

Poznań, 24.05.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Tokarz
prowadzonej przed Radą Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Promotor: prof. dr hab. Janusz Błasiak

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Tokarz została przygotowana w Zakładzie Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. Janusza Błasiaka. Oznacza to, że praca pochodzi z ośrodka o zainteresowaniach badawczych w dużym stopniu pokrywających się z moimi i stosującego przynajmniej w części techniki laboratoryjne używane na terenie mojego Zakładu. Tym samym mogłem czuć się kompetentny do oceny rozprawy przedstawionej do recenzji.

Wstępnie próbowałem zorientować się w dorobku publikacyjnym doktorantki. Baza PubMed wylicza 11 pozycji pod nazwiskiem Tokarz z inicjałem P, z czego 10 najpewniej można przypisać doktorantce. Cała lista to przyzwoite publikacje w uznanych czasopismach. Z tej liczby 4-5 pozycji w różnym stopniu zahacza o problematykę uszkodzeń i naprawy DNA. Jednak nawet w obrębie jednego zagadnienia rozrzut dotyczy i różnych aspektów problematyki, i materiału doświadczalnego. Tym samym najpewniej nie udało się stworzyć zwartej „zszywki” i trzeba było przystąpić do przygotowania tradycyjnej rozprawy doktorskiej, z którą miałem do czynienia.

Rozprawa nie jest porażająco wielka ale takie wrażenie uzyskuje się z zastosowania obustronnego zapisu, co w oczywisty sposób odbija się na objętości produktu finalnego. Rozprawę przygotowano w języku angielskim zgodnie z duchem czasu ale niekoniecznie w myśl „dobrej zmiany”. Jedynym przejściem w stronę języka polskiego jest dwujęzyczność streszczenia. Układ rozprawy jest typowy i ogólnie przyjęty dla prac promocyjnych a to stanowiło ułatwienie w pracy recenzenta.

Tytuł rozprawy brzmi: „Odpowiedź na uszkodzenia DNA indukowane stresem oksydacyjnym w komórkach w fazie spoczynku oraz po reinicjacji cyklu komórkowego”. Tytułowa problematyka rozwijana była coraz bardziej dwutorowo. Po stronie uszkodzeń możemy przywoływać rozwój mutagenyzy środowiskowej, powiązanej z kancerogenezą ale obejmującej także szereg nienowotworowych chorób somatycznych. Użytkowo poszło to w

stronę epidemiologii molekularnej. Tutaj należy od razu wspomnieć postać prof. Fritsa Sobelsa (Leiden, Holandia) jednego z ojców-założycieli badań nad uszkodzeniami materiału genetycznego. Dalej uwaga przenosi się na wyjaśnianie wad ale odchodzimy głównego tematu. Ponieważ usuwanie uszkodzeń i przywracanie wyjściowej struktury DNA jest procesem/maszyną, w który jesteśmy wyposażeni rozpoznanie procesów naprawy DNA zaczęło się za sprawą Jamesa Cleavera, Erola Friedberga, Briana Bridgesa i innych. Ustaleń przybywało ale od lat zastanawiano się dlaczego szafarze Nagrody Nobla pomijali ten kierunek badawczy w do roku ubiegłego. Po odrzuceniu teorii spiskowych pozostaje jedno wytłumaczenie: ciągle zrobiono za mało, postęp był niewystarczający. W ten dosyć zawiły sposób doszedłem do akceptacji tematyki badawczej rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Tokarz. Luki badawcze pozostawały głównie przy próbach powiązania sprawności procesu naprawy DNA z cyklem komórkowym. Zatem wybór tematu badań prowadzących do uzyskania stopnia naukowego doktora uważam za słuszny i trafny.

Literaturowe wprowadzenie do pracy zostało przygotowane bardzo kompetentnie i we właściwym rozmiarze. Nie dopatrzyłem się żadnych istotnych błędów zarówno w sferze tekstowej, jak i ilustracyjnej. Ta ostatnia najczęściej oznacza pożyczki ale ze wskazaniem pochodzenia i autorstwa. Podążając za myślą autorki rozprawy byłem wielokrotnie zaskakiwany odnośnikami. Zwłaszcza w odniesieniu do naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA przez wycinanie zasady (mechanizm BER) oczekiwałem nazwisk Berndta Kainy (Moguncja), Grigorija Dianowa (Londyn), Eugenii Gogliotii (Rzym). Widocznie liczba ustaleń wzrosła tak znacząco, że badacze, którzy dla mnie mają status guru znikają w tłumie odkrywców. Próbowałem także znaleźć odniesienie do ubiegłorocznych noblistów. Dwa z trzech nazwisk (Modrich i Sancar, brak Lindahla - moim zdaniem najbardziej zasłużonego) pojawiają się jakby mimochodem. Niewykluczone, że odbija się tu pogląd Promotora na tę nagrodę. Wysłuchałem niedawno wykładu prof. Błasiaka, który z przejęciem dowodził, że Nobel 2016 poszedł w niewłaściwe ręce. Gwoli uniknięcia nieporozumień powiem, że jestem tego samego zdania.

Ponieważ recenzent musi jednak pokazać swoją wnikliwość zatrzymam się na uwadze autorki stwierdzającej najpoważniejszy charakter uszkodzeń oksydacyjnych spośród innych alteracji (str. 2). A trudno usuwalne dwupirymidynowe fotoprodukty? A uszkodzenia krzyżowe głęboko zmieniające stereostrukturę DNA? Dopiero ostatnio zajęto się nowym mechanizmem naprawy tych uszkodzeń ukrytym pod symbolem pochodzącym od anemii Falconiego (AF) a wyspecjalizowanym w usuwaniu właśnie wiązań krzyżowych.

Wprowadzenie do rozprawy można było uzupełnić ogólniejszymi myślami, być może nawiązując właśnie do nagrody Nobla, niekoniecznie osobowo, ale odnotowując docenienie procesu naprawczego, dzięki któremu nie poddajemy się łatwo patogenom.

Druga uwaga dotyczy całości wprowadzenia. Autorka tak bardzo chciała przedstawić całościowy stan wiedzy, osiągnięcia, że zastawiła na siebie pułapkę. Wprowadzenie naturalnie winno wskazywać luki, sprzeczności i niepewności naturalnie przechodzące w konieczność prowadzenia badań. No i wyszło tak ładnie, tak całościowo, że czego by tu jeszcze chcieć. Z pewnością nie badań.

W ten sposób przechodzimy do celu badań, którym według autorki jest porównanie odpowiedzi na oksydacyjne uszkodzenia DNA (DDR) w komórkach spoczynkowych, proliferujących i tych, które podjęły cykl na nowo. Celem ma być ocena sześciu różnych procesów komórkowych. Pozornie można się zgodzić z tak pojętym celem, zwłaszcza, że sukces gwarantowany. Trzy sytuacje życiowe komórek, 6 procesów metabolicznych, coś musi wyjść, miejsca na porównania aż nadto. Jednak nawet przy najgłębszym wczytywaniu się w rozprawę żadnej wyjściowej hipotezy roboczej doczytać się mi nie udało.

Przechodząc do części rozprawy prezentującej materiały badawcze i metodykę badań stwierdzam pełną poprawność. Ukochana przez zespół prof. Błasiaka technika comet-assay tym razem wręcz tonie pośród szerokiego wachlarza metod, chociaż pełni istotną rolę w przeprowadzonych badaniach. Ocena ilościowa naprawy DNA (str. 32) opisana została niezmiernie skrótowo i enigmatycznie. Czy właściwie rozumiem ją jako odwrócony wariant SCGE nakierowany nie na pomiar uszkodzeń lecz ich usuwanie?

Dla prezentacji wyników kluczowe było operowanie komórkami różnicowanymi w odniesieniu do cyklu komórkowego i to osiągnięto. Powstaje jednak pytanie, czy oparcie doświadczeń o dwie linie komórek wyprowadzonych z nowotworów było właściwe i czy wyniki mogą stanowić podstawę generalizacji. Co do sensu użycia linii komórkowych nie mam wątpliwości. Dlaczego jednak nowotworowe? Dostępnych jest wiele linii z materiału nietransformowanego nowotworowo. A jak doświadczenia potoczyłyby się, gdyby obiektem były po prostu leukocyty krwi obwodowej albo prawidłowe fibroblasty?

Wyniki badań mieszczą się raptem na dziesięciu stronach (dokładnie dziewięciu i pół). Z niejasnego dla mnie powodu wyodrębniono i potraktowano jako „supporting material” ilustracje dokumentujące doświadczenia, w których zmienną jest cykl komórkowy, żywotność i apoptoza. Bardzo przekonujące i spektakularne ilustracje wiodą cokolwiek odrębny żywot, mimo iż stanowią kluczowy element rozprawy.

Na pierwszej stronie działu DYSKUSJA znajduje się zestawienie w trzech punktach głównych ustaleń dokonanych w trakcie badań. Porównanie komórek stacjonarnych i proliferujących pod względem wrażliwości na badane czynniki genotoksyczne oraz indukowaną przez uszkodzenia naprawą DNA wskazuje na różnice nie mające jednak dramatycznego charakteru.

Jednocześnie powstaje pytanie, gdzie znajdujemy oczekiwane *novum*. Wydaje się, że odpowiedź pozytywna na ostatnie pytanie kryje się w kwantyfikacji różnic. Rozbudowana

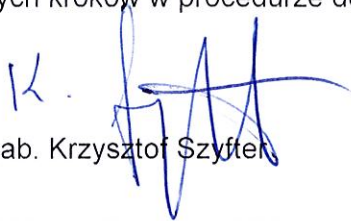
sumienność Doktorantki jeszcze bardziej zaciemnia sprawę nowości dokonanych odkryć przez rozbudowane nagromadzenie, wręcz naszpikowanie dyskusji zwrotami w rodzaju: „our observation is in line”, „similarly to our observation”, „it was also shown”, „we cofirmed”... Dosyć!!!

Szczęśliwie, ostatnie długie, twierdzące zdanie dyskusji jest mocne i z wiarą wyraża sens przeprowadzonych badań.

Pozostaje formalny aspekt rozprawy. Parokrotne pełnienie funkcji recenzenta na rzecz tutejszej Rady Wydziału przyzwyczało mnie do wysokiej dbałości o formę prac przygotowywanych tutaj. Poszukiwanie błędów gramatycznych, interpunkcyjnych i literowych jest zajęciem pozbawionym sensu. Bardzo ładnie a zwrot ten obejmuje również wrażenia estetyczne.

Jako jedyne zastrzeżenie formalne zgłaszam niekonsekwentne stosowanie skrótów nazw genów i białek. Zakładam, że w większości przypadków mowa była o genach i białkach ludzkich, którym przypisuje się duże proste litery (białka) i kursywę (geny). Tego w rozprawie nie dostrzegam. Dla genu/białka *TP53/TP53* uparcie podaje się stary skrót p53. Niemniej są to sprawy poboczne chociaż zauważalne.

W posumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Pauliny Tokarz przynosi określony postęp wiedzy na temat odpowiedzi na oksydacyjne uszkodzenia DNA w powiązaniu ze stanami funkcjonalnymi komórki. Wyniki uzyskano w oparciu o szerokie i solidne instrumentarium. Zatem – mimo pewnych wahań wyartykułowanych wcześniej - otrzymujemy NOVUM oczekiwane w promocjach doktorskich. Wytknięcie błędów jest niezaprzeczalnym obowiązkiem recenzenta. Uprzejmie proszę też o wzięcie pod uwagę faktu, że krytyczne podejście do rozprawy doktorskiej jest ostatnim zabiegiem dydaktycznym wobec doktoranta, który winien procentować w przyszłych bojach z recenzentami publikacji, projektów badawczych etc. Szczęśliwie zauważone potknięcia pozostawały poza głównym nurtem badań a z pewnością nie wypaczyły realizacji i opisu badań. Stwierdzam zatem z przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Pauliny Tokarz spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ o podjęcie dalszych kroków w procedurze doktoryzowania kandydatki.



prof. med. dr hab. Krzysztof Szyfter