



Warszawa, 07.10.2024 r.

Dr hab. Elżbieta Speina
Pracownia Biologii RNA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Stępień

„Zaburzenia inicjacji replikacji genomowego DNA jako czynnik regulujący długość życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu chronologicznego i replikacyjnego starzenia”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Instytucie Biologii Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Promotorem rozprawy jest dr hab. Mateusz Mołoń, prof. UR.

Rozprawa ma charakter hybrydowy, składają się na nią trzy prace eksperymentalne o zasięgu międzynarodowym opublikowane w latach 2022 i 2024 oraz klasyczny manuskrypt powtórnie prezentujący wyniki zawarte w tych publikacjach. We wszystkich pracach Pani mgr Karolina Stępień jest pierwszą autorką. Pozostali współautorzy złożyli stosowne oświadczenia, z których wynika, że zdecydowana większość wyników została uzyskana przez pierwszą autorkę. Publikacja „Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast” ukazała się w czasopiśmie *Cells* o współczynniku oddziaływania (IF) 6.0; praca „Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast” została zaakceptowana do druku w *Biochimica Biophysica Acta Molecular Cell Research* (IF 4.6); a publikacja “Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast” w *Biogerontology* (IF 4.4).

A) Znaczenie i oryginalność tematu naukowego

Starzenie jest skomplikowanym procesem biologicznym, na który składają się liczne systemy o różnym poziomie regulacji. Zrozumienie tych mechanizmów pozwoli lepiej zrozumieć zaburzenia,

które pojawiają się wraz z wiekiem. Pomimo wielu badań etiologia starzenia pozostaje ciągle słabo poznana. Ze starzeniem związane jest występowanie schorzeń neurodegeneracyjnych i rozwój nowotworów. Z powodu swojej skomplikowanej natury i czasu potrzebnego do rozwoju fenotypu, starzenie jest trudne do badań bezpośrednio na ludziach. Alternatywą jest wykorzystanie modeli linii komórkowych. Linie ze „znokautowanymi” lub trwale wyciszonymi genami metabolizmu DNA są jednym z takich modeli. Projekt pracy doktorskiej oceniany w tym raporcie elegancko kontynuuje poszerzanie wiedzy w tym zakresie. Doktorantka postawiła przed sobą ambitny cel zidentyfikowania związku pomiędzy zaburzoną inicjacją replikacji a starzeniem w komórkach drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*, modelowego organizmu eukariotycznego. Przeprowadzona analiza molekularna szeregu heterozygotycznych mutantów w kontekście dwóch obecnie scharakteryzowanych hipotez starzenia doprowadziła do odkrycia, że zaburzenia inicjacji replikacji mogą mieć istotny wpływ na przebieg starzenia replikacyjnego i chronologicznego drożdży oraz potencjał metaboliczny i reprodukcyjny komórek.

B) Założenia rozprawy i uzyskane wyniki

Głównym celem pracy było wykazanie roli inicjacji replikacji na starzenie heterozygotycznych mutantów drożdży *S. cerevisiae* w modelu replikacyjnego oraz chronologicznego starzenia oraz wpływ tego zaburzenia na procesy komórkowe, takie jak przebieg cyklu komórkowego oraz profil biochemiczny komórki. Badania zostały zaplanowane prawidłowo, zgodnie z poszczególnymi elementami postawionych hipotez, a przeprowadzenie ich w modelowym organizmie *S. cerevisiae* w pełni uzasadnione. Drożdże doczekały się bogatego piśmiennictwa naukowego m.in. w badaniach nad replikacją i senescencją. Do ważnych wyników uzyskanych podczas badań należy stwierdzenie, że zaburzenia inicjacji replikacji na poziomie kompleksów ORC i CMG nie wpływają na całkowitą długość życia komórek w modelu starzenia relikacyjnego, podczas gdy perturbacje inicjacji replikacji na poziomie białek lowPICC prowadzą do skrócenia całkowitej długości życia komórek aktywnych mitotycznie. Z kolei zaburzenia inicjacji replikacji na poziomie kompleksów ORC, CMG oraz białek regulujących lowPICC prowadzą do opóźnienia starzenia chronologicznego. Podczas starzenia chronologicznego zachodzi też haploidyżacja wszystkich komórek drożdży *S. cerevisiae*. Co ciekawe, okazało się, że brak pojedynczych alleli genów kodujących główne podjednostki kompleksu inicjującego replikację uwrażliwiał komórki nie tylko na czynniki wprowadzające do DNA pęknięcia dwuniciowe, ale także na takie, które wywołują uszkodzenia

oksydacyjne. Uważam, że interesująca byłoby w przyszłości praca nad dalszą dokładną charakterystyką tych heterozygot w kontekście utrzymania stabilnego genomu drożdży.

C) Ocena strony formalnej rozprawy

Układ tekstu, typowy dla prac promocyjnych, został zredagowany przejrzyście, jest to klasyczny manuskrypt składający się ze 94 stron, podzielony na kilka rozdziałów, z których każdy stanowi mniejszą całość. Cytowana literatura stanowi solidną podstawę badanej i omawianej tematyki – zacytowano ponad 138 publikacji. Rozprawę uzupełnia materiał dodatkowy w postaci odbitek trzech publikacji oraz wskazanych tu już oświadczeń współautorów.

- Zwięzłe Wprowadzenie, liczące zaledwie 9 stron, jest ładnie skomponowane, zapewnia przegląd wiedzy na temat procesu inicjacji replikacji oraz współczesnych teorii na temat mechanizmów starzenia w komórkach drożdży *S. cerevisiae* na których Doktorantka przeprowadziła całość badań zawartych w rozprawie. Tekst został wsparty bardzo dobrze dobranymi i przygotowanymi ilustracjami.
- Zaproponowane cele badawcze zostały dobrze określone i są spójne ze stanem wiedzy w badanej dziedzinie. Co godne podkreślenia, Autorka pokusiła się też na zaproponowanie hipotez, które zostały przedstawione w postaci odrębnego rozdziału.
- Sekcja Materiały i Metody uwzględnia wszystkie niezbędne szczegóły, które z pewnością będą pomocne dla zainteresowanych kontynuacją badań nad tematyką zaprezentowaną w tej pracy. Materiał badawczy stanowił zbiór heterozygotycznych komórek *S. cerevisiae*, niosących tylko po jednym allelu kodującym szereg białek niezbędnych dla prawidłowego uformowania się kompleksu inicjacyjnego replikacji.
- Podjęte doświadczenia w celu udzielenia odpowiedzi na pytania naukowe, które pojawiły się podczas badań, zostały starannie zaprojektowane i wykonane przy użyciu skutecznych podejść z wykorzystaniem wachlarza technik biologii komórki, molekularnych i biofizycznych. Otrzymane wyniki pokazują, że Doktorantce udało się zrealizować wszystkie założone cele. Nie mam zastrzeżeń do analizy statystycznej, która została prawidłowo wykonana i zaprezentowana. Moje zastrzeżenia budzi jedynie fakt niskiej rozdzielczości niektórych figur, tak, że nie można ich odczytać, nie posiłkując się tymi samymi rycinami zamieszczonymi w publikacjach. Ponadto wydaje mi się, że pod każdą figurą „przeklejoną” z opublikowanych prac powinien znaleźć się stosowny odnośnik.

- Dyskusja jest wnikliwa i właściwie konfrontuje uzyskane dane z dostępną literaturą przedmiotu. Dostarczone wyjaśnienia i interpretacja danych dowodzą, że Pani Karolina Stępień prezentuje wysoki poziom wiedzy i dojrzałość naukową, która umożliwia jej samodzielne prowadzenie badań.
- Wnioski kończące pracę zebrane są w zwięzłe punkty; zawierają one najważniejsze refleksje płynące z ocenianej tu rozprawy, co pozwala czytelnikowi w jasny sposób ocenić zawartość całości.

D) Pytania i uwagi

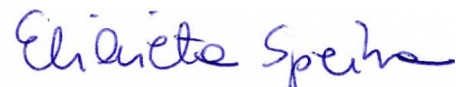
Po przeanalizowaniu rozprawy myślę, że jest kilka interesujących kwestii, które mogą zasługiwać na dalsze omówienie podczas obrony pracy doktorskiej.

- a) Sekcja Materiały i Metody, str. 24: Dlaczego zdecydowano się wybrać tak niski współczynnik istotności jak $p < 0.001$? Zazwyczaj stosuje się wartość $p < 0.05$.
- b) Sekcja Wyniki, str. 33, 34, 36 i 37, Figury 4-6A-B: Doktorantka piszę, że zaobserwowane różnice pomiędzy gęstością optyczną a rzeczywistą liczbą komórek w 1 ml mogą wynikać z różnic w ich morfologii. Czy przeprowadzono stosowne doświadczenia w celu potwierdzenia tej hipotezy, tj. ocenę wielkości komórek, przezroczystości, ziarnistości czy grubości ściany komórkowej? A jeśli nie, to jakie metody można by zastosować w tym celu?
- c) Str. 34 i 36, Figury 4E i 5E: Jaka może być przyczyna wyższej aktywności metabolicznej komórek heterozygotycznych w stosunku do homozygotycznych?
- d) Str. 43: Wydaje mi się, że podrozdział 7.4 powinien znaleźć się na początku opisu wyników.
- e) Str. 45-47, podrozdział 7.5: Jaka może być przyczyna częstszych dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach *ORC/orcΔ* oraz *SLD3/sld3Δ* po potraktowaniu ich czynnikiem wprowadzającym stres oksydacyjny? Czy są jakieś dane wskazujące na zwiększony poziom uszkodzeń oksydacyjnych, takich jak np. 8-oksoguaniny?

E) Ocena końcowa

Oceniana przeze mnie praca odznacza się wysoką jakością, zarówno pod względem merytorycznym jak i metodologicznym. Badania wykonane przez Doktorantkę są oryginalne i nowatorskie. Uzyskane wyniki wnoszą nowe, istotne ustalenia w zakresie opisu mechanizmów komórkowych regulujących procesy starzenia w warunkach stresu replikacyjnego, w tym długości i

jakości życia post-reprodukcyjnego. Są zarazem punktem wyjścia do dalszych dociekań badawczych. Biorąc pod uwagę zainteresowanie terapiami opóźniającymi procesy starzenia oraz poprawiającymi jakość życia, uważam wybór problemu badawczego za w pełni uzasadniony. Praca może mieć wpływ na przyszłe zastosowania translacyjne w postaci opracowania nowatorskich strategii terapeutycznych. Należy zauważyć, że zawarta w niej interpretacja wyników jest rzeczowa, pozbawiona nadinterpretacji, co wskazuje na krytyczne podejście do otrzymanych danych oraz świadczy o tym, że Pani Karolina Stępień jest dojrzałym badaczem w pełni zasługującym na stopień doktora. Fakt opublikowania całości wyników w recenzowanych periodykach naukowych posiadających współczynnik wpływu pozytywnie i dostatecznie weryfikuje wartość rozprawy. Na tej podstawie, **stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).** Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Rzeszowskiego o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Karoliny Stępień do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę zawartość recenzowanej pracy, jej poziom naukowy, istotność tematyki oraz dorobek naukowy Autorki w postaci publikacji **wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.**



dr hab. Elżbieta Speina