analiza ilości adduktów HNE do reszt histydynowych białek również nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekstraktami z wątroby i nerek myszy o genotypie WT i *Ercc1*. Natomiast, na uwagę zasługuje stwierdzenie przez Doktorantkę, znacząco wyższy poziom adduktów HNE do białek w mózgach myszy z delecją genu *Ercc1*, niż u myszy o genotypie WT. Może to bowiem skutkować zmienionym funkcjonowaniem białek, zaburzonym działaniem mózgu oraz neurodegeneracją. Uzyskane wyniki skłoniły Doktorantkę do podjęcia próby identyfikacji białek, z którymi HNE utworzyło addukty. Doktorantka uwzględniła w analizie spektrometrii mas 3 prążki, odpowiadających białkom o masach około 70 kDa, 55 kDa i 27

kDa. W prążku o masie ok. 70 kDa zidentyfikowała 46 białek, z których większość uczestniczy w metabolizmie lipidów, buduje struktury cytoszkieletu, uczestniczy w metabolizmie białkowym, w przemianach cukrów oraz w metabolizmie podstawowym. W prążku o masie ok. 55 kDa Doktorantka zidentyfikowała ok. 70 białek, spośród których większość stanowiły białka uczestniczące w metabolizmie lipidów, aminokwasów i białek oraz ksenobiotyków, jak również w metabolizmie podstawowym. W prążku o masie ok. 27 kDa Doktorantka zidentyfikowała ok. 40 białek, które głównie są zaangażowane w metabolizm lipidów, proces translacji lub transkrypcji, metabolizm glutationu, transport tlenu, metabolizm energetyczny oraz transport elektronów. Ponieważ każde z wymienionych białek jest istotne dla metabolizmu komórki, w przypadku zaburzenia ich funkcji, komórka nie jest w stanie prawidłowo funkcjonować. Autorka sugeruje, że powyższe zmiany mogą również przyczyniać się do powstania fenotypu myszy *Ercc1*^{-/-}.

Dosyć zaskakujące są wyniki doświadczeń, dotyczących zawartości grup karbonylowych w białkach. Analiza wyników *in vivo* nie wykazała statystycznie istotnych różnic w zawartości grup karbonylowych w białkach pomiędzy ekstraktami z badanych organów myszy o genotypie WT i *Ercc1*^{-/-}. Natomiast analiza wyników *in vitro* wykazała, że komórki MEFs *Ercc1*^{-/-} w stanie fizjologicznym mają dużo więcej grup karbonylowych w białkach niż komórki MEFs WT, co może sugerować, że usuwanie uszkodzonych białek jest zaburzone w komórkach MEFs *Ercc1*^{-/-}. W dyskusji nie znalazłam wyjaśnienia tej rozbieżności wyników, dlatego ciekawa jestem sugestii Doktorantki w tej kwestii.

W dalszej części rozprawy Doktorantka podjęła próbę uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy istnieją różnice w składzie frakcji lipidów w komórkach i tkankach myszy *Ercc1*^{-/-} oraz myszy WT oraz czy ewentualne odmienności mogą mieć wpływ na zróżnicowane nasilenie procesu peroksydacji lipidów. W tym celu Doktorantka zastosowała metodę chromatografii gazowej do analizy profilu kwasów tłuszczowych w unieśmiertnionych komórkach MEFs oraz w tkance mózgowej i wątrobowej myszy *Ercc1*^{-/-} i WT. Uzyskane wyniki badań *in vitro* wykazały istotnie mniejszą zawartość kwasów tłuszczowych (FA), jednonienasyconych (MUFA) oraz wielonienasyconych (PUFA) w komórkach *Ercc1*^{-/-} w porównaniu do komórek linii WT. Co ciekawe, wyniki badań *in vivo* nie wykazały istotnych różnic w zawartości kwasów tłuszczowych w mózgu, wątrobie myszy *Ercc1*^{-/-} oraz WT. Natomiast wykazały zaburzoną syntezę, elongację i desaturację kwasów tłuszczowych u myszy *Ercc1*^{-/-}. Następnie Doktorantka zastosowała metodę HPLC/UV do oznaczenia profilu 3 lipidów szlaku mewalonowego, tj. skwalenu, cholesterolu oraz dolicholu w unieśmiertnionych komórkach MEFs oraz w tkankach myszy WT oraz *Ercc1*^{-/-}. Uzyskane wyniki są dość intrygujące, ponieważ zawartość skwalenu (prekursora cholesterolu) w unieśmiertnionych komórkach MEFs była istotnie wyższa w komórkach *Ercc1*^{-/-}, w porównaniu do WT, jednak nie miało to wpływu na zawartość cholesterolu. Natomiast wyniki uzyskane w tkankach nie wykazały różnic w zawartości skwalenu, ale wykazały istotnie większą zawartość cholesterolu w wątrobie myszy *Ercc1*^{-/-}.

Ponieważ myszy pozbawione *Ercc1* wykazują symptomy przyspieszonego starzenia, Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy występują różnice w ilości dolicholu, jednego z markerów starzenia, w tkance mózgowej, wątrobowej i nerkowej myszy *Ercc1*^{-/-} oraz WT. Uzyskane wyniki wykazały większą zawartość dolicholi w mózgu i wątrobie, ale nie w nerkach, myszy *Ercc1*^{-/-}, w porównaniu do myszy typu dzikiego.

Moja duża ciekawość wzbudziły wyniki, które dotyczyły analizy niezidentyfikowanego związku, który pojawiał się we wszystkich badanych tkankach oraz komórkach jako wyraźny, stosunkowo wąski sygnał o dużej intensywności i powtarzalnym

czasie retencji. Co najciekawsze, komórki *Ercc1*^{-/-} zawierały prawie dwukrotnie więcej tego niezidentyfikowanego związku w porównaniu do komórek WT. Doktorantka posłużyła się kolejną, zaawansowaną metodą badawczą - metodą HPLC z detektorem masowym z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (HPLC/ESI-MS). Niestety, wyniki analizy HPLC/ESI-MS nie dały jednoznacznej odpowiedzi, która pozwoliłaby na chemiczną identyfikację tego związku. Wydaje się zatem, że jednym z ciekawych aspektów przyszłej pracy naukowej Doktorantki mogłoby być bardziej szczegółowe wyjaśnienie tej zagadki.

W dalszej części rozprawy Doktorantka skupiła się na wyjaśnieniu, czy zmiana poziomu oznaczonych lipidów, produktów szlaku mewalonowego w tkankach myszy z deficytem *Ercc1*, może wynikać z ich zaburzonej syntezy w tkance mózgowej, wątrobowej i nerkowej myszy. Doktorantka zastosowała metodę RT-PCR w celu analizy poziomu ekspresji wybranych genów kodujących białka ze szlaku biosyntezy cholesterolu – syntazy skwalenu (SQS) i reduktazy 24-dehydrocholesterolowej (*Dhcr24*) oraz dolicholu – NogoB receptora (*NgBR*), *cis*-prenylotransferazy (CPT) oraz reduktazy poliprenolu (*Srd5a3*). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały prawie dwukrotny spadek poziomu ekspresji genu *Dhcr24* w mózgach myszy *Ercc1*^{-/-}, w stosunku do myszy WT oraz nadekspresję *Srd5a3*. Wyniki analizy ekspresji genów w wątrobie wykazały około 2,5-krotny wzrost poziomu mRNA genów *NgBR* i CPT oraz brak różnic w ekspresji genów szlaku sterolowego. Natomiast wyniki analizy ekspresji genów w nerkach wykazały zmniejszony poziom mRNA dla prawie wszystkich genów (z wyjątkiem CPT).

Podsumowując, wyniki pracy są bardzo ciekawe i spójne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat mechanizmów prowadzących do powstania fenotypu przedwczesnego starzenia myszy *Ercc1*^{-/-}. W opinii recenzenta stanowią one niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób analizy wyników oraz ich dyskusji świadczą o bardzo dużej dojrzałości naukowej oraz doskonałym warsztacie badawczym i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani mgr Doroty Dziuban-Lech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę staranne i racjonalne zaplanowanie pracy, bardzo szeroki zakres pracy doświadczalnej, wykorzystanie bardzo wielu zaawansowanych metod badawczych oraz kompetentną ocenę uzyskanych wyników i ich dyskusję uważam, że recenzowana praca zasługuje na wyróżnienie.

Suna Lankoff