



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNI WERSYTET WARSZAWSKI
INSTYTUT GENETYKI i
BIOTECHNOLOGII

ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

19-03-2018

20 marca 2018

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Karoliny Fornalewicz pt. „Związek szlaku pentozofosforanowego z regulacją replikacji DNA w ludzkich fibroblastach”

Szlak pentozofosforanowy stanowi odgałęzienie procesu glikolizy i jest złożony z szeregu reakcji biochemicznych, które prowadzą do wytworzenia NADPH oraz pentoz. Z tego powodu szlak ten jest kluczowym etapem na drodze syntezy prekursorów DNA i RNA. Zaburzenia poziomu pośrednich metabolitów mogą mieć wpływ na tempo replikacji. Paradoksalnie, u prokariotów wykazano, że efekt mutacji w genach kodujących elementy aparatu replikacyjnego może być zniesiony przez delecje niektórych genów kodujących enzymy metabolizmu węglowodanów.

Korzystając z tych ciekawych danych uzyskanych w pracowni promotora niniejszej rozprawy - prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, doktorantka postanowiła zbadać czy istnieje powiązanie regulacji szlaku pentozofosforanowego z replikacją DNA w komórkach ludzkich.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter zestawu publikacji opatrzonej dodatkowo krótkim streszczeniem. Dwie z tych publikacji zostały zamieszczone w prestiżowym czasopiśmie *Gene*, o sile przebicia ok. 2,4. Trzecia praca ma charakter przeglądowy i prezentuje hipotezę zależności replikacji od enzymów metabolizmu związków węglowych. Praca została zamieszczona w czasopiśmie *Medical Hypotheses* o sile przebicia ok 1,1. W materiałach rozprawy znajdują się ponadto oświadczenia współautorów

powyższych publikacji na temat udziału poszczególnych osób w eksperymentach, opracowaniu wyników i pisaniu i redagowaniu publikacji. Oświadczenia te wskazują na to, że udział pani mgr Karoliny Fornalewicz w omawianej rozprawie doktorskiej jest przeważający i w pełni zgodny z wymaganiami ustawy o stopniach i tytule naukowym

Do swoich badań doktorantka użyła pierwotnych fibroblastów z ludzkiej skóry, zakupionych w firmie Cascade Biologics. Firma opisuje tę linię komórek jako pobranej od pojedynczej dorosłej osoby, komórki zdolne do 12 podziałów. W związku z tym nasuwa się pytanie czy analogiczne fibroblasty pobrane od innych osób reagowałyby tak samo, jak opisano w publikacjach stanowiących podstawę doktoratu. Z drugiej strony pragnę podkreślić, że wybór nie unieśmiertelnionych ludzkich komórek w przeciwieństwie do linii posiadających zdolność do nieograniczonych podziałów, w tym komórek nowotworowych – jest w mojej ocenie bardzo słuszny i stanowi o wadze przeprowadzonych eksperymentów. Dotychczasowe badania opisane w literaturze przeprowadzono bowiem na komórkach nowotworowych, które mają rozregulowany system kontroli podziałów komórkowych, albo na komórkach bakteryjnych.

Doktorantka skupiła się na dwóch podstawowych zagadnieniach: po pierwsze czy hamowanie ekspresji enzymów szlaku pentozofosforanowego a za pomocą metody siRNA wpływa na cykl komórkowy ludzkich fibroblastów, i po drugie, czy zastosowanie jednocześnie wygaszania ekspresji enzymów uczestniczących w replikacji DNA i w szlaku pentozofosforanowym będzie w stanie suprymować efekty pojedynczego wyciszenia poszczególnych genów szlaku pentozofosforanowego.

Do swoich badań doktorantka wybrała zestaw dziesięciu genów szlaku pentozofosforanowego, do wyciszenia których zastosowała komercyjnie dostępne siRNA. Synchronizacja cyklu komórkowego fibroblastów została osiągnięta za pomocą zmniejszenia stężenia surowicy bydlęcej w pożywce. Przy wyciszeniu genów H6PD, PRPS1 oraz RPE autorka zaobserwowała zmniejszenie liczby komórek wchodzących w fazę S cyklu komórkowego oraz obniżenie tempa syntezy DNA. Z drugiej strony, dla genów G6PD, RBKS oraz TALDO, efekt wyciszenia był odwrotny, zaś dla genów PGLS, RP1A i TKT nie zaobserwowano zmian w cyklu komórkowym.

W drugim etapie pracy autorka badała dodatkowo wyciszenie genów związanych z replikacją DNA : prymazy 2 (PRIM2), polimerazy iota (POLI), ligazy 4 (LIG4) i topoiizomerazy III-beta (TOP3B) przy równoczesnym wyciszeniu ekspresji niektórych genów szlaku pentozofosforanowego. Efekt obniżenia ekspresji TOP3B został częściowo zniwelowany przez wyciszanie pojedynczych genów metabolicznych RBKS, TKT oraz TALDO. Także w przypadku kombinacji innych genów uzyskano efekt supresji.

Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe i stanowią doskonały materiał wyjściowy do dalszego badania zależności replikacji DNA od aktywności enzymów cyklu pentozofosforanowego. Ze względu na formę ocenianej tu rozprawy doktorskiej czyli cykl publikacji autorka mogła w bardzo niewielkim zakresie dyskutować hipotezy, które można wysnuć na podstawie uzyskanych wyników. Jest to spowodowane surową polityką redakcji czasopism naukowych. Bardzo interesująca jest uwaga, że zróżnicowana odpowiedź komórek na zastosowaną kombinację bodźców sugeruje, że mechanizm tego zjawiska nie polega na bezpośrednim oddziaływaniu pomiędzy białkami szlaku pentozofosforanowego z białkami replikacyjnymi, ale jest wynikiem zmian w stężeniu metabolitów pośrednich szlaku pentozofosforanowego. Taki mechanizm sugerowano dla pirogronianu w regulacji replikacji DNA u E. Coli. Dlatego też chciałbym zapytać doktorantkę w trakcie obrony o możliwość przeprowadzenia eksperymentów na fibroblastach ludzkich, które polegałyby na dodawaniu do pożywki kolejnych metabolitów pośrednich szlaku pentozowego.

Podsumowując, uważam uzyskane i zaprezentowane wyniki za bardzo ciekawe i w istotny sposób pogłębiające naszą wiedzę o współzależnościach regulacyjnych replikacji DNA i metabolizmu cukrów w komórkach ludzkich. Opublikowanie tych wyników w czasopismach z listy filadelfijskiej oznacza, że wyniki te weszły na stale do literatury przedmiotu i mogą się stać podstawą do dalszych badań. W mojej opinii przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 i dlatego wnoszę do wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani magister Karoliny Fornalewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


UNIWERSYTET GDAŃSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT GENETYKI I BIOLOGII
prof. dr hab. Piotr Stępień