



Warszawa, 27.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Seweryna Muchy pt. „Genotoksyczność antymonu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Praca doktorska Pana mgr. Seweryna Muchy dotyczy oryginalnych badań nad genotoksycznym oddziaływaniem mało znanego metaloidu antymonu, będącego podobnym do arsenu pierwiastkiem śladowym z grupy azotowców, na modelowe komórki drożdży piekarniczych. Antymon był używany przez człowieka od starożytności, w tym (o zgrozo!) w celach kosmetycznych i leczniczych. WHO od niedawna uznaje go jako substancję toksyczną i niebezpieczną dla ludzkiego zdrowia, a trójtlenek antymonu jest zaliczany do związków prawdopodobnie rakotwórczych dla ludzi. Pomimo tego, antymon jest nadal powszechnie używany w przemyśle, w tym jako utwardzacz do produkcji naboju strzelniczych, produkcji niektórych form plastiku, przy produkcji półprzewodników i, wciąż, produkcji niektórych leków. Głównym źródłem emisji antymonu do biosfery, jak referuje Autor, jest przemysł górniczy (w okolicach, gdzie wydobywa się antymon, lokalna ludność cierpi na zapalenie skóry, pylicę płuc oraz marskość wątroby z powodu nadmiernej ekspozycji na ten pierwiastek), ale niewykluczone jest skażenie wody i gleby antymonem wynikające z gromadzenia się zanieczyszczenia plastikiem oraz wielorakich zanieczyszczeń przemysłowych. Można sobie wyobrazić, że poznanie mechanizmów, poprzez które antymon zaburza procesy w komórkach, doprowadzi do uświadomienia ośrodkom decyzyjnym o konieczności opracowania metod przeciwdziałania nadmiernej ekspozycji ludności na antymon. Stąd też wynika znaczenie recenzowanej pracy doktorskiej - wyniki Autora i współpracowników wypełniają lukę w podstawowej wiedzy na temat toksycznego działania antymonu na komórki.

Badania zostały wykonane pod kierunkiem promotorki dr Ewy Maciaszyk-Dziubińskiej i promotora pomocniczego, dr. Ireneusza Litwina, i stanowią ciekawą kontynuację wieloletnich badań obu promotorów na Uniwersytecie Wrocławskim nad, z jednej strony, transportem do komórek drożdży arsenu oraz antymonu, zbliżonych pierwiastków o silnym działaniu toksycznym na organizmy żywe, oraz, z drugiej strony, nad różnorodnymi systemami utrzymania integralności genomu jądrowego w komórkach drożdży. Dodatkowo, promotor pomocniczy, dr Ireneusz Litwin, był pierwszym autorem pracy w PLOS Genetics w 2013 (z udziałem jeszcze: Tomasza Bocera, Doroty Dziadkowiec i Roberta Wysockiego), w której zbadano genotoksyczność arsenu w serii analogicznych eksperymentów, jak te zaprezentowane w recenzowanej pracy.



Precedens wymienionej pracy promotora z 2013 nie umniejsza zasług Autora rozprawy, ponieważ wykonano również nowe eksperymenty, a wyniki Autora i jego współpracowników znalazły uznanie i zostały opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (6.208 [2021]). Moim zdaniem wnioski pracy z 2021, mimo niewątpliwych podobieństw między wykrytymi efektami genotoksycznego działania antymonu i arsenu na komórki drożdży, o czym wspomnę jeszcze poniżej, doprowadziły autorów do bardziej zniuansowanego spojrzenia, niż ten zaprezentowany w 2013, na złożoną sytuację w komórkach traktowanych jonami tych półmetali.

Głównym celem tej pracy było zbadanie rodzaju uszkodzeń w DNA jądrowym drożdży po traktowaniu antymonem, mechanizmu ich powstawania oraz udziału punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na obecność antymonu. Rozprawa ma formę liczącego 138 stron manuskryptu o konstrukcji typowej dla tego typu prac. Zawiera 1-stronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz spis treści. Obszerne (33 stron) wprowadzenie podsumowuje najpierw dotychczasowy stan wiedzy o działaniu toksycznym antymonu względem komórek, a potem przyczyny powstawania uszkodzeń DNA, rolę punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA oraz naprawę DNA. Część drożdżowa wstępu jest napisana bardzo klarownie, w standardzie dobrego artykułu przeglądowego, z szeregiem objaśniających rycin, ale rozczarowujący jest opis toksycznego działania antymonu w pasożytniczych protistach *Trypanosoma* i *Leishmania* - nie ma nawet wytłumaczenia, co to jest trypanotion i dlaczego zaburzenie metabolizmu tego analogu glutationu poprzez związki antymonu ma tak specyficzne znaczenie terapeutyczne w przypadku zwalczania chorób wywołanych przez te pasożyty. Sama informacja na temat działania antymonu w komórkach tych protistów wydaje się być tylko ciekawostką, ale skoro została przytoczona, szkoda, że nie została opisana bardziej zrozumiale w pracy, również dla tych czytelników, którzy nigdy nie słyszeli o trypanotionie. Wyjaśniam o co, mi chodzi: istotne jest, że te protisty dysponują specyficznym systemem trypanotionu zamiast glutationu, jako niezbędną tarczą detoksyfikacyjną przeciwko ROS produkowanym przez makrofagi podczas inwazji organizmu gospodarza, a enzym aktywujący trypanotion, reduktaza trypanotionowa inhibowana przez związki antymonu, w komórkach człowieka jest nieobecny i może być hamowany przez antymon bez szkody dla gospodarza. Pomijając ten drobny mankament Wstępu, wydaje się mi się, że wymieniona w tekście Wstępu właściwość antymonu polegająca na tym, że zarówno w komórkach drożdży, jak w komórkach ww. protistów, antymon tworzy kompleksy ze związkami z zawierającymi grupy tiolowe, jest prawdopodobnie również przyczyną toksycznych efektów antymonu w komórkach drożdży. Taka hipoteza została zresztą również przedstawiona w tekście Dyskusji.

W rozdziale Wyniki Autor w przejrzysty i usystematyzowany sposób przedstawił główne wyniki pracy:

1) w komórkach drożdży Sb(III) wywołuje w fazach S i G2/M aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego, ale oprócz tego wywiera jeszcze inne efekty cytotoksyczne i/lub proteoksyczne prowadzące



do spowolnienia cyklu komórkowego w trakcie całego przebiegu cyklu; dodatkowo, Rad9 wydaje się jedynym mediatorem tej aktywacji;

2) powyższy wynik zgodny jest z obserwacją, że Sb(III) wywołuje powstawanie jednoniciowych przerw w DNA, co pokazano w eksperymentach z Rad52 połączoną z nukleazą MN, jak również poprzez analizę skupisk znakowanego fluoroscencyjnie Rad52 indukowanych w komórkach traktowanych Sb(III). Skupiska Rad52 świadczą o procesach naprawy DNA związanych z resekcją końców DSB albo naprawy przerw jednoniciowego DNA generowanego podczas replikacji DNA zawierającego uszkodzenia blokujące replikację; można w związku z tym wnioskować, że Sb(III) powoduje powstawanie uszkodzeń blokujących replikację DNA;

3) podobnie, jak wcześniej pokazano dla As(III), zgodnie z wcześniejszą pracą, której współautorem był promotor pomocniczy, dr Ireneusz Litwin, Sb(III) nie prowadzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu w fazie G1, co jest spowodowane ochronną rolą kompleksu Yku70-Yku80, wiążącego końce dwuniciowych pęknięć DNA, co przeciwdziała ich resekcji; przy braku Yku70, Sb(III) aktywuje ścieżkę punktu kontrolnego cyklu komórkowego również w fazie G1, co oznacza, że uszkodzenia DNA w postaci podwójnych pęknięć powstają w wyniku działania Sb(III) niezależnie od replikacji (bo powstają również w czasie fazy G1, kiedy nie ma replikacji genomu jądrowego); ten wniosek jest zgodny z wynikami przedstawiającymi proporcjonalne do stężenia Sb(III) zwiększenie liczby skupisk białka Rfa1 w komórkach szczepu *ycf1Δ* pozbawionego białka Yku70, wskazujących na gromadzenie się jednoniciowego DNA.

Autor wnioskuje, że Sb(III) powoduje powstawanie uszkodzeń zależnych od replikacji, jak i uszkodzeń niezależnych od niej, w postaci podwójnych pęknięć nici DNA, które w komórkach typu dzikiego są chronione w fazie G1 przez kompleks białek Ku.

Ponadto:

4) w komórkach drożdży Sb(III) nie zwiększa w sposób znaczący poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz powoduje jedynie niski poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA, co jest zgodne z wynikiem współautorów tej samej publikacji z 2021, pokazującym, że użycie antyoksydanta nie zmniejszyło liczby skupisk naprawczych z Rad52 indukowanych przez Sb(III), pomimo silnego powinowactwa Sb(III) do glutationu i tym samym możliwości zaburzania równowagi redoks w komórce;

5) uszkodzenia DNA powodowane przez Sb(III) są naprawiane na drodze rekombinacji homologicznej, postreplikacyjnej naprawy DNA i naprawy na drodze wycinania zasad;

6) szczególnie wysoka wrażliwość na Sb(III) komórek szczepów *cdc13-1*, *yku70Δ* i *tel1Δ* wskazuje pośrednio, że Sb(III) zaburza ochronę telomerowego DNA, ale jednocześnie nie powoduje zmiany długości telomerów;

7) pomimo dowodów na obecność dwuniciowych pęknięć w DNA na skutek działania Sb(III) nie ma śladów fragmentacji DNA na żelach PFGE, nawet przy bardzo wysokich stężeniach Sb(III), co odróżnia działanie Sb(III) od działania As(III);

8) dodatkowo, wg Autorów publikacji, Sb(III) zaburza strukturę mikrotubul i filamentów aktynowych.



W Dyskusji Autor cytuje inne wyniki z publikacji z 2021, które zostały wykonane przez współpracowników. Dr Ewa Maciaszczyk-Dziubińska wykryła, że przynajmniej część uszkodzeń w postaci jednoniciowego DNA powstających w wyniku działania Sb(III) jest zależna od aktywności topoisomerazy I (produktu genu *TOP1*), enzymu wspomagającego procesy replikacji i transkrypcji poprzez redukowanie napięcia torsyjnego DNA. Autor rozprawy proponuje w Dyskusji, że Sb(III), wiążąc się z krytycznymi grupami tiolowymi białka Top1, hamuje jego aktywność, co prowadzi do powstawania kompleksów topoisomerazy I z DNA. Takie kompleksy z kolei mogą blokować replikację DNA i przyczyniać się do aktywacji ścieżki punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Co ciekawe, dodatkowe wyniki w tej samej publikacji pokazują, że wysoka wrażliwość na Sb(III) komórek szczepu *tel1Δ* jest również przynajmniej częściowo znoszona przez delecję genu *TOP1*. Byłoby ciekawe sprawdzić, czy Sb(III) w takim samym stopniu aktywuje ścieżki punktów kontrolnych cyklu komórkowego w różnych fazach cyklu w szczepie pozbawionym białka Top1. Jeśli przypuszczenia Autora rozprawy są przynajmniej częściowo słuszne, być może Top1 jest jednym z głównych białek, których aktywność jest hamowana w jądrze przez Sb(III). Inne wyniki z tej bardzo wartościowej publikacji, której współautorem jest Autor rozprawy, wskazują jednak, że Sb(III) hamuje również ścieżkę NHEJ w komórkach drożdży oraz spowalnia naprawę DNA po traktowaniu fleomycyną, co sugerowałoby, że działanie Sb(III) może dotyczyć innych białek niż Top1.

Chciałabym jeszcze dodać komentarz oraz pytania szczegółowe, co do wyników dwóch eksperymentów przedstawionych w rozprawie i publikacji, o której była mowa powyżej. Zainteresowała mnie z powodu zainteresowań zawodowych Rycina 2 z artykułu (strona 5.). Ten wynik nie został zaprezentowany w rozprawie, ale był komentowany w dyskusji. Panel b przedstawia hamujący efekt Sb(III) na aktywność oddechową mitochondrium na podstawie oznaczenia aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy, a na panelu c pokazano, że Sb(III) podnosi poziom zdarzeń prowadzących do utraty mtDNA w komórkach drożdży. W tekście dodano, że barwienie komórek i analiza genetyczna pokazały, że aż 90% komórek defektywnych oddechowo jest całkowicie pozbawionych DNA. Te dwa wyniki wskazują na to, że po pierwsze Sb(III) hamuje silnie aktywność oddechową mitochondrium, a zwiększony poziom mutantów defektywnych oddechowo nie wyjaśnia w całości utraty aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej, co oznacza, że działa hamująco na jakiś system mitochondrialny zaangażowany w aktywność oddechową. Po drugie, Sb(III) wywołuje powstawanie mutantów petite – nieoddychających komórek, co u drożdży piekarniczych nie jest niczym niezwykłym, ale niecodzienny jest tak wysoki poziom mutantów nieoddychających pozbawionych w ogóle mtDNA (najczęstsze petity to komórki z przearanżowanym, niefunkcjonalnym mtDNA, a całkowita utrata mtDNA jest rzadka). To, jeśli jest rzeczywiście prawdą i da się potwierdzić, oznaczałoby, że dodatkowym działaniem Sb(III) na komórki drożdży jest zaburzanie procesów przenoszenia mtDNA wraz z siecią mitochondrialną do komórek potomnych. Procesy te nie są szczególnie dobrze poznane, ale wiadomo, że cytoszkielet aktynowy i miozynowy bierze w tych procesach udział. Na koniec jeszcze jedna uwaga. Jest jeszcze jedna zastanawiająca rzecz w opisywanych fenotypach mitochondrialnych komórek poddanych działaniu Sb(III). Wiadomo, że jednym z elementów aktywacji



ścieżek sygnałowych punktów kontrolnych cyklu komórkowego u drożdży jest aktywacja oddychania, z jednej strony, oraz zwiększenie kopii mtDNA z powodu podwyższenia poziomu dNTPów w komórkach, z drugiej strony, co z reguły przekłada się na stabilizację mtDNA typu dzikiego, a nie na utratę mtDNA, jak sugerują przytoczone wyniki. Wniosek: jest coś bardzo interesującego i nietypowego z punktu widzenia odpowiedzi mitochondrium na działanie Sb(III).

Druga sprawa dotyczy eksperymentu pokazanego na Rycinie 4.29. Czy wniosek, że antymon zaburza strukturę cytoszkieletu nie jest przedwczesny w oparciu o przedstawione wyniki? W komórkach poddanych działaniu Sb(III) dochodzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego oraz spowolnienia cyklu komórkowego, a cytoszkielet jest regulowany podczas cyklu. Czy jest zatem właściwe odnoszenie struktury cytoszkieletu w komórkach z aktywacją do komórek bez aktywacji? Nie wydaje mi się to badanie przekonujące. Na koniec pytanie o stwierdzenia pod koniec strony 112 (Dyskusja). Co autor rozumie przez: „aktywacja przez Sb(III) punktu kontrolnego G2/M wynika z zaburzenia fizycznej interakcji mikrotubul wrzeciona podziałowego z chromatydami siostrzanymi”? Na razie rozumiem, że jest to spekulacja. Czy można jakoś to przewidywanie sprawdzić? Czy mogę prosić również Autora o omówienie jego opinii na temat roli cytoszkieletu w utrzymaniu stabilności genomu? Czy są znane przykłady regulacji przez kinazy ścieżek punktów kontrolnych wobec białek cytoszkieletu?

Praca jest napisana zasadniczo dobrze, ale z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że w tekście roi się od błędów interpunkcyjnych. Szacuję, że z grubsza brakuje około 25% - 30% przecinków. Zauważę również niezręczne anglicyzmy, bo z niezamierzonymi śmiesznościami trzeba walczyć: na str. 120 jest mowa o „protekcijnej roli kompleksu Yku70-Yku80”, a na stronie 117 Autor używa dopowiedzenia (zresztą konsekwentnie nie stosując przy tym oddzielających przecinków): „w kontraście dla wyników uzyskanych dla As(III)”, zamiast o wiele bardziej eleganckiego w polskim tekście: „w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla As(III)”.

Podsumowując, pomimo paru uwag krytycznych, merytoryczny aspekt pracy Autora i jego rozprawę doktorską pracą oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest oryginalnym osiągnięciem uzyskanym po dokładnym zbadaniu postawionego problemu naukowego. Praca spełnia zatem wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 13 lipca 2018 i może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Wrocławskim o dopuszczenie mgr. Seweryna Muchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aneta Kamińska - Golik