

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Gabrieli Betlej

**Ocena potencjału terapeutycznego metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w
odpowiedzi na liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA w
modelach komórkowych kostniakomięsaka *in vitro***

wykonanej pod opieką promotora

Pana dr hab. Macieja Wnuka prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego

oraz promotora pomocniczego

Pani dr Iwony Rzeszutek

zrealizowanej w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego

Informacje ogólne

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowana na podstawie pisma Pani prof. dr hab. Idalii Kasprzyk – Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 25.04.2024.

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku polskim, liczące 194 strony, 43 rysunki, 11 tabel. Praca podzielona została na rozdziały: 1. Wstęp, 2. Cel i założenia pracy, 3. Materiał i metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski oraz Wykaz wybranych skrótów, Streszczenie, Summary, Spis tabel, Spis rysunków, Bibliografię, Życiorys naukowy. Ponadto, Autorka dołączyła stwierdzenie „część danych z tej rozprawy doktorskiej zostało opublikowanych w następujących manuskryptach”, jednak nie określono udziału Kandydatki i współautorów w przygotowaniu publikacji. Można przypuszczać, że udział ten był znaczący, gdyż jest Ona pierwszym autorem publikacji. Nie mniej, oświadczenia współautorów na temat ich merytorycznego udziału w przygotowanie publikacji byłyby wskazane. Reasumując formalną ocenę pracy, została ona przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla rozpraw naukowych i jej strona formalna nie budzi zastrzeżeń.

Merytoryczna ocena pracy

Kostniakomięsak jest najczęstszym pierwotnym złośliwym nowotworem kości, który występuje najczęściej u dzieci i młodzieży. Główną metodą leczenia kostniakomięsaka były głównie amputacje, jednak dzięki zastosowaniu chemioterapii przeżywalność pacjentów bez przerzutowego kostniakomięsaka może sięgać 60–70%, a niestety czas przeżycia kostniakomięsaka z przerzutami wynosi mniej niż 30%. Wrażliwość i sukces leczenia zależy od wielu czynników endogennych, a między innymi genetycznych, jak również terapeutycznych. Stosuje się różne metody leczenia, w tym terapię neoadiuwantową, czy chemoterapię wielolekową, jednak efekty leczenia nie są bardzo optymistyczne. Kluczowym czynnikiem zmniejszającym efektywność leczenia jest oporność wielolekowa komórek nowotworowych. Mechanizmy, odpowiedzialne za reakcję komórek nowotworowych na chemioterapię są wciąż niedostatecznie poznane. Pomimo, zastosowania wielu rozwiązań wspomagających chemoterapię, a między innymi siRNA wciąż skuteczność leczenia nie jest zadowalająca. Badania Pani mgr Gabrieli Betlej, wpisujące się w poszukiwanie skutecznej metody leczenia kostniakomięsaka, uważam za wysoce uzasadnione i bardzo potrzebne.

Wstęp. W tej części pracy Autorka, w sposób wyczerpujący, opisała stan wiedzy i badań naukowych w zakresie podjętego tematu pracy. Naświetlony został obecny stan terapii kostniakomięsaka na świecie i wskazane zostały jego punkty krytyczne. Autorka wskazała na niepowodzenia terapii, wynikające z szerokiego spektrum mechanizmów, jakimi dysponują komórki nowotworowe badanego nowotworu celem przetrwania. Ta część wstępu została opatrzona rysunkiem przedstawiającym główne mechanizmy odpowiedzialne za chemiooporność komórek kostniakomięsaka, jednak moim subiektywnym zdaniem rysunek mógłby być bardziej spójny i wskazywać na powiązania poszczególnych elementów schematu. Kolejny podrozdział wstępu wskazuje na metylotransferazy m5C RNA jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu osteosarcomy. Autorka zwróciła uwagę na istotny element powodzenia terapii celowanej, a mianowicie trudność określenia markerów molekularnych i zaburzenia metylacji RNA, prowadzące do rozwoju nowotworu. W kolejnych częściach Wstępu Autorka koncentruje się na metylotransferazie m5C RNA – DNMT2/TRDMT1 i roli tego białka w regulacji mechanizmów promujących i hamujących rozwój kostniakomięsaka. Przytoczono zarówno podstawowe aspekty znaczenia DNMT2/TRDMT1 w regulacji homeostazy komórkowej jak też znaczenie tego enzymu w regulacji mechanizmów determinujących wrażliwość komórek na

terapię. Autorka sugeruje, że białko to może być markerem prognostycznym w rozwoju chorób nowotworowych. W kolejnych podrozdziałach przytoczono wyniki badań nad rolą DNMT2/TRDMT1 w procesach starzenia i śmierci komórek kostniakomięsaka. Ta część Wstępu jest doskonale napisana, bowiem w sposób wnikliwy i logiczny przedstawiono różne aspekty, często przeciwstawne, uwikłania badanego białka w procesy starzenia komórkowego, zwłaszcza poprzez regulację poziomu białka p53. Najciekawszy jednak fragment Wstępu dotyczy roli cfRNA i jego znaczenia jako czynnika sygnałnego, zwłaszcza w kontekście modyfikacji aktywności DNMT2/TRDMT1. Należy również dodać, że Schematy (zmodyfikowane przez Kandydatkę), przedstawione na rysunkach 2,3,4 i 5 pozwalają na uporządkowanie i pewną syntezę zawartych we wstępie informacji.

Część pracy, stanowiąca przegląd literatury nakreśla state of the art problemu, jaki Autorka podjął się rozwiązać. Przytoczono wyniki badań opublikowane w najnowszej literaturze światowej, a problematyka została omówiona w sposób syntetyczny, wnikliwy merytorycznie i logiczny.

Na podstawie przeglądu literatury Kandydatka sformułowała hipotezę i cele pracy doktorskiej.

Rozdział Materiał i metody został poprzedzony wykazem odczynników, zestawów analitycznych, sprzętu laboratoryjnego, oprogramowania wraz z ich dokładną specyfikacją i źródłem pochodzenia, a także przytoczono skrócony opis pozyskania egzogennej RNA. Ten sposób przedstawienia części metodyki jest przejrzysty i jasny, pozwala na ograniczenie zbytecznej ilości tekstu oraz łatwy dostęp do potrzebnych informacji. Co więcej, wyczerpująca specyfikacja umożliwia powtórzenie eksperymentu w identyczny sposób, co stanowi warunek rzetelności prezentacji materiału i metod. Kolejne podrozdziały prezentujące materiał badawczy, warunki hodowli, zastosowane analizy oraz metody statystyczne zostały również przedstawione w sposób bardzo szczegółowy i wyczerpujący. Wszystkie opisane procedury analityczne zostały opisane w sposób optymalny, pozwalający na powtórzenie przeprowadzonych badań. Opisane metody analityczne dokumentują wiarygodność, rzetelność oraz powtarzalność prezentowanych eksperymentów. Bardzo korzystnym rozwiązaniem jest wprowadzenie rysunku 6 i Tabeli 1, pozwalających na uporządkowanie modeli badawczych i syntezę informacji dotyczących linii komórkowych. Postępowanie analityczne, opisane przez Kandydatkę, dowodzi Jej dużej wiedzy, zdolności badawczych, zaangażowania

podczas pracy analitycznej co jest niewątpliwie godne podkreślenia. Jakkolwiek, mam kilka drobnych uwag do tej części pracy, które zamieszczone są na końcu recenzji

Wyniki są kolejną, najważniejszą częścią pracy. Ta część pracy została podzielona na rozdziały i podrozdziały, co wprowadza porządek i bardzo ułatwia zapoznanie się z uzyskanymi wynikami, których jest dość dużo. Wyniki oddają logiczny porządek kolejnych doświadczeń, począwszy od ogólnej charakterystyki komórek badanych linii kostniakomięsaka, a kończąc na kluczowym dla pracy problemie roli DNMT2/TRDMT1 podczas reakcji komórek na liposomalne kompleksy, zawierające egzogenne RNA. Ponadto, tytuły rozdziałów i podrozdziałów są częściowo syntetycznym określeniem kluczowego wyniku, co jest nieczęsto stosowane w tego rodzaju opracowaniach, a moim zdaniem jest bardzo korzystnym rozwiązaniem, ułatwiającym percepcję głównego nurtu kolejnych wyników badań. W pracy przedstawiono bardzo wiele, bardzo ciekawych wyników, bogato ilustrowanych rysunkami i tabelami. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka drobnych kwestii formalnych oraz wyrazić swoje wątpliwości natury merytorycznej, co przedstawiono na końcu recenzji.

Dyskusja stanowi zwykle najtrudniejszą do przygotowania część pracy doktorskiej. Nowatorskie, ciekawe, a także liczne wyniki przeprowadzonych doświadczeń stanowiły znaczne wyzwanie dla Autorki, wymagające dużej wiedzy, umiejętności syntetycznego myślenia i logicznego wnioskowania. Dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona w doskonały sposób i niewątpliwie świadczy o dużej dojrzałości naukowej Kandydatki, jej pracowitości i pasji badawczej. Na szczególne podkreślenie należą rozważania na temat przyczyn i skutków tendencji komórek SaOS-2 do spontanicznej śmierci. Interesująca teza o powiązaniu tej tendencji z wysokim poziomem RFT wydaje się prawdopodobna, jednak nasuwa się również pytanie, czy stres oksydacyjny był wynikiem nadprodukcji anionorodnika ponadtlenkowego czy niedoboru dysmutazy ponadtlenkowej lub innych związków o charakterze antyoksydantów, a także czy zwiększony poziom reaktywnych form tlenu generuje również powstawanie wolnych rodników lipidowych? Niewątpliwie, ciekawym i nowatorskim wynikiem jest stwierdzenie silnego związku pomiędzy DNMT2/TRDMT1 a skłonnością komórek linii SaOS-2 do śmierci nekrotycznej. Kolejna część dyskusji dotyczy zastosowania zewnątrzkomórkowego RNA, którego wydzielanie indukowano etopozydem. Autorka potwierdziła tezę o intensywnym pobieraniu tego RNA przez komórki linii SaOS-2. Interesującym wynikiem było wykazanie silnej indukcji stresu

oksydacyjnego w komórkach SaOS-2 poddanych lipofekcji wymienionym RNA związanym z aktywacją kinaz AKT i ERK1/2. Bardzo ciekawą i nowatorską obserwacją było wykazanie zwiększenia poziomu białka zaangażowanego w stymulację interferonów - STING w komórkach linii U-2 i SaOS-2 pod wpływem lipofekcji badanych RNA. Istotną, a nawet kluczową obserwacją Autorki było wykazanie, że indukowane stresem, zewnątrzkomórkowe RNA, podawane do komórek w kompleksie liposomowym wywołuje apoptozę i nekrozę komórek kostniakomięsaka wszystkich badanych linii. Kolejnym ciekawym, w opinii recenzenta, wynikiem przeprowadzonych badań było wskazanie istotnego związku obecności metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 z poziomem ważnego z punktu widzenia aktywacji stanu zapalnego czynnika transkrypcyjnego NF-kB. W pracy uzyskano wiele ciekawych wyników, które zostały błyskotliwie przedyskutowane, wskazując na plusy i minusy zaobserwowanych zjawisk w kontekście ich potencjalnego zastosowania terapeutycznego. Wykazanie ważnej roli DNMT2/TRDMT1 jako czynnika zaangażowanego w mechanizmy wrodzonej odporności immunologicznej komórek nowotworowych oraz zarządzającego białkami odpowiedzialnymi za reakcję na obce kwasy nukleinowe oraz wskazanie na potencjalne zastosowanie tej metylotransferazy w projektowaniu nowatorskich metod terapii celowanej kostniakomięsaka uważam za znaczące osiągnięcie Kandydatki. Wydaje się interesujące jak, zdaniem Autorki, powinny przebiegać dalsze badania nad wdrożeniem proponowanej terapii?

Wnioski stanowią zakończenie przedłożonej do recenzji dysertacji. Zostały one sformułowane w sposób bardzo dojrzały i odpowiedzialny, ze wskazaniem kluczowych wyników badań, w odniesieniu do założonej hipotezy i celu badań. Jednak, subiektywnym zdaniem recenzenta, uważam, że powinny być bardziej szczegółowe. Sformułowania „szereg różnic” (wniosek a), „moduluje”, „charakter antynowotworowy” (wniosek c), „eliminacji” (wniosek e) wskazywałyby mocniej na unikalny charakter uzyskanych wyników, gdyby było doprecyzowane. Jakkolwiek, wybór i syntetyczne zaprezentowanie kluczowych mechanizmów, które leżą u podstawy ww. określeń jest bardzo trudne.

Reasumując, można niewątpliwie stwierdzić, że przeprowadzone przez Panią mgr Gabrielę Betlej badania zostały bardzo dobrze przeprowadzone, doskonale przedyskutowane, a wyniki badań są w znacznej części nowatorskie. Badania te mogą wpłynąć na postęp w zakresie poszukiwania nowych metod terapii

przeciwnowotworowej. Pytania i sugestie Recenzenta mają charakter dyskusji i nie wpływają na bardzo dobrą ocenę pracy.

Podsumowanie recenzji

Badania, jakie podjęła Pani mgr Gabriela Betlej zostały przeprowadzone na najwyższym poziomie merytorycznym a ich wyniki zawierają znaczny element badań nowatorskich i bez wątpienia mają wpływ na rozwój dyscypliny i postęp w zakresie poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów w Polsce i na świecie. W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **Pani mgr Gabrieli Betlej** odpowiada warunkom sformułowanym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 roku poz. 742). Niniejszym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie mgr Gabrieli Betlej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej z uwagi na nowatorski charakter badań w kontekście krajowym i międzynarodowym oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników w zakresie doskonalenia terapii celowanej kostniakomięsaka.

Pytania i wątpiwości.

- Czym kierowała się Autorka wybierając do badań linie komórkowe kostniakomięsaka U-2 OS o morfologii epitelialnej, SaOS-2 o morfologii epitelialnej i MG-63 o morfologii fibroblastów, a także czy dobór mediów hodowlanych był zgodny z zaleceniami producenta, a jeśli nie czy mogło to mieć wpływ na funkcje sekrecyjne komórek?
- Czy istnieją jeszcze inne metody pozyskiwania zewnątrzkomórkowego RNA i dlaczego Autorka wybrała metodę zastosowaną w swoich badaniach?
- Czy można było uwzględnić również, dla porównania jako grupę kontrolną, komórki nienowotworowe (np. ludzkie osteoblasty hFOB 1.19 ATCC)?
- Dlaczego zastosowano etopozyd? Chociaż krótki komentarz na temat tego leku powinien znaleźć się we Wstępie.
- Obraz fluorescencji (rys. 15) powinien być większy, a opis rysunku powinien zawierać opis identyfikacji barw.

- Część cytogramów jest nieczytelna, nawet jeśli dołączono wykresy słupkowe, tekst cytogramów powinien być dobrze zaprezentowany.
- Nie ma konieczności podawania w tekście poziomu ufności, o ile został podany w opisie tabeli, a poza tym różnica nieistotna statystycznie nie jest różnicą.
- Skład ilościowy zewnątrzkomórkowego RNA (Tabela 9) powinien uwzględniać jednostki, niezależnie od opisu w tekście, zgodnie z zasadą, że tabele i wykresy powinny być zrozumiale niezależnie od kontekstu.
- Dlaczego w teście MTT wybrano okres czasu 24 godziny?
- Co oznacza lipofekcja 1 μ g/? (Rys. 6).
- Jaka jest podstawa prowadzenia obserwacji jedynie przez 24h (Rys. 6).
- Dlaczego rys. 7 i 9 przedstawia zdjęcie a rys.8 fotografię (Tabela 1)
- Tekst „Cecha charakterystyczna” (Tab. 1) nie powinien być napisany w formie zdania i mógłby być skrócony do 1, 2 cech, ważnych z punktu widzenia niniejszych badań.
- Podrozdział 3.4 „Warunki hodowli” nie jest rozdziałem nadrzędnym dla 3.4.1 – 3.4.14. Te podpodrozdziały powinny być zgromadzone w podrozdziale zatytułowanym inaczej np. Zastosowane metody analityczne.
- Można przypuszczać, że większość analiz prowadzonych było na podstawie Instrukcji producenta, nawet jeśli były one modyfikowane przez Autorkę, należało uwzględnić ich źródło w tekście (zacytować).
- Na jakiej podstawie określono czas 24 godziny lub 72 godziny oraz stężenie etopozydu 1,5 oraz 10,15,20. Co oznacza stężenie μ M/ ? (podrozdział 3.4.7.1)

Ewa Sawosz Chwalibóg, 15.06.2024

