



Poznań, 15.10.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Martyny Węglewskiej
prowadzonej przed Radą Wydziału Biologii UAM w Poznaniu

Promotor: prof. UAM dr hab. Elżbieta Poręba

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Martyny Węglewskiej p.t. „Charakterystyka funkcjonalna ludzkiego białka BEND3” została przygotowana w Zakładzie Wirusologii Molekularnej. Tematyka generowania uszkodzeń DNA, ich wpływu na funkcję komórki oraz naprawy DNA od lat była realizowana w kierowanym w przeszłości przeze mnie Zakładzie Mutagenazy Środowiskowej IGCz PAN w Poznaniu. Mówię o tym, by wskazać na pokrywanie się zainteresowań badawczych i pewnego obszaru technik laboratoryjnych, dzięki czemu mogłem czuć się kompetentny do oceny rozprawy przedstawionej do recenzji.

Wyniki studiów literaturowych i pracy badawczej przedstawiono w formie klasycznej rozprawy. Chyba wyboru nie było, bo PubMed podaje tylko dwie publikacje doktorantki. Wyniki jednej z nich (Bieluszewska, Węglewska i in., *FEBS J*, 2018) zostały wykorzystane przy pisaniu rozprawy. Niemniej rozprawa licząca ponad 200 stron przekracza rozmiary prac, do których przywykłem. Jednak rozmiar rozprawy jest też uzasadniony rozległością opracowania literaturowego, mnogością doświadczeń, co konsekwentnie daje sporą dozę wyników a te z kolei trzeba było wyczerpująco przedyskutować. Wszystkie te uwagi nie mają charakteru wartościującego lecz stanowią zdanie sprawy z tego, z czym miałem do czynienia.

Tytułowym zagadnieniem rozprawy było wyjaśnienie udziału białka BEND3 w różnych procesach metabolicznych ze szczególnym zwróceniem uwagi na mechanizmy naprawy cząsteczki DNA. W celu osadzenia zagadnienia w stanie wiedzy Autorka przygotowała wstęp literaturowy rozciągający się na 36 stron a dotyczący uszkodzeń i naprawy DNA a w tym poznanej do tej pory roli białka BEND. Zagadnienie omówione jest bardzo kompetentnie a materiał szeroki i narastający. Mam na myśli rozpoznawanie kolejnych białek biorących udział w naprawie DNA i gromadzenie wiedzy o licznych oddziaływaniach, co stanowi zmienną w odniesieniu do konkretnej ścieżki naprawy jak również zmienną czasową. Całość jest solidnie podbudowana wykorzystaną literaturą. Z ciekawością spojrzałem na dobór

cytowanych prac. Z noblistów (przypomnę: 2015, naprawę DNA zaliczono do chemii) pojawia się raz T. Lindahl. Jednak obecność J. Hoeijemakersa, G. Dogliotti, B. Kainy, M. Zdzienickiej, J. Jiričnego czy G. Dianowa, których wysoko cenię i znam osobiście pozytywnie weryfikuje w moich oczach korzystanie z literatury. Z jednej strony podobała mi się zwartość tematyczna, a z drugiej myślałem nad ewentualnym dalszym wykorzystaniem przygotowanego materiału. Bez zmian nie może się obejść, bo opracowanie przekracza ramy typowego artykułu poglądowego.

Mimo wyrażonej wyżej bardzo pozytywnej opinii o literaturowej części rozprawy zgłaszam następujące zastrzeżenia, co jest ponurym obowiązkiem recenzenta:

1. Autorka nie zdecydowała, czy omawia problematykę uszkodzeń/naprawy DNA w całym świecie ożywionym, czy w odniesieniu do człowieka. Jeżeli „człowieka” to nie stwierdzono w naszych organizmach bezpośredniej naprawy DNA. Jeżeli cały świat, to zagrożenie bakteriom i drożdżom chorobami nowotworowymi jest dość iluzoryczne.
2. Podział mechanizmów naprawy DNA na 6 szlaków (str.18) jest powtórzony za częścią autorów. Jeżeli jednak wprowadzimy hierarchiczną klasyfikację, gdzie w pierwszym rzędzie pojawi się naprawa przez wycinanie (dalej dzielona jeszcze dwupiętrowo) i naprawa rekombinacyjna dalej dzielona prowadzi to do zredukowania liczby szlaków i tak to podają inni autorzy. A gdzie szlak *Fanconi anemia* pojawiający się na str. 156 rozprawy?
3. Po stronie terminologicznej zauważam wymiennosc stosowania słów określających zmiany w strukturze DNA: błąd, uszkodzenie, modyfikacja, mutacja. Każde z nich ma swój zakres znaczeniowy. Pewnie przypomina się tutaj „pani od polskiego”, która dla uniknięcia monotoności zalecała używanie synonimów/zamienników. W języku nauki nie znajduje to jednak zastosowania, wymaganiem jest jednoznaczność terminologiczna. W tym punkcie zmieszczę też wytknięcie „nieprawidłowej” w miejsce niesprawnej syntezy naprawczej DNA.
4. W omówieniu chemicznych genotoksykantów pojawiają się także takie leki jak cisplatyna (str.13, 20). Należało zaznaczyć, że o ile winniśmy unikać ekspozycji na większość z nich, to te stosowane w chemioterapii są podawane celowo z zadaniem doprowadzenia do śmierci komórek nowotworowych poprzez uprzednie uszkodzanie DNA.

Dla zrównoważenia powyższych uwag zaznaczę, że Autorka bardzo zgrabnie porusza się po śliskim gruncie interakcji słownictwa polskiego i angielskiego niejednokrotnie stawiając tamę nachalnemu wpychaniu się angielszczyzny do naszego słownictwa.

Cel pracy jest jasno i precyzyjnie podany. Niemniej czytając rozprawę po raz pierwszy zastanawiałem się, czy Autorka nie zastawiła na siebie pułapki przedstawiając białko BEND3 jako niemal onnipotentne i biorące udział w tylu procesach metabolicznych zahaczających o

naprawę DNA (remodelowanie chromatyny, rozplatanie podwójnej helisy), że od udziału w naprawie DNA jesteśmy już o krok.

Część rozprawy mieszcząca się pod tytułem MATERIAŁY i METODY jest podana przejrzyście i na ogół dokładnie. Powstały jednak pewne pytania, na które chciałbym uzyskać odpowiedzi podczas rozprawy.

1. Doświadczalnictwo w całości oparte jest o materiał pochodzący w ludzkich linii nowotworowych. Wiadomo jednak, że w chorobie nowotworowej potencjał naprawczy DNA jest obniżony a zastosowane linie wyprowadzono z materiału osób rozwijających choroby nowotworowe. Czy zatem defekty naprawy DNA odpowiedzialne za obniżenie potencjału naprawczego nie mogły zakłócić i wyników doświadczeń, i wyprowadzenia wniosków? Dlaczego prowadząc doświadczenia na sześciu liniach komórek nowotworowych i trzech dalej modyfikowanych nie włączono materiału prawidłowego?
2. Opis wyprowadzenia linii modyfikowanych genetycznie jest niebywale skąpy. Skąd pewność, że są to linie stabilne w kolejnych pasażach?
3. Model generowania uszkodzeń DNA za pomocą naświetlania laserem nie wydaje mi się najszczęśliwszy. Po pierwsze indukuje kilka rodzajów uszkodzeń, co z natury komplikuje interpretację uszkodzeń. Nie trafia do mnie powołanie się (str.159/160) na pracę Kochan i wsp. (2017) twierdzącą, że 85% badań nad analizą udziału białek w naprawie DNA przeprowadzono na takim modelu. Widocznie jednak w studiach literaturowych docieraliśmy do różnych publikacji. Autorka w badaniach i interpretacji skupiła się na podwójnych przerwach nici DNA, ignorując bez wyjaśnień pozostałe uszkodzenia. W opisie techniki brakuje mi informacji o energii dostarczanej przez światło laserowe i tym samym toksyczności wiązki światła.
4. Cały kompleks badań nad oddziaływaniami białko-białko i białko-DNA przeprowadzono technikami jakościowymi nie wchodząc w analizę ilościową. Przeglądając kolejne ilustracje widzę, że nie wszystko można sprowadzić do układu zero-jedynkowego czyli białko jest albo go nie ma. Analiza ilościowa a choćby półilościowa mogła wprowadzić nową jakość wyników i ich interpretacji.
5. W punkcie 5.8.1. podano długą listę wektorów ekspresyjnych. Część przygotowano własnymi rękoma, o pochodzeniu części nie poinformowano a inne pochodziły z darów. Ta ostatnia grupa zwraca pozytywną uwagę. Przekazywanie materiału przez inne laboratoria przyjmuję jako dowód na rzetelną współpracę i docenienie pozycji duetu Promotor/Doktorantka.

Część rozprawy prezentująca wyniki badań została poprowadzona równie logicznie jak przejrzyście i nie wzbudziła żadnych obiekcji z mojej strony. W sposób nie budzący zastrzeżeń wykazano to, co było głównym celem badań a mianowicie udowodnienie udziału

białka BEND3 w naprawie DNA. Funkcję tę skonkretyzowano wskazując na naprawę przerw dwuniciowych DNA za pomocą mechanizmu łączenia końców niehomologicznych (NHEJ). Znaczącym wsparciem dla tego ustalenia jest ustalenie interakcji białka BEND3 z podjednostkami kompleksu NuRD i NoRC. Udowodniono także fakt bezpośredniej interakcji z białkiem HDPY30, wskazując konkretne elementy strukturalne białka BEND3 jako odpowiedzialne za oddziaływania międzycząsteczkowe. Podsumowujące wyliczenie podstawowych wyników liczące 8 punktów (a każdy jest mocny) powinno jednak zawierać jakieś uogólnienie i wniosek generalizujący ustalenia szczegółowe. Do pewnego można to jednak odnaleźć w końcowej sekcji DYSKUSJI.

Na str. 141 odnalazłem zdanie mówiące o „zdolności bleomycyny do indukcji uszkodzeń DNA wykorzystanej w terapii przeciwnowotworowej nowotworów głowy i szyi” Coś tu nie tak. Nowotwory głowy i szyi są odporne na działanie cytostatyków i stąd leczenie jest kombinacją chirurgii i radioterapii. Dopiero zastosowanie terapii celowanej pozwoliło na skuteczne wprowadzenie chemioterapii ale nowej generacji (głównie cetuximab). Muszę też wypomnieć, że obie prace cytowane na rzecz podanej przed chwilą tezy są kompletnie nietrafione.

Dyskusja mocno konfrontuje własny tok badawczy i ustalenia z literaturą. Było do czego odnosić się, bo spis literatury wylicza ponad 450 pozycji. Autorka dostrzega konieczność dalszych badań. I tutaj zgadzamy się, bowiem przypisanie białku BEND3 udziału w procesie naprawy dwuniciowych przerw nici DNA przy udziale mechanizmu NHEJ nie wyklucza moim zadaniem partycypacji innych mechanizmów naprawczych. Wspomniana parokrotnie rola białka BEND3 w remodelowaniu chromatyny i rozplataniu nici DNA może być wykorzystywana także w innych ścieżkach naprawy DNA. Mam oczywiście pełną świadomość ograniczeń czasowych i finansowych pracy nad doktoratem ale temat roli białka BEND3 w innych torach naprawy DNA czeka na podjęcie.

Po stronie oceny formalnej rozprawy zatrzymuję się przy dwóch punktach:

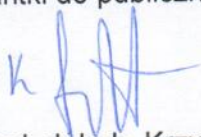
1. Spis literatury należy prowadzić według jednego wzoru. Lista autorów wymyka się z tego wymogu, przez podanie alternatywne albo pełnych imion, albo tylko inicjałów, zmiennej kolejności imię/nazwisko. To samo przenosi się to podawania cytacji w tekście. Rozprawa to wytrzyma ale materiał wysyłany do czasopisma już niekoniecznie.
2. Aż głupio pisać o przecinkach ale autorka okazała się ich zawansowaną entuzjastką.

Nie będę tego tu rozwijać ale przekażę do ręki egzemplarz rozprawy z poprawkami. W swojej recenzji skupiłem się na niedociągnięciach rozprawy, traktując fakt recenzowania jako ostatni etap podejścia dydaktycznego wobec młodej adeptki nauki. Słuchacze i czytelnicy recenzji mogą to opacznie zrozumieć przedstawioną recenzję jako daleką krytykę rozprawy. Nic z tych rzeczy. Na postawione w recenzji pytania i zgłoszone wątpliwości nie

przekreślające wartości rozprawy oczekuję odpowiedzi w trakcie obrony. Powtórzę, że otrzymałem do recenzji obszerne, rzetelne sprawozdanie z przeprowadzonych rozległych badań. Bardzo pozytywnie odebrałem mnogość stosowanych technik badawczych, dobrze zazębiających się, przybliżających do poznania relacji molekularnych dotąd nieznanych. Do większości celów zbliżano się stosując techniki z biologii molekularnej i biologii komórki. Dla pełnego powiązania ustaleń powstałych w trakcji przeprowadzonych badań sięgnięto z powodzeniem po bioinformatykę. Tak powinno prowadzić się nowoczesne badania w przedmiotowym zagadnieniu.

Do odpowiedzi pozostaje jeszcze udzielenie odpowiedzi na pytanie o obecność *novum*. Nie ma wątpliwości. Wykazanie udziału białka BND3 w naprawie dwuniciowych uszkodzeń DNA przy udziale mechanizmu NHEJ łącznie z ustaleniem interakcji międzybiałkowych przynosi pozytywną odpowiedź na postawione pytanie.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Martyny Węglewskiej i zaproszeniu Doktorantki do dyskusji na tematy wskazane wyżej stwierdzam, że rozprawa spełnia ustawowe wymogi w procedurze ubiegania się o stopień doktora nauki biologicznych w dyscyplinie biologia i zgłaszam do Rady Wydziału Biologii UAM wniosek o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.



Prof. med. dr hab. Krzysztof Szyfter