



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; andrzej.gamian@hirszfeld.pl

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 25.06.2024r.

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*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Macieja Wnuka, prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego

Przedstawiona do oceny praca dotyczy badań nad rolą białka metylotransferazy tRNA i zewnątrzkomórkowego RNA w rozwoju nowotworu kości kostniakomięsa, z użyciem modelu komórkowego. Nowotwór ten stanowi poważny problem diagnostyczny ze względu na niejednorodność genetyczną, brak różnicowych testów diagnostycznych i markerów molekularnych. Dlatego badania nad tym nowotworem są szczególnie oczekiwane i mają istotne znaczenie biomedyczne, a wyniki mogą znaleźć wykorzystanie praktyczne w opracowywaniu nowych podejść terapeutycznych. Stąd podjęty temat pracy doktorskiej jest ważny i wychodzi naprzeciw aktualnych potrzeb medycyny. Tematyka tych badań wywodzi się z bogatego dorobku zespołu w zakresie genomiki i biologii molekularnej. Nowotwór ten stwarza także trudności terapeutyczne, między innymi poprzez wzrost naprawy DNA i indukcję starzenia jako mechanizmu ochrony. Dlatego włączenie do badań mutanta pozbawionego metylotransferazy tRNA oraz indukcji starzenia komórek etopozydem było właściwym podejściem w poszukiwaniu markerów diagnostycznych i celów terapeutycznych. Badaniami objęto trzy linie komórkowe kostniakomięsa o różnych charakterystykach genetycznych. Praca stanowi klasyczną rozprawę, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono spis skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, następnie określenie celu pracy, omówienie metod, wyników, ich dyskusję z wnioskami i spis piśmiennictwa, także wykaz dorobku naukowego. Praca zawiera 194 strony maszynopisu wraz z 43 rysunkami i 11 tabelami, cytowanymi 334 pozycjami piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka wprowadza zwięźle do tematyki nowotworów kości szczególnie kostniakomięsaków, omawia mechanizmy odpowiedzi na chemioterapeutyki by przejść do opisu metylotransferaz RNA, roli DNMT2/TRDMT1 w czterech ważnych funkcjach, mianowicie regulacji homeostazy

komórkowej, naprawie DNA w komórkach tego nowotworu, regulacji starzenia i śmierci komórek osteosarkomy oraz modulacji mikrośrodowiska guza. Celem pracy było sprawdzenie hipotezy czy metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 jest zaangażowana w wielopłaszczyznową odpowiedź komórek kostniakomięsaka na zewnątrzkomórkowe RNA, za odpowiedź tych komórek na działanie etopozydu jako chemioterapeutyku indukującego starzenie komórkowe oraz odpowiedź na pytanie jaki jest wpływ zewnątrzkomórkowego RNA jako terapeutu. Realizowano zadania przy pomocy bogatego zestawu metod, hodowli komórkowych, pomiaru żywotności komórek metodą z Aneksyną V, oznaczania rodnika ponadtlenkowego, wewnątrzkomórkowego NO, pomiaru aktywacji kilku szlaków komórkowych z użyciem cytometrii przepływowej i komercyjnych zestawów z odpowiednimi przeciwciałami. Opisano izolację, oznaczanie stężenia białka metodą BCC, analizy białek w immunoblotingu i techniką immunofluorescencji. Dalej podane są opisy procedur otrzymywania RNA, zewnątrzkomórkowego RNA, odwrotnej transkrypcji, sekwencjonowania, znakowania. Analizy komórkowe dotyczyły indukcji starzenia lub śmierci komórkowej, transfekcji komórek, pomiarów aktywności metabolicznej metodą z MTT, cyklu komórkowego, ekspresji genów metodą qRT-PCR, analizę poziomu uszkodzeń DNA testem kometowym, opisano odczynniki, zestawy testowe, na końcu analizę statystyczną. Z instrumentalnych technik autorka stosowała metody cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej. Metody są dobrze opisane, opatrzone schematem eksperymentów, fotografią morfologii komórek, 8 tabelami, przez co rozdział jest klarowny.

Wyniki poszczególnych doświadczeń są opisane w logiczny, konsekwentny ciąg odpowiedzi na zadawane pytania, co potwierdza, że wypracowany i stosowany model eksperymentalny był właściwy. Autorka poddała charakterystyce wybrane do badań linie komórkowe kostniakomięsaka wykazując różnice między nimi. Linia U-2 OS najbardziej podlegała apoptozie, a linia SaOS-2 nekrozie, także z wyższym poziomem ROS, NO, markerów szlaków związanych z proliferacją oraz najniższym poziomem metylotransferazy tRNA, podczas gdy najwyższy poziom tego białka był w komórkach U-2 OS. Linie komórkowe różniły się też w lokalizacji komórkowej tych białek, ale ich zewnątrzkomórkowy RNA był podobny i zawierał głównie RNA kodujące białko. Następnie wykazano, że zewnątrzkomórkowy RNA jest efektywnie pobierany przez komórki kostniakomięsaka, oraz że liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA indukują w nich apoptozę, czemu towarzyszy utrata równowagi redoks, moduluje również reakcje wrodzonej odporności immunologicznej. Dane te wskazują na antynowotworowy charakter zewnątrzkomórkowego RNA. Kolejne eksperymenty dotyczyły

wpływu utraty białka metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w komórkach kostniakomięsaka na lipokompleksy zewnątrzkomórkowego RNA. Wykazano, że brak tego białka upośledza mechanizmy wrodzonej odporności immunologicznej i kontroluje fenotyp sekrecyjny komórek starzejących się w odpowiedzi na te preparaty RNA, gdyż między innymi obniżony był poziom IFN- β , a także zauważono promowanie apoptozy, a nie naprawy uszkodzeń DNA. Ponadto doktorantka wykazała wzrost poziomu białka stymulującego geny dla interferonów (STING) w odpowiedzi na liposomalne zewnątrzkomórkowe RNA. Autorka wnioskuje, że liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA mogą posłużyć do eliminacji komórek kostniakomięsaka z zaindukowanym chemioterapeutycznie starzeniem. Obniżenie poziomu metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 uwrażliwia komórki na chemioterapię i jest związane z defektami w naprawie DNA. Wyniki mają wartość podstawową, referencyjną w zakresie poznawania mechanizmów nowotworzenia, nawrotów choroby, czy oporności na terapię, co może mieć znaczenie przy konstruowaniu diagnostyków i terapeutyków.

Dyskusja jest przeprowadzona bardzo dobrze, poszczególne doświadczenia są omówione krytycznie, autorka umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki, w odniesieniu do piśmiennictwa. Potwierdzono postawioną hipotezę, że liposomalne kompleksy z zewnątrzkomórkowym RNA aktywują mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej prowadząc do śmierci komórek nowotworowych, w procesie regulowanym przez metylotransferazę tRNA. Istotną obserwacją była ta, że cytotoksyczność liposomalnych kompleksów zewnątrzkomórkowego RNA była niezależna od tła genetycznego. Wykazano też kluczową rolę metylotransferazy RNA podczas naprawy DNA. Białko to, ale też sam gen może stanowić nowy cel terapeutyczny. W odniesieniu do problemu możliwego zastosowania uzyskanych wyników do terapii, chciałbym zapytać doktorantkę na temat możliwości skojarzenia z użyciem oligonukleotydów antysensowych, gdyż w przypadku niektórych chorób znane cele terapeutyczne są hamowane z ich użyciem.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią pracy. Należy jednak wskazać niektóre punkty. W pracy używano terminu eppendorfy i probówki typu Eppendorf, jednak lepiej ujednolicić zapis. Odnośnie piśmiennictwa do metod dla części stosowano zestawy odczynnikowe i opisane tam procedury, do drugiej połowy metod warto podać piśmiennictwo nawet gdy zostały zmodyfikowane lub udoskonalone, wtedy łatwiej ustalić które metody są własne. W tabeli 4 i 5 informacje są niepełne, nie podano jakie jest pochodzenie II rzędowych przeciwciał anty królicze i anty mysie IgG, które przeciwciała są polia a które monoklonalne, to może mieć znaczenie w interpretacji wyników. Zamiast strippować membranę na str. 55, lepiej dysocjować lub usuwać przeciwciała jak w tytule punktu 3.4.5.4.

Rysunki są czytelne oprócz 10, 12, 13, 19, 21, 22, 36-38, które są zbyt małe. Na rys 30 warto poprawić C-NIC gdyż w tekście używa się K-NIC. Na str. 77 powtórzono numerację 4.2.2.

W podsumowaniu należy podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i wykonane, praca wnosi oryginalny wkład do wiedzy o liposomalnych kompleksach zewnątrzkomórkowego RNA, o ich potencjale antynowotworowym, o potencjale terapeutycznym metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 dostarczając informacji o nowych celach terapeutycznych i metodach leczenia. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje bardzo dobre opanowanie metod badań komórkowych, biochemicznych, technik biologii molekularnej.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Gabrieli Betlej zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 roku poz. 742). Wnioskuje do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Gabrieli Betlej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

