

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Seweryna Stanisława Muchy
pod tytułem**

„Genotoksyczność antymonu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Seweryna Stanisława Muchy została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Maciaszczyk – Dziubińskiej prof. UW r oraz pod opieką promotora pomocniczego Pana dr Ireneusza Litwina w Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy oceny typu uszkodzeń DNA wywołanych metaloidem – antymonem oraz mechanizmów molekularnych leżących u podłoża ich powstania. W szczególności Doktorant wykorzystując modelowy organizm *Saccharomyces cerevisiae* skoncentrował swoje badania na określeniu roli punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na stres antymonowy, zbadaniu udziału reaktywnych form tlenu w genotoksyczności antymonu, określeniu znaczenia ścieżek naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w odpowiedzi na stres antymonowy, sprawdzeniu czy antymon może modulować integralność telomerowego DNA, a także zbadaniu wpływu antymonu na organizację cytoszkieletu aktynowego i tubulinowego. Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozprawa doktorska Pana mgr Seweryna Stanisława Muchy została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych, obejmuje 138 str. i zawiera następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wykaz rycin i tabel, spis treści, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, spis literatury.

We wstępie, Doktorant w zwięzły sposób przedstawił wszystkie zagadnienia poruszane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę Doktorant dokonał opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego: występowania, właściwości, zastosowania antymonu w medycynie, przyczynach powstawania uszkodzeń DNA, roli punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA,

mechanizmach naprawy uszkodzeń DNA, strukturze DNA telomerowego u *S. cerevisiae*. Wstęp został wzbogacony w liczne ryciny przedstawiające m.in., schematy ścieżek naprawy DNA, czy struktury DNA telomerowego u *S. cerevisiae*. Do tego rozdziału mam tylko drobną uwagę. W związku z opisanym przez Doktoranta zastosowaniem antymonu w medycynie wskazane byłoby poszerzenie wstępu o pełniejsze informacje uzasadniające wybór modelu badawczego. Przykładowo pomocnym byłaby rycina lub tabela porównująca mechanizm wnikania i detoksykacji u różnych grup systematycznych lub przynajmniej porównania tych mechanizmów w komórkach człowieka i drożdży *S. cerevisiae*, ze wskazaniem elementów wspólnych oraz ewentualnych różnic.

Cel pracy został zdefiniowany bardzo zwięźle i jednoznacznie, natomiast w rozdziale tym nie określono hipotezy badawczej.

W rozdziale materiały i metody opisano użyte szczepy bakterii, drożdży, plazmidy wraz z ich dokładną charakterystyką oraz źródłem pochodzenia. W rozdziale tym opisano także wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do realizacji celu badawczego. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz ilość użytych metod, zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktoranta. W pracy wykorzystano techniki inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, metody immunodetekcji oraz techniki obrazowania komórek. Drobnym mankamentem tego rozdziału jest natomiast brak informacji w wykazie o plazmidzie pCT300 użytym do otrzymywania sondy wykorzystywanej przez Doktoranta do określenia długości telomerów, jak również warunków hybrydyzacji (czas, temperatura). W tabeli 4 nie podano temperatur przyłączenia poszczególnych starterów do matrycy.

Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowany w pracy doktorskiej cel. Wyniki zostały przedstawione na bardzo starannie opracowanych 29 rycinach.

Należy podkreślić, że część eksperymentalna została opisana z najwyższą starannością. Do swoich eksperymentów Doktorant wykorzystał ponad 40 szczepów drożdży *S. cerevisiae*.

Do najważniejszych obserwacji zaprezentowanych w tej części pracy należy uznać stwierdzenie, iż antymon indukuje fosforylację histonu H2A w fazach S i G2/M cyklu komórkowego oraz indukuje fosforylację histonu H2A w fazie S cyklu komórkowego w sposób zależny od kinaz sensorowych Mec1 i Tel1, natomiast wywoływana Sb(III) fosforylacja

histonu H2A w fazie G2/M jest Mec1 zależna. Doktorant wykazał także, że antymon indukuje Rad9-Rad53 zależną ścieżkę odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz moduluje czas trwania cyklu komórkowego. Co ciekawe, antymon aktywuje punkt kontrolny cyklu komórkowego na granicy faz G2/M, natomiast nie aktywuje punktu kontrolnego cyklu komórkowego na granicy faz G1/S, a mutanty *tell1Δ ycf1Δ*, *rad9Δ ycf1Δ* oraz *mec1Δ ycf1Δ* wykazują zwiększoną wrażliwość na antymon oraz zwiększoną śmiertelność po ekspozycji na wysokie stężenia antymonu. Doktorant zaobserwował również, że antymon indukuje powstawanie niewielkiej ilości reaktywnych form tlenu oraz oksydacyjnych uszkodzeń DNA. W dysertacji zaprezentowano również interesujące wyniki wskazujące, że post-replikacyjna naprawa DNA odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na stres antymonowy oraz dane wskazujące, że antymon powoduje powstawanie jednoniciowych przerw w DNA. Doktorant zaobserwował, iż brak białka Yku70 prowadzi do aktywacji punktów kontrolnych fazy G1 podczas ekspozycji na antymon, a aktywacja punktu kontrolnego fazy G1, w komórkach pozbawionych *YKU70*, jest zależna od kinaz sensorowych Tel1 i Mec1. Doktorant opisał także, że brak białka Yku70 w fazie G1 pozwala na resekcję końców dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez antymon. Podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej wykazano także, że indukowane antymonem w fazach S i G2/M uszkodzenia DNA są aktywnie naprawiane na drodze homologicznej rekombinacji, natomiast antymon nie wywołuje fragmentacji chromosomów w fazach G1, G2/M, ani w komórkach drożdży znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu. Bardzo ciekawe wyniki dotyczyły stwierdzenia, że antymon nie wywołuje zmiany długości telomerów oraz faktu wskazującego, że antymon zaburza strukturę cytoszkieletu aktynowego i tubulinowego.

Zakres i jakość zaprezentowanych wyników w ocenianej dysertacji wskazuje, że Doktorant przedstawił oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełnił ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim.

Dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący, wskazując na dużą znajomość Doktoranta w zakresie problematyki dotyczącej mechanizmów naprawy oraz biologii komórki drożdżowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwa krytyczna analiza otrzymanych wyników dotyczących opisanych mechanizmów działania genotoksycznego antymonu oraz potencjalnych ich implikacji na funkcjonowanie komórek eukariotycznych. Podsumowanie zawiera konstruktywne stwierdzenia, a wnioski końcowe są wyważone.

Po analizie wyników zaprezentowanych w dysertacji recenzentowi nasunęło się jednak kilka spostrzeżeń oraz pytań.

Podczas badań wykorzystano stosunkowo wysokie stężenia milimolowe antymonu (0,2, a nawet 100 mM) czy badane stężenia mają uzasadnienie w odniesieniu do zastosowań w medycynie, farmacji lub narażenia organizmów żywych na tak wysokie dawki antymonu? Doktorant wspomina o badaniach z użyciem ludzkich linii komórkowych (str. 68). Jaki zakres stężeń antymonu jest wykorzystywany w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych (*in vivo* i *in vitro*)?

Kolejną ważną kwestią wymagającą lepszego wyjaśnienia jest możliwy wpływ ogólnej cytotoksyczności antymonu na przedstawione wyniki. Czym był podyktowany dobór czasu inkubacji z antymonem np. 2 h?

Czy ten czas inkubacji komórek z antymonem był stosowany w odniesieniu do wszystkich eksperymentów, w tym podczas oznaczania zmian w długości telomerów? Jeżeli zgodnie z deklaracją Doktoranta (str. 104) „*hodowle mutantów prowadzono przez 6 dni poddając je lub nie, ekspozycji na Sb(III) bądź As (III)*” to czy brak zmian w długości telomerów badanych szczepów można wytłumaczyć faktem, że komórki z uszkodzonym DNA, w tym w telomerach, zostały wyeliminowane podczas hodowli? Wyniki przedstawione na m.in., rycinach 4, 8 oraz 4.21 wskazują, że niższe stężenia niż to użyte w badaniach zmian w długości telomerów mogą obniżać wzrost komórek *ycf1Δ* w porównaniu do komórek nietraktowanych arsenem lub antymonem. Na wspomnianych rycinach można bowiem zaobserwować obniżenie wzrostu kolonii szczepu *ycf1Δ* już po 2 dniach hodowli, co sugeruje, zachodzenie selekcji komórek traktowanych antymonem.

Czy brak efektów na poziom 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny w DNA mógł być wywołany ewentualnie zbyt krótkim czasem inkubacji komórek z antymonem?

Analizując wyniki zaobserwowano, że w wielu eksperymentach stosowano różne stężenia i czas inkubacji komórek z antymonem, dlatego wskazane byłoby lepsze wyjaśnienie czym były podyktowane te zmiany w protokołach eksperymentalnych? Dla przykładu, na rycinie 4.2 przedstawiono wyniki otrzymane po inkubacji komórek z Sb(III) w stężeniu 0,2 mM przez 1 godzinę a na rycinie 4.13, 4.16 po 2 godzinach.

Ponieważ Doktorant stwierdził, że antymon zaburza strukturę cytoszkieletu m.in., aktynowego prosiłbym o komentarz czy antymon może również wpływać na transport aktyny do jądra oraz jakie to może mieć znaczenie dla badanych mechanizmów naprawy DNA?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym podkreślić, iż mimo licznych pytań, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pana mgr Seweryna Stanisława Muchy oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art. 13.1 z późn. zm.). Doktorant udowodnił, że samodzielnie potrafi rozwiązać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Seweryna Stanisława Muchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników mgr Seweryna Stanisława Muchy wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 18/11/2022

dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

