

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Betlej

pt.: „Ocena potencjału terapeutycznego metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w odpowiedzi na liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA w modelach komórkowych kostniakomięsa *in vitro*”, w związku z powierzeniem obowiązku recenzenta przez Radę Naukową Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego

Mgr inż. Gabriela Betlej przygotowała dysertację w Instytucie Biotechnologii Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem dr hab. Macieja Wnuka, prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz dr Iwony Rzeszutek – promotor pomocniczej. Rozprawa została przygotowana w formie monografii, Doktorantka opublikowała część wyników powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej w postaci dwóch artykułów: 1) **Betlej G**, Lewińska A, Adamczyk-Grochala J, Błoniarz D, Rzeszutek I, Wnuk M. *Deficiency of TRDMT1 impairs exogenous RNA-based response and promotes retrotransposon activity during long-term culture of osteosarcoma cells. Toxicol In Vitro.* 2022 Apr;80:105323. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105323 oraz 2) **Betlej G**, Ząbek T, Lewińska A, Błoniarz D, Rzeszutek I, Wnuk M. *RNA 5-methylcytosine status is associated with DNMT2/TRDMT1 nuclear localization in osteosarcoma cell lines. J Bone Oncol.* 2022 Jul 30;36:100448. doi: 10.1016/j.jbo.2022.100448. eCollection 2022 Oct. Pani Betlej prezentowała wyniki na dwóch konferencjach międzynarodowych. Badania powstały podczas realizacji dwóch projektów badawczych NCN: 1) „Rola metylotransferaz 5-metylocytozyny RNA w regulacji odpowiedzi komórek nowotworowych na pozakomórkowe oraz egzogenne RNA” (OPUS 22, UMO-2021/43/B/NZ2/02210, 2022-2026), którego kierownikiem jest dr hab. Anna Lewińska, prof. UR oraz 2) „Rola metylotransferazy DNMT2 w regulacji plastyczności genomowej komórek nowotworowych” (OPUS 13 grant UMO-2017/25/B/NZ2/01983, 2018-2021), którego kierownikiem był dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR. Tematyka dotycząca szeroko zakrojonych badań metylotransferaz DNMT2/TRDMT1 jest od wielu lat realizowana w zespole prof. Wnuka i przedstawiona do oceny rozprawa doktorska doskonale wpisuje się w ten trend.

Rozprawa doktorska została przygotowana w typowym dla prac promocyjnych układzie, Doktorantka wyróżniła: Spis treści, Wykaz wybranych skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel i założenia pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski. Rozprawę kończy Spis tabel, Spis rysunków, Bibliografia oraz Życiorys naukowy Doktorantki.

Wykaz skrótów zamieszono na 5 stronach, Streszczenia łącznie na 4 stronach. We Wstępie przedstawionym na 20 stronach, Doktorantka charakteryzuje pierwotne nowotwory

kości, ze szczególnym uwzględnieniem kostniakomięsaków (OS). Następnie przechodzi do głównych mechanizmów odpowiedzi komórek kostniakomięsaka na chemioterapeutyki, wprowadza w znaczenie metylotransferaz m⁵C RNA jako potencjalnego celu terapeutycznego w leczeniu kostniakomięsaków, odnosi się do znaczenia DNMT2/TRDMT1 w regulacji homeostazy komórkowej, mechanizmów naprawy DNA w komórkach nowotworowych, regulacji starzenia oraz śmierci komórek nowotworowych. W ostatniej części Wstępu Doktorantka wskazuje na znaczenie metylotransferaz w DNMT2/TRDMT1 w modyfikacji mikrośrodowiska guza. Ta część rozprawy jest bogato ilustrowana, umożliwia zapoznanie się z tematyką rozprawy.

Cel i założenia rozprawy przedstawione na 2 stronach dotyczą udziału metylotransferaz DNMT2/TRDMT1 w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe RNA i na etopozyd. Ciekawe jest wykorzystanie zewnątrzkomórkowego RNA uzyskanego z komórek kostniakomięsaka po indukcji starzenia lub śmierci do oceny udziału metylotransferaz w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne.

Doktorantka wskazała 7 celów szczegółowych. Przedstawione cele uważam za bardzo ciekawe i jednocześnie bardzo ambitne, stanowiące duże wyzwanie.

Materiały i metody przedstawiono na 26 stronach. Doktorantka wymienia podstawowe odczynniki, komercyjnie dostępne zestawy odczynników, egzogenne RNA, sprzęt laboratoryjny i oprogramowanie. Ważny element stanowi schemat prowadzonych badań obejmujący cztery modele badawcze I-IV, który ułatwia zrozumienie przedstawianej do oceny rozprawy doktorskiej. Doktorantka charakteryzuje stosowane linie komórkowe kostniakomięsaka U-2 OS, SaOS-2 i MG-63, warunki hodowli komórek, analizę żywotności komórek (barwienie aneksyną V), ocenę poziomu rodnika ponadtlenkowego, wewnątrzkomórkowego tlenku azotu. Wprowadza również w pomiar aktywacji ERK1/2 i AKT oraz analizę białek metodą Western Blot, otrzymanie zewnątrzkomórkowego RNA z komórek kostniakomięsaka. Istotną część Materiałów i metod stanowi opis transfekcji komórek z zastosowaniem lipofekcji, pobieranie znakowanego RNA S, analiza aktywności metabolicznej komórek przy pomocy testu MTT, uzyskanie linii MG-63 ze stabilnym wyciszeniem DNMT2/TRDMT1, indukcja starzenia w komórkach MG-63 oraz U-2 OS K-NIC i D-NIC, oznaczenie aktywacji mechanizmów odpowiedzi na uszkodzenia DNA z zastosowaniem cytometru przepływowego Muse® Cell Analyzer, izolacja RNA, analiza cyklu komórkowego w odpowiedzi na podanie egzogenne RNA i/lub etopozydu, określano poziom uszkodzeń DNA za pomocą testu kometowego. Ostatnią część stanowi analiza statystyczna. Rozdział

Materiały i metody uznają za przygotowany w sposób umożliwiający zapoznanie się ze stosowanymi metodami i wykorzystanymi materiałami.

Wyniki Doktorantka przedstawiła na 55 stronach. W tej części wydzielono cztery główne bloki umożliwiające odniesienie się do założonych celów, obejmujące ogólną charakterystykę linii kostniakomięśaka, ocenę wpływu zewnątrzkomórkowego RNA na komórki kostniakomięśaka, określenie wpływu utraty białka DNMT2/TRDMT1 podczas odpowiedzi komórek z zaindukowanym terapeutykami starzeniem na liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA oraz określenie znaczenia DNMT2/TRDMT1 podczas odpowiedzi komórek U-2 OS na liposomalne kompleksy zawierające egzogeny RNA.

Doktorantka wykazała różnice między trzema liniami kostniakomięśaka U-2 OS, SaOS-2, MG-63. Linia U-2 OS była najbardziej podatna na spontaniczną śmierć apoptotyczną, z kolei linia SaOS-2 charakteryzowała się najwyższym poziomem śmierci nekrotycznej, podwyższonym poziomem rodnika nadtlenkowego ($p < 0,001$), najwyższą aktywnością tlenku azotu ($p < 0,001$) oraz najwyższym poziomem ufosforylowania pERK1/2+/pAKT. Analiza poziomu i lokalizacji białek metylotransferaz DNMT2/TRDMT1 oraz NSUN2 wykazała najwyższy poziom białka DNMT2/TRDMT1 w linii U-2 OS, która dodatkowo wykazała najwyższy poziom tego białka w cytozolu. Najwyższy poziom metylotransferazy NSUN2 zaobserwowano w linii MG-63, zarówno w jądrze jak i cytozolu, przy czym różnice z innymi liniami nie wykazały istotnych statystycznie różnic.

W kolejnej części Doktorantka charakteryzowała wpływ zewnątrzkomórkowego RNA na komórki kostniakomięśaka. Ponad 80% (81-88,8%) RNA D i RNA S dla wszystkich linii stanowił RNA kodujący białko, przy czym najwięcej zaobserwowano dla linii U-2 OS, najwyższy poziom długich niekodujących RNA lncRNA zaobserwowano dla linii SaOS-2 (ok. 15%), a najniższy dla linii U-2 OS (ok. 9%). Nie zaobserwowano różnic dla mikro RNA (miRNA), która stanowiła poniżej 1% całkowitego zewnątrzkomórkowego RNA. Z kolei małe jąderkowe RNA (snoRNA) wykazano w największym stężeniu dla linii SaOS-2 (ok. 0,18%), natomiast mały jądrowy RNA (snRNA) występował we frakcji zewnątrzkomórkowej najrzadziej (średnio 0,02%), przy czym dla linii U-2 OS i MG-63 nie zaobserwowała obecności tej frakcji w RNA D. Najmniej pseudogenów Doktorantka wykazała dla frakcji RNA D dla linii U-2 OS.

Pobieranie liposomalnych kompleksów zewnątrzkomórkowego RNA zaobserwowano dla wszystkich linii kostniakomięśaka, przy czym linia SaOS-2 wykazała się najlepszą efektywnością, co wiązało się z największym, statystycznie istotnym obniżeniem aktywności metabolicznej komórek tej linii pod wpływem lipofekcji zewnątrzkomórkowym RNA

izolowanym z medium hodowlanego ginących (RNA D) lub z zaindukowanym etopozydem starzeniem (RNA S) komórek kostniakomięśaka. Statystycznie istotne obniżenie aktywności komórek zaobserwowano również dla linii MG-63 pod wpływem liposomalnych kompleksów z RNA S ($p < 0,001$). Doktorantka zaobserwowała statystycznie istotny wzrost poziomu komórek apoptotycznych we wszystkich analizowanych liniach pod wpływem lipofekcji zewnątrzkomórkowymi RNA, przy czym najbardziej podatna była linia SaOS-2, a najmniej linia komórkowa MG-63. Linie SaOS-2 i MG-63 wykazała wzrost poziomu rodnika ponadtlennkowego w odpowiedzi na lipofekcję RNA S lub RNA D ($p < 0,001$), natomiast linia U-2 OS wyłącznie po lipofekcji RNA D ($p < 0,001$).

Dla wszystkich linii wykazano wzrost aktywności tlenku azotu powiązany ze spadkiem żywotności komórek, pod wpływem zewnątrzkomórkowych RNA S i RNA D ($p < 0,001$), przy czym najbardziej wrażliwa była linia SaOS-2. Doktorantka wykazała również zmianę aktywności szlaku MAPK/PI3K związanego z proliferacją komórek. Najbardziej wrażliwa linia SaOS-2 wykazała istotny statystycznie wzrost liczebności komórek o podwójnej aktywacji (pERK1/2+/pAKT+) ($p < 0,001$), szczególnie pod wpływem zewnątrzkomórkowego RNA S.

W kolejnej części Doktorantka określała możliwości aktywacji ścieżki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na infekcję wirusową, w których pośredniczą białka RIG-I oraz STING, wykazując brak statystycznie istotnych zmian dla białka MDA5, natomiast poziom RIG-I zmieniał się dla linii MG-63 pod wpływem RNA D, a obydwa typy lipofekcji wpływały na wzrost poziomu p-STING/STING w cytozolu linii U-2OS oraz SaOS-2. Zaobserwowała również zmianę poziomu czynników prozapalnych IL-1 β , IL-6, IL-8 oraz IFN- β pod wpływem zewnątrzkomórkowych RNA.

Poziom jądrowego DNMT2/TRDMT1 oraz NSUN2 wzrastał w linii U-2 OS pod wpływem obydwu rodzajów RNA, podczas gdy komórki SaOS-2 oraz MG-63 poddane lipofekcji z użyciem RNA S charakteryzowały się niższym poziomem DNMT2/TRDMT1 w cytozolu ($p < 0,001$). Poziom NSUN2 zwiększała się w jądrach komórek SaOS-2 pod wpływem obydwu typów zewnątrzkomórkowego RNA, natomiast dla linii MG-63 spadał w cytozolu pod wpływem RNA S ($p < 0,001$). Mgr Betlej wskazała, że liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA S i RNA D aktywują białka APOBEC3A, APOBEC3G, LRP8 i ALYREF związane z transportem oraz edycją RNA.

Bardzo interesująca jest trzecia część wyników dotycząca określenia wpływu utraty białka DNMT2/TRDMT1 podczas odpowiedzi komórek z zaindukowanym terapeutykami starzeniem na liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA. Doktorantka wykorzystała dwie linie kostniakomięśaka U-2 OS oraz MG-63, w których wyłączono gen

kodujący białka DNMT2/TRDMT1 poprzez zastosowanie technologii CRISPR/Cas9 (linia U-2 OS była wcześniej modyfikowana), brak białka potwierdziła metodą Western blot. Wykazała, że linie komórkowe U-2 OS i MG-63 bez funkcjonalnego białka DNMT2/TRDMT1 nie wykazują statystycznie istotnych różnic w porównaniu z liniami kontrolnymi na etopozyd, wyjątek stanowi stężenie 5 μ M dla linii MG-63. Zaobserwowała również statystycznie istotny spadek aktywności metabolicznej modyfikowanych linii w obecności niskiego stężenia DMSO (do 0,05%).

Mgr Betlej określała wpływ lipofekcji zewnątrzkomórkowym RNA w komórkach U-2 OS oraz MG-63 pozbawionych białka DNMT2/TRDMT1 z zaindukowanym etopozydem starzeniem komórkowym nie wykazując różnic w aktywności markera starzenia - β -galaktozydazy. Zaobserwowała, że brak białka DNMT2/TRDMT1 uwrażliwia komórki U-2 OS na apoptozę, przy czym obniżenie żywotności komórek wystąpiło już w warunkach kontrolnych (36%). Linie komórkowe MG-63 po infekcji plazmidem kontrolnym (K-NIC) charakteryzowały się wzrostem liczebności subpopulacji w fazie wczesnej i późnej apoptozy po działaniu liposomalnych kompleksów zawierających RNA S lub RNA D ($p < 0,001$), natomiast brak białka DNMT2/TRDMT1 związany był z brakiem wrażliwości na liposomalne kompleksy RNA S. Wyłączenie genu kodującego metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 związane było z większym odsetkiem komórek żywych.

Doktorantka wykazała, że brak metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 modyfikuje mechanizmy wrodzonej odporności w komórkach poprzez analizę poziomu białka MDA5, RIG-I i STING, określała również poziomy NF κ B oraz czynników prozapalnych. Odniosła się także do zmian poziomu metylotransferaz z rodziny NSUN oraz białek związanych z transportem oraz edycją RNA pod wpływem liposomalnych kompleksów zewnątrzkomórkowych RNA.

W czwartej części wyników Doktorantka skupiła się na analizie jednej linii kostniakomięśaka U-2 OS poddanej działaniu egzogennej RNA pochodzącego z innego typu komórek - linii komórkowej białaczki K562, w odniesieniu do 4-godzinnej ekspozycji na 2,5 μ M etopozydem. Wykazała ograniczenie poziomu hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M w komórkach U-2 OS z wyłączoną syntezą metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 pod wpływem liposomalnych kompleksów zawierających egzogenną RNA. Zaobserwowała ponadto promowanie efektu apoptozy, wzrost poziomu uszkodzeń DNA oraz odmienny mechanizm naprawy uszkodzeń DNA przy braku metylotransferazy DNMT2/TRDMT1. Doktorantka wykazała obniżenie poziomu interleukin prozapalnych pod wpływem etopozydu oraz zaangażowanie metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w regulację tego procesu.

Wyniki są bogato ilustrowane, każdy rozdział jest opatrzony ryciną, ułatwiającą zrozumienie przedstawianych przez Doktorantkę danych. Rozdział Wyniki został bardzo dobrze opracowany.

Dyskusja została przedstawiona na 31 stronach, a Doktorantka umiejętnie odnosi się do dostępnych danych. Rozdział został zakończony tabelami i rycinami, które podsumowują uzyskane wyniki.

Doktorantka przedstawiła siedem wniosków dotyczących charakterystyki linii kostniakomięsaka, zewnątrzkomórkowych RNA, pobierania zewnątrzkomórkowego RNA, funkcji metylotransferazy DNMT2/TRDMT1, możliwości wykorzystania liposomalnych kompleksów zewnątrzkomórkowego RNA do usuwania starzejących się komórek kostniakomięsaka. Mgr Betlej wskazała również na wpływ braku funkcjonalnego białka DNMT2/TRDMT1 na mechanizmy wrodzonej odporności immunologicznej i odpowiedź na liposomalne kompleksy zawierające zewnątrzkomórkowy RNA oraz wzrost wrażliwości komórek na chemioterapię. Wnioski odpowiadają celom szczegółowym.

Mgr Gabriela Betlej przedstawiła Spis tabel i Spis rycin obejmujący 11 tabel oraz 43 ryciny. Doktorantka zamieściła 334 pozycje w Bibliografii, co świadczy o bardzo solidnym podejściu do prezentowanych zagadnień. Ostatnia część rozprawy zawiera życiorys naukowy mgr inż. Gabrieli Betlej.

Z obowiązków recenzenta muszę odnieść się do drobnych usterek w przedstawionej rozprawie, nie mają one jednak przełożenia na wysoką wartość merytoryczną rozprawy. W Wykazie wybranych skrótów warto by było usunąć literówki i sprawdzić poprawność nazw w języku polskim i angielskim (np. HBV, m1A, TEMED). Należałoby poprawić Rysunek 4 (snRNA i snoRNA).

Przedstawiona do oceny rozprawa nasunęła mi kilka pytań:


- 1) Cząsteczki RNA należą do grupy bardzo szybko degradujących się biopolimerów. Proszę o wyjaśnienie jakie mechanizmy zapobiegają jego degradacji i umożliwiają pełnienie funkcji pozakomórkowych.
- 2) Uprzejmie proszę o wyjaśnienie czy można uzyskać podobne wyniki w oparciu o lipofekcję zewnątrzkomórkowym RNA izolowanym z podłoża hodowlanego umierających lub zaindukowanym starzeniem komórek dowolnego typu, nie tylko kostniakomięsaków lub komórek białaczki?

- 3) Czy można wykorzystać linie komórek prawidłowych – nie będących liniami komórek nowotworowych? Czy stosowanie zewnątrzkomórkowego RNA pochodzącego z tej samej linii komórkowej może wpływać na ich potencjał terapeutyczny?
- 4) Czy można wskazać, że stosowanie puli zewnątrzkomórkowych RNA może wykazać przewagę terapeutyczną wobec podejścia związanego z podaniem wybranych typów zewnątrzkomórkowych RNA?
- 5) Jakich wyników można się spodziewać po łącznym podaniu zewnątrzkomórkowych RNA uzyskanych po indukcji starzenia i umierania komórek?

Wniosek końcowy. Zwracam się do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia mgr inż. Gabrieli Betlej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Ze względu na przeprowadzenie szerokich badań linii komórkowych kostniakomięsaka ze zwróceniem uwagi na potencjalne strategie umożliwiające terapię chemioterapeutykami oraz zastosowanie nowoczesnych metod badawczych zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy. Wyróżnienie uzasadniam uzyskaniem bardzo wartościowych wyników przy zastosowaniu pogłębionych analiz, o czym świadczy opublikowanie części wyników powstałych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej, w których Doktorantka jest pierwszą autorką: **Betlej G**, Lewińska A, Adamczyk-Grochala J, Błoniarz D, Rzeszutek I, Wnuk M. *Deficiency of TRDMT1 impairs exogenous RNA-based response and promotes retrotransposon activity during long-term culture of osteosarcoma cells. Toxicol In Vitro.* 2022 Apr;80:105323. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105323, if 3,2 oraz 2) **Betlej G**, Ząbek T, Lewińska A, Błoniarz D, Rzeszutek I, Wnuk M. *RNA 5-methylcytosine status is associated with DNMT2/TRDMT1 nuclear localization in osteosarcoma cell lines. J Bone Oncol.* 2022 Jul 30;36:100448. doi: 10.1016/j.jbo.2022.100448. eCollection 2022 Oct. If 3,4.

Poznań, 5.06.2024 r.


Dr hab. Marlena Szalata, prof. UPP