



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, 28.04.2023r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Błoniarz pt. „Plejotropowe efekty braku funkcjonalnego genu *TRDMT1* w komórkach nowotworowych podczas hodowli długoterminowej oraz starzenia indukowanego chemioterapeutykami” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Lewińskiej, prof. UR

Praca dotyczy badań nad molekularnymi mechanizmami metylacji RNA i fizjologicznymi efektami działania metylotransferaz, szczególnie udziału genu metylotransferazy m⁵C RNA *TRDMT1* w starzeniu komórkowym komórek nowotworowych podczas progresji i starzenia indukowanego chemioterapeutykami. Zadanie postawione do rozwiązania jest ważne z kilku powodów, mianowicie funkcje tego genu obejmują mechanizmy kontroli działania cząsteczek RNA, dotyczą więc podstawowych procesów komórkowych, a w praktyce wyniki mogą być pomocne w identyfikacji szlaków istotnych w progresji nowotworów i lekooporności. Stąd niezwykle istotne są badania które przybliżyłyby także ten aspekt poznania procesów w komórce. Tematyka ta jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół z Uniwersytetu Rzeszowskiego, ekspertów z dużym dorobkiem w tej problematyce i wypracowanym warsztatem badawczym. Dlatego podjęty problem jest aktualny, badania mają istotne znaczenie biologiczne. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów i metod, wyniki i dyskusję, wnioski oraz spis piśmiennictwa. Praca zawiera 204 strony maszynopisu wraz z 40 rysunkami i 15 tabelami oraz cytowanych 346 pozycji piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka wprowadza do tematyki, uzasadnia logicznie cel badań, omawia wpięrc metylotransferazy RNA, w szczególności tRNA, rRNA, mitochondrialnego RNA, następnie omawia mechanizm metylacji cytozyny w RNA i przedstawienia charakterystyki metylotransferazy *TRDMT1* i jej funkcji. Następnie przechodzi do omawiania zagadnień związanych ze starzeniem komórkowym w odniesieniu do zmian w epitranskryptomie oraz działania chemioterapeutyków. Cel badań autorka przedstawia w formie 4 zadań, mianowicie planuje określić znaczenie braku funkcjonalnego genu metylotransferazy

TRDMT1 w komórkach 4 linii nowotworowych, szczególnie zmian sekwencji telomerowych, zbadać wpływ inhibitorów tego enzymu na procesy w komórce, poznać jego rolę w starzeniu indukowanym chemioterapeutykami i ocenić czy może być celem terapeutycznym w terapii senolitycznej.

W części metodycznej autorka zestawiała używane materiały: odczynniki, przeciwciała, leki, bufory, zestawy odczynnikowe, materiały jednorazowego użytku, oprogramowanie, aparaturę. Następnie opisuje metody pracy z liniami komórkowymi (hodowli, analizy żywotności, proliferacji, cyklu komórkowego, apoptozy), metody badań białek (oznaczania stężenia, denaturacji, elektroforezy i blotingu, interakcji międzycząsteczkowych, detekcji immunofluorescencyjnej), analizy uszkodzeń DNA (test kometowy, mikrojądrowy), analizy ekspresji genów (izolację RNA, DNA, odwrotną transkrypcję, PCR, analizę długości telomerów, powtórzeń, metylacji RNA metodą ELISA), badania enzymów (telomerazy, metylotransferaz, galaktozydazy), obrazowania fluorescencyjnego markerów i na końcu opisuje analizę statystyczną. Metody są dobrze opisane, bardzo czytelnie przedstawiono opisy materiałów i metod, przez co rozdział i cała praca, jest logicznym, jednolitym wywoдем.

Badania prowadzono z użyciem 4 różnych linii ludzkich komórek nowotworowych, gruczolakoraka szyjki macicy HeLa, gruczolakoraka piersi MDA-MB-231, kostniakomięsaka U-2 OS i glejaka U-251 MG, celem uchwycenia wspólnych efektów braku białka TRDMT1. Używano komórki ze stabilnym nokautem genu *TRDMT1* i kontrolne transfekowane plazmidem z niezmienionym poziomem genu *TRDMT1*. Przeprowadzono charakterystykę komórek pod kątem żywotności, potencjału proliferacyjnego i wykazano liczne odstępstwa w fazach cyklu komórkowego w obrębie wszystkich badanych linii komórkowych porównując komórki z i bez badanego białka. Wykazano, że podczas kolejnych pasażów komórek nowotworowych brak białka TRDMT1 prowadzi do zmian w długościach telomerów, obniżenia aktywności telomerazy, zmianie ulega poziom telomerowych powtórzeń RNA TERRA. Białko TRDMT1 oddziałuje z telomerazą badanych komórek nowotworowych podczas stresu indukowanego doksorubicyną. Brak genu *TRDMT1* moduluje proces przyspieszonego starzenia komórkowego poprzez zmiany szlaków związanych m.in., z apoptozą, odpowiedzią na stres oksydacyjny, naprawą DNA zależną od RNA, autofagią i sekrecją czynników prozapalnych. Wyniki mają wartość podstawową, referencyjną w zakresie poznawania mechanizmów kontroli działania RNA.

W dyskusji autorka odnosi się do danych z piśmiennictwa, właściwie wykorzystanego, podsumowuje uzyskane wyniki, podejmuje wyjaśnienia wyników nieraz trudnych do

jednoznacznej oceny, gdyż efekty braku białka TRDMT1 nieraz były zróżnicowane odpowiednio dla danego nowotworu. Autorka interpretuje wyniki analiz telomerów tym, że TRDMT1 zapewnia stabilność sekwencji telomerowych i pomaga utrzymać integralność chromosomową, dlatego brak funkcjonalnego genu TRDMT1 prowadzi do istotnych zmian na poziomie genomu. Jego obecność jest istotna dla komórek nowotworowych, gdyż zapewnia utrzymanie określonej równowagi transkryptomicznej, uczestniczy w odpowiedzi na stres indukowany lekami. Tutaj nasuwa się pytanie do doktorantki czy metylacja tRNA przez metyltransferazy może mieć wpływ na funkcję pozarybosomalnego transferu reszt aminoacylowych z udziałem aatRNA transferaz, stosunkowo mało poznanych enzymów. Odpowiedź pozwoliłaby na zaproponowanie celu terapeutycznego lub ukierunkowanie badań w szczególności lekooporności bakterii. Należy podkreślić, że autorka wykorzystwała umiejętnie dostępne narzędzia metodologiczne w swoich badaniach, ostrożnie interpretuje wyniki, opierając się na wynikach własnych zadaje pytania i proponuje dalsze kierunki poszukiwań.

Uwagi krytyczne są nieliczne, dotyczą strony redakcyjnej i to zaledwie w kilku punktach. Czy używanie terminu potranskrypcyjne i posttranskrypcyjne jest celowe zależnie od kontekstu, a jeżeli oznacza to samo, to jestem za jednolitym nazewnictwem, tutaj za tym pierwszym określeniem. Odnośnie metod, należy podać, poza stosowanymi zestawami, odpowiednie piśmiennictwo (dla 8 metod), także przy modyfikacji metody. Podsumowując, należy podkreślić że praca jest wartościowa, dobrze zaplanowana i wykonana. Wyniki przedstawiają cenne dane, które stanowią podstawę do dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym. W pracy wykazano, że TRDMT1 jako nowy kluczowy czynnik molekularny warunkujący swoistą plastyczność genetyczną komórek nowotworowych, może być rozważany jako czynnik prognostyczny lub predykcyjny nowotworów, a także potencjalny cel terapeutyczny.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Błoniarz 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. 2022 poz. 574). Wnioskuje do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Dominiki Błoniarz 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.

PROF. DR HAB. ANDRZEJ GANIAN
Katedra Immunologii Chorób Zakaźnych
Immunologia