

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Błoniarz

w formie monografii pod tytułem:

**„Plejotropowe efekty braku funkcjonalnego genu *TRDMT1* w komórkach nowotworowych podczas hodowli długoterminowej oraz starzenia indukowanego chemioterapeutykami”.**

Choroby nowotworowe stanowią jedną z najliczniejszych przyczyn zgonów pacjentów, a odsetek ten wzrasta z roku na rok. Mimo stale rozwijających narzędzi diagnostycznych oraz różnorodnych terapii, problem podnoszącej się zachorowalności na nowotwory, procentowy udział nowotworów złośliwych i śmiertelności pacjentów onkologicznych nadal są wyzwaniem współczesnej medycyny i nauki. Liczne badania skupiają się wokół tematyki poszukiwania alternatywnych metod leczenia do chemio- i radio terapii. Metody te dobierane są ze względu na typ nowotworu oraz jego lokalizację i często prowadzą do całkowitego wyleczenia, jednak charakteryzuje się one nierzadko licznymi skutkami ubocznymi i poważnymi powikłaniami. Dlatego też, bardzo ważna stała konieczność ciągłego udoskonalania istniejących metod leczenia i poszukiwanie nowych rozwiązań pozwalających na terapię celowaną względem rodzaju nowotworu i dostosowaną do stanu pacjenta.

Podłoże powstawania zmian nowotworowych jest procesem bardzo złożonym i często długotrwałym. Wiele mechanizmów zachodzących w komórkach podczas onkogenezy nie jest jeszcze do końca poznanych. Wiadomo, że u podłoża przemianie komórki zdrowej w nowotworową leżą zaburzenia cyklu komórkowego i apoptozy, niestabilność genomu czy zmiany w interakcjach komórka-błona podstawna/środowisko. Prowadzi to do unieśmiertelnienia zmienionych chorobowo komórek, przeprogramowania ich metabolizmu i uzyskania swoistej autonomii skutkującej niekontrolowaną replikacją, wzrostem i czasem metastazą nowotworu. Problemem coraz bardziej powszechnym staje się również zjawisko

K. Ropka-Molik

wielolekowej oporności komórek nowotworowych oraz wpływ zastosowania chemioterapeutyków na wzrost potencjału metastatycznego tych komórek.

Poznanie procesów molekularnych determinujących procesy starzenia się komórek nowotworowych oraz etiologię ich lekooporności jest tematem bardzo aktualnym i oceniania rozprawa doktorska wpisuje się w ten właśnie obszar badań. Doktorantka stosując nowoczesne metody podjęła się próby określenia roli funkcjonalnego białka TRDMT1 w aspekcie zmian cech fenotypowych komórek nowotworach w tym podczas procesów starzenia indukowanych chemioterapeutykami. Autorka stosując kompleksowy warsztat metodyczny nakreśliła znaczenie białka TRDMT1 w komórkach różnych typów nowotworów zwracając szczególną uwagę na lekooporność, progresję oraz mechanizm starzenia się bądź też nieśmiertelności komórek nowotworowych. Otrzymane wyniki są niezwykle interesujące zarówno z punktu widzenia badań podstawowych (poznania molekularnych procesów zaczadzonych w komórkach nowotworowych) jak i z punktu widzenia zastosowania ich w przyszłości przy opracowaniu nowych strategii i celów terapeutycznych jako alternatywy do chemio – czy radioterapii.

Rozprawa doktorska Pani mgr. Dominika Błoniarz przygotowana została w języku polskim w postaci monografii. Część wyników opublikowano w czasopiśmie Aging-US (MEIN =140pkt; IF - 5,955) oraz zaprezentowano na międzynarodowej konferencji poświęconej badaniom nad procesami starzeniem oraz lekami. Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 204 strony i posiada układ typowy dla tego typu opracowań. Zapoznanie się z tematem badawczym oraz uzyskanymi wynikami ułatwiają załączone Tabele oraz liczne Rysunki, których ilość wynosi 40. Dysertacja została przygotowana starannie, z zachowaniem właściwych proporcji, a poszczególne rozdziały opisano w sposób przejrzysty i spójny.

## **Ocena merytoryczna pracy**

### ***Oryginalność tematyki i cel badań***

Tematyka procesów starzenia oraz wzrostu i rozwoju komórek nowotworowych w aspekcie zachodzących przemian molekularnych jest przedmiotem wielu badań i ciągle jest bardzo aktualna. Najnowsze doniesienia literaturowe wyznaczają dalsze kierunki badań i wskazują obszary najbardziej interesujące z punktu widzenia opracowania terapii zwalczania komórek nowotworowych. W badania własnych doktoranta starta się odpowiedzieć na pytania czy białko TRDMT1 pełni istotną rolę w metylacji oraz utrzymaniu stabilności tRNA, co znajduje przełożenie jego zaangażowania w regulację procesów starzenia się komórek

K. Rępa-Medzi  
2



nowotworowych i nabywania przez nich fenotypu lekoopornego. Autorka porusza temat bardzo aktualny i wielowątkowy, jednocześnie nakreślając możliwe wykorzystanie uzyskanych wyników w praktyce. Oryginalność i trafność podjętego w rozprawie problemu badawczego oceniam bardzo wysoko, interpretacja konieczności prowadzonych badań jest zasadna i mocno podparta danymi literaturowymi. Na uwagę zasługuje fakt, że prace finansowano ze środków zewnętrznych (projekt NCN OPUS13), co dodatkowo potwierdza aktualność i zasadność prowadzonych badań.

Na postawie wcześniej otrzymanych wyników oraz przeglądu literatury doktorantka postawiła hipotezę badawczą dotyczącą weryfikacji wpływu braku funkcjonalnego genu TRDMT1 na procesy molekularne i właściwości komórek nowotworowych w obecności chemioterapeutyków. Obszary badań autorka nakreśliła w sposób jasny i klarowny formułując je w postaci czterech celów szczegółowych:

1. określenie znaczenia braku funkcjonalnego genu TRDMT1 w komórkach czterech linii nowotworowych, w powstawaniu wtórnych aberracji chromosomowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zmiany w obrębie sekwencji telomerowych,
2. charakterystykę efektów stosowania inhibitorów metylotransferaz DNA/RNA oraz innych chemioterapeutyków w komórkach pozbawionych funkcjonalnego genu TRDMT1,
3. poznanie roli białka TRDMT1 w przebiegu starzenia indukowanego chemioterapią,
4. ocenę TRDMT1 jako potencjalnego celu molekularnego w terapii senolitycznej komórek nowotworowych.

Należy zwrócić uwagę, że do realizacji poszczególnych celów metody badawcze dobrano bardzo skrupulatnie i kompleksowo, a ich realizację opisano i uzasadniono w oparciu o literaturę z przedstawionego zakresu wiedzy.

W mojej opinii w hipotezie zawarto błędne sformułowanie w brzmieniu „brak funkcjonalnego genu metylotransferazy m5C RNA - *TRDMT1* prowadzi do deregulacji transkryptomu”. Nie do końca koresponduje to z zastosowanym warsztatem metodycznym, ponieważ nie analizowano zmienności ekspresji genów na poziomie transkryptomu tylko dla wybranych genów.

K. Ropka - Mdz

## **Metodyka badań**

Materiał badawczy w postaci linii komórkowych oraz zastosowane metody zostały opisane szczegółowo, w sposób wyczerpujący i spełniający kryteria opracowań naukowych. Na uwagę zasługuje fakt, że metody dobrano bardzo starannie i obejmują one szereg technik pozwalających na kompleksowe ujęcie tematu i zweryfikowanie postawionej hipotezy badawczej. W badaniach wykorzystano 4 rodzaje linii komórkowych (gruczolakoraka szyjki macicy, gruczolakoraka piersi, kostniakomięsaka i glejaka), a w każdej z nich wyróżniono grupę kontrolną transfekowaną plazmidem kontrolnym z niezmienionym poziomem badanego genu oraz grupę badawczą ze znokautowanym genem *TRDMT1*. Ponadto, nokaut badanego genu potwierdzano przed każdym kolejnym etapem badań. Uważam to za bardzo dobre podejście eksperymentalne, pozwalające na identyfikację potencjalnego wpływu nokautu genu *TRDMT1* na badane parametry oraz jednoczesnej minimalizacji ewentualnego wpływu transfekcji komórek czy samej procedury. Z kolei, zastosowanie różnorodnych linii nowotworowych pozwoliło doktorantce na wyeliminowanie efektu genetycznego i fenotypowego typu nowotworu i uwypuklenie skutków braku funkcjonalnego białka TRDMT1 w komórkach.

Doktorantka prawidłowo i adekwatnie do założonych celów dobrała metody badawcze. Zakres wykorzystywanych metod oceniam bardzo wysoko, wykonane analizy były bardzo pracochłonne, wymagające precyzji i skrupulatności. Obejmują one panel analiz z zakresu oceny żywotności, proliferacji, cyklu komórkowego, apoptozy czy stresu oksydacyjnego, poprzez analizy stopnia uszkodzeń DNA, długości telomerów a skończywszy na pomiarze poziomu ekspresji wybranych genów, białek oraz aktywności metylotransferaz i B-galaktozydazy. Dodatkowo, autorka zaplanowała i przeprowadziła analizy oznaczenia parametrów związanych ze starzeniem się komórek oraz interakcji białka TRDMT1 z odwrotną transkryptazą telomerazy TERT. Szczegółowy plan doświadczeń przedstawiono w Tabeli 3.11 pt. „Układy eksperymentalne”. Uważam, że to za bardzo dobre podejście umożliwiające posumowanie badań a następnie śledzenie i interpretację wyników. W mojej opinii Tabela ta powinna znaleźć się na początku rozdziału „Materiały i metody”, a nie na końcu, co usystematyzowało by bardzo szeroki opis wykonywanych metod. Dodatkowo, brakuje mi wyjaśnienia przy Tabeli 3.11 dlaczego linie komórkowe traktowane takim samym czynnikiem eksperymentalnym po różnych okresach inkubacji analizowano nieco innym zestawem metod. Pod Tabelą brakuje wyjaśnień skrótów zastosowanych związków, szczególnie, że nie są one obecne w również wykazie skrótów zamieszczonym na początku rozprawy.

*K. Pełca-Kocińska*



W podrozdziale „Izolacja RNA” brak jest informacji dotyczącej oceny stopnia degradacji RNA. Jest to bardzo istotna kwestia, która wpływa na wiarygodność i powtarzalność wyników. Autorka powinna określić jakość RNA wykorzystując elektroforezę agarozową lub podając współczynniki integracji podjednostek RIN. W podrozdziale dotyczącym oceny ekspresji genów metodą qPCR brakuje dokładnej ilości analizowanych genów. Doktorantka przedstawiła komercyjne zestawy wykorzystywane do analiz genów związanych z regulacją cyklu komórkowego oraz c-Myc i apoptozą, jednak dopiero na stronie producenta znajdujemy informację, że zawierają one kolejno 44 oraz 28 geny oraz kontrole endogenne. Taka informacja powinna znaleźć się w opisie, jak również proszę o doprecyzowanie ilości genów referencyjnych – w metodyce autorka wskazuje na 4 próby wykorzystane dla genów endogennych, podczas gdy do obliczeń zastosowano tylko jeden gen – *GUSB*. Podrozdział dotyczący analizy TERRA powinien zostać poszerzony o nazwę oprogramowania wykorzystanego do projektowania starterów oraz numery akcesyjne sekwencji, na podstawie których je otrzymano (Tabela 3.8). W wybranych podrozdziałach całej części metodycznej brakuje jasno sprecyzowanej informacji dotyczącej ilości wykonywanych powtórzeń technicznych. Takie dane powinny się znaleźć zarówno w aspekcie ilości analizowanych próbek dla danej linii nowotworowej vs czynnik eksperymentalny jak i poszczególnych analiz, szczególnie ilościowych, przy powtórzeniach każdej próbki.

Zastosowane podejście statystyczne oceniam jako prawidłowe i adekwatne do tego typu analiz, natomiast według mojej opinii, rozdział ten jest opisany bardzo ogólnie, wymaga pewnego doprecyzowania i poszerzenia. Brakuje informacji o wykorzystanych testach do analizy rozkładu danych, które potwierdzały by prawidłowość zastosowanego testu parametrycznego (jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA). Test ten możemy zastosować, gdy dane charakteryzują się rozkładem normalnym. Czy wykorzystano identyczny test dla każdego rodzaju badań?

K. Popka-Radik

## ***Wyniki badań oraz Dyskusja***

Doktorantka realizowała postawione cele badawcze skrupulatnie wykorzystując szereg metod oraz uzyskując bardzo obszerne wyniki, które opisano na 69 stronach. Wyniki przedawniono w sposób czytelny i przejrzysty na licznych rycinach i zdjęciach. Rozdział ten podzielono na podrozdziały dedykowane dla poszczególnych metod, co dodatkowo ułatwia zapoznanie się z licznymi wynikami.

Autorka wskazuje na istotną rolę białka TRDMT1 w regulacji cyklu komórkowego jednocześnie wykluczając jego znaczący wpływ na żywotność, potencjał proliferacyjny czy apoptozę komórek porównując linie komórkowe z funkcjonalnym genem *TRDMT1* oraz jego brakiem. Co ciekawe, doktorantka udowodniła, że brak funkcjonalnego genu *TRDMT1* modyfikuje wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę jednak w obecności nietoksycznych dawek wybranych chemioterapeutyków. Analogicznie spostrzeżenia uzyskano dla stanu równowagi redoks, który przy braku aktywnego genu *TRDMT1* i w obecności leków ulegał zaburzeniu. W liniach komórkowych reprezentujących nowotwory raka piersi i glejaka wykazano, że inaktywacja genu *TRDMT1* przy podawaniu określonych dawek leków prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Jest to bardzo istotny wynik wskazujący na możliwość wykorzystania inhibitorów badanego białka jako alternatywnej i skutecznej terapii zwalczania komórek nowotworowych.

Ponadto, wykazano, że białko TRDMT1 ma zdolność interakcji z telomerazą, a brak funkcjonalnego białka wpływa na zmiany w długości telomerów oraz regulację ekspresji genów warunkujących utrzymanie integralności telomerów. W ramach uzyskanych wyników wielokrotnie potwierdzono, że obecność aktywnego genu *TRDMT1* w komórkach nowotworowych jest kluczowa do regulacji procesu starzenia wywołanego lekami. Brak funkcjonalnego genu modulował między innymi stabilność genetyczną badanych komórek podczas starzenia oraz zachodzący w nich proces autofagii.

Uzyskane rezultaty doktorantka w sposób trafny i dojrzały przedyskutowała z aktualnymi pozycjami literatury. Rozdział Dyskusja jest bardzo obszerny i stanowi spójne opracowanie łączące uzyskane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi. Pozycje piśmiennictwa dobrano szczegółowo i obejmują one aż 346 anglojęzycznych pozycji z czego znacząca większość została wydana w ostatnich 10 latach. Autorka podkreśliła zasadność wyboru genu do badań oraz doboru wykorzystanego układu eksperymentalnego. Następnie, przedstawiła, jak kształtują się omawiane wyniki na tle światowych badań, uwypuklając jednocześnie ich możliwe zastosowanie w poszukiwaniu nowych, alternatywnych terapii do eliminacji

K. Rapka-Kolick



lekoopornych komórek nowotworowych. Należy podkreślić fakt, że prowadzone badania, w chwili rozpoczęcia, były pierwszymi tego typu analizami. W Dyskusji opisano inne badania dotyczące genu *TRDMT1* oraz wskazano na ich słabe i mocne strony. Niemal każda z uzyskanych grup wyników została przedyskutowana w aspekcie badanego typu nowotworu oraz rodzaju zastosowanego leku i jego dawki. Doktorantka weryfikuje postawioną hipotezę na tle wyników własnych, konfrontuje je z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów oraz wyciąga na tej podstawie wnioski. W podsumowaniu, doktorantka wyczerpująco analizuje uzyskane rezultaty i w połączeniu z dostępnymi danymi literaturowymi wskazuje na zaangażowanie genu *TRDMT1* w proces progresji nowotworów oraz lekooporność, jego możliwe zastosowanie jako biomarkera podczas rozwoju nowotworu i co najważniejsze, targetu w leczeniu onkologicznym. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki wskazują na duży potencjał ich zastosowania w praktyce i wskazują na konieczność kontynuowania badań w tym zakresie. Poziom naukowy Dyskusji oceniam bardzo wysoko.

### ***Wnioski***

Na podstawie uzyskanych wyników autorka synestetycznie sformułowała cztery wnioski w klarowny sposób wskazując na związek genu *TRDMT1* ze zmianami na poziomie molekularnym zachodzącymi w komórkach linii nowotworowych w obecności chemioterapeutyków. Wnioski wyciągnięto poprawnie i zgodnie z postawionymi celami.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia, które mają charakter natury ogólnej:

- uważam, że doktorantka powinna określić swój wkład merytoryczny i udział zaangażowania w publikacji zawierają część uzyskanych w ramach rozprawy doktorskiej wyników;

- sugeruje zmianę i ujednolicenie zapisu przy cytowaniach prac innych zespołów opisywanych w tekście, bardziej trafne wydaje się być określenie „zespół” niż „grupa” przykładowo „Badania przeprowadzone przez grupę Lewińskiej wykazały...”;

- należy ujednolicić zapis symbolu badanego genu – litery drukowane/ pisane;

- opisy tabel powinny znajdować się nad tabelami a wyjaśnienia skrótów pod nimi;

- należy ujednolicić zapis dla wykorzystywanych odczynników czasem podano producenta jednak nie wszędzie;

- należy ujednolicić zapis P vale (np. Rysunek 24, a wartości prezentowane w tekście);

*K. Ropka-Kowik*

- wykorzystane w badania ogólnodostępne bazy danych, strony internetowe czy narzędzie bioinformatyczne powinny zostać opatrzone w spisie Piśmiennictwa lub pod Rycinami datami dostępu do informacji. Ponadto, do wykorzystanych oprogramowań należy podać numer wersji oprogramowania.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią bardzo obszerne, ale jednocześnie spójne i kompleksowe opracowanie. Wnioski wyciągnięto poprawnie, zgodnie z uzyskanymi wynikami i stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie, a w dłuższej perspektywie posiadają duży potencjał aplikacyjny. Oryginalność poruszanej tematyki rozprawy doktorskiej oraz jej poziom naukowy ocenia bardzo wysoko. Wymienione uwagi nie umniejszają wartości przedstawionego osiągnięcia, a większość z nich ma charakter poprawek edytorskich.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska, wpisująca się w obszar dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauk biologicznych, spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 roku poz. 574) i wnoszę o dopuszczenie **mgr Dominikę Błoniarz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duży zakres zrealizowanych badań, dokładnie i skrupulatnie przeprowadzoną analizę wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ

*Katarzyna Ropka-Molik*