

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Jagody Barbary Adamczyk-Grochali pt. „Rola metylotransferazy DNMT2 w odpowiedzi na stres komórkowy oraz w regulacji starzenia komórkowego fibroblastów ssaczych”, w związku z powierzeniem przez Radę Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie obowiązku recenzenta

1. Znaczenie podjętych badań

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem dr hab. Tomasza Ząbka, prof. Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego i promotora pomocniczego dr hab. Anny Lewińskiej, prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego. Praca dotyczy określenia udziału metylotransferazy DNMT2 w procesie starzenia komórek oraz w reakcji na stres oksydacyjny w oparciu o analizę wybranych linii komórkowych ssaków i człowieka. Rozprawa powstała w wyniku realizacji projektu badawczego Iuventus PLUS. Podjęcie przez Doktorantkę takiej tematyki jest logiczną konsekwencją i rozwinięciem badań prowadzonych przez promotora rozprawy i promotora pomocniczego, dotyczących procesów starzenia komórek. Rozprawa została przygotowana z zastosowaniem standardowych i najnowocześniejszych metod biologii molekularnej i proteomiki, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników.

2. Ocena pracy

Rozprawa doktorska napisana jest w układzie zalecanym dla prac promocyjnych, zawiera spis treści, wykaz wybranych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. Już na wstępie można zorientować się, że rozprawa przygotowana jest bardzo starannie i jednocześnie ciekawie, i że obejmuje interesujące zagadnienia i wyniki. Praca należy do obszernych, liczy wraz z piśmiennictwem **171 stron**, co nie ułatwiło pracy recenzentowi.

Wykaz wybranych skrótów obejmuje **siedem stron**, co sugeruje, że pracy nie będzie czytało się łatwo. Należy zgodzić się z Autorką, że lepiej rozszerzyć wykaz, niż pominąć skróty. Znalazłem w wykazie tylko dwa drobne błędy.

Streszczenie zostało przygotowane na **dwóch stronach** w sposób prawidłowy. Jedyna uwaga to sformułowanie „manipulacja genetyczna”, lepiej stosować „modyfikacja genetyczna”. Termin „manipulacja” funkcjonuje w Polsce jako działanie negatywne. Ponadto pisownia nazw genów powinna być kursywą a białek normalną czcionką.

W obszernym **Wstępie** liczącym **34 strony** Autorka zajmuje się procesem starzenia wskazując, że występuje grupa chorób człowieka nierozdzielnie związana ze starzeniem, np. choroby nowotworowe. Wskazuje, że pojawiają się nowe możliwości regulacji, według Autorki, kontroli, ścieżek sygnałowych i biochemicznych. Następnie opisuje charakterystyczne cechy starzenia, które wspiera poprawną ryciną nr 1.

Ważnym problemem rozwiniętym przez Doktorantkę jest opis czynników, które mogą indukować proces starzenia.

W rozdziale 2 Wstępu Autorka rozważa usuwanie komórek starzejących jako cel terapeutyczny. Ostatnia część Wstępu poświęcona została epigenetycznym mechanizmom regulacji ekspresji genów, skupiając się na przedstawieniu metylotransferazy 2 DNMT2, jako białka o największej homologii międzygatunkowej.

Wstęp jest ilustrowany niezbędnymi rycinami umożliwiającymi lepsze zrozumienie przedstawianych informacji i w pełni wprowadza w zagadnienia pracy doktorskiej. Hierarchia rozdziałów we wstępie jest zbyt rozbudowana, Autorka wymieniła aż 5 poziomów. Wstęp oceniam bardzo wysoko.

Cel i założenia pracy zajmują **trzy strony**. Autorka zakłada trzy cele, które realizowane były w dwóch układach eksperymentalnych na liniach uniesmiertnionych komórek zarodkowych fibroblastów myszy i prawidłowych fibroblastach człowieka w oparciu o dwie strategie wyciszania genu *DNMT2*. Doktorantka założyła również występowanie warunków stresu oraz badań w standardowych warunkach. Ten rozdział uzupełniają cele szczegółowe w liczbie ośmiu, rycina przedstawiająca zakres zaplanowanych prac oraz tabela zestawiająca układ eksperymentalny, umożliwiając pełne spojrzenie na zakres prac. Cel pracy uznaję za ambitny i nowatorski, wymagający pracy eksperckiej zarówno przy uzyskiwaniu jak i opracowywaniu wyników.

Materiały i metody przedstawiono na **32 stronach**. Doktorantka w części dotyczącej materiałów wymienia stosowane odczynniki, enzymy, zestawy komercyjne, bufony i roztwory, materiały do transfekcji, odczynniki do hodowli komórkowych, sprzęt i materiały jednorazowe, przeciwciała oraz programy. W metodach informuje o hodowlach komórkowych linii NIH3T3 myszy, WI-38 fibroblastów płuc człowieka oraz linii BJ - prawidłowych fibroblastów skóry człowieka. Komórki pochodziły z *American Type Culture Collection*. Autorka podaje szczegóły hodowli, wyciszenia genu *DNMT2* z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9 dla linii NIH3T3 oraz technologią siRNA dla linii WI-38 i BJ. Aktywność metaboliczna komórek oceniona została testem MTT. Przedstawia następnie sposób oceny względnego poziomu ekspresji genu *DNMT2* na podstawie analizy ilościowej RNA. Duża część metod poświęcona została opisom linii komórkowych obejmujących: ocenę apoptotycznej śmierci z zastosowaniem aneksyny V i 7-aminoaktynomycyny (7-AAD), analizę cyklu komórkowego, badanie podziałów komórek, ocenę aktywności SA-β-

galaktozydazy, ocenę parametrów stresu oksydacyjnego oraz ocenę niestabilności genetycznej. Metody uzupełniają badania białek z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych immunofluorescencyjnie, analiza typu Western blot, jak również ocena długości telomerów metodą hybrydyzacji Southerna, analiza aktywności telomerazy, pomiar poziomu metylacji DNA i RNA oraz analiza statystyczna. Rozdział Materiały i metody oceniam wysoko, ponieważ umożliwia recenzentowi i czytelnikowi dokładne zapoznanie się ze stosowanymi procedurami i odczynnikami.

Wyniki przedstawione zostały na **38 stronach**, są bogato ilustrowane rycinami i opisują kolejne etapy realizacji rozprawy. Wyniki podzielone są na dwie części, pierwsza dotyczy analizy wpływu wyciszenia genu *Dnmt2* w zarodkowych fibroblastach myszy linii NIH3T3, druga obniżenia poziomu DNMT2 w liniach WI-38 i BJ fibroblastów człowieka.

W pierwszej części Doktorantka opisuje uzyskanie stabilnych linii komórek NIH3T3 z wyciszoną aktywnością genu *Dnmt2* w 50% (Dnmt2-NIC 1, klon 1), z całkowicie wyciszonym genem (Dnmt2-NIC 2, klon 2) oraz linią kontrolną (K-NIC), transfekowaną plazmidem kontrolnym. Doktorantka wykazała z zastosowaniem testu MTT, że nadtlenek wodoru działa cytotoksycznie w stosunku do wszystkich linii komórkowych, przy czym komórki z wyciszonym genem *Dnmt2* są bardziej wrażliwe na czynnik stresujący. Wzrastające stężenie nadtlenu wodoru prowadzi do nasilenia obserwowanych efektów. Do dalszych prac Doktorantka wybrała 200 μ M stężenie czynnika stresującego. Inkubacja z nadtlaniem wodoru prowadziła do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie G2/M dla wszystkich linii fibroblastów myszy. Doktorantka wykazała wzrost poziomu białek p21 i p53 w warunkach stresu, po 24 godzinach i 7 dniach od indukcji stresu, przy czym podwyższony poziom tych białek obserwowano również w liniach z wyciszonym genem *Dnmt2* nie poddanych działaniu stresu. Wyciszenie genu *Dnmt2* prowadzi także do indukcji starzenia komórek określanego poprzez ocenę aktywności enzymu lizosomalnego β -galaktozydazy (SA- β -Gal). Co ciekawe, warunki stresowe przyspieszają starzenie komórek kontrolnych, podczas gdy w komórkach z wyciszoną aktywnością genu *Dnmt2* dochodzi do obniżenia aktywności tego enzymu i ograniczenia procesu starzenia (odpowiednio o 36% i 49%). Wyciszenie genu *Dnmt2* prowadzi do skracania telomerów w komórkach linii NIH3T3, które było powiązane ze spadkiem aktywności telomerazy. Poziom obniżenia aktywności telomerazy Doktorantka oceniła na 17% (klon 1). Natomiast w klonie 2 aktywność telomerazy była minimalna. W części dotyczącej niestabilności genetycznej komórek linii NIH3T3, Autorka oceniła zmiany w DNA testem kometowym oraz testem mikrojądrowym. Obserwowany kształt komet wskazał na silne uszkodzenia DNA. Doktorantka zaobserwowała również, że wyciszenie *Dnmt2* prowadzi do hipermetylacji DNA (43% klon 1, 86% klon 2) oraz wzrostu ekspresji badanych metylotransferaz DNA. Ponadto w klonie 2 wystąpił najwyższy poziom metylotransferazy Dnmt3b. Działanie czynnikiem stresującym prowadziło do wzrostu poziomu ekspresji

metylotransferaz DNA we wszystkich liniach NIH3T3. W klonie 2 zaobserwowano ponadto 2-krotny wzrost poziomu metylacji ogólnej RNA w stosunku do komórek kontrolnych.

Uzyskane wyniki wskazujące na wpływ wyciszenia genu *Dnmt2* na wzrost wrażliwości zarodkowych fibroblastów myszy na stres i indukcję w warunkach kontrolnych starzenia, Doktorantka potwierdziła na dwóch liniach komórek człowieka WI-38 i BJ. Obniżenie poziomu DNMT2 uzyskała poprzez stosowanie technologii siRNA. We wszystkich liniach fibroblastów człowieka w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu wykazano istotnie statystyczne zmiany w ekspresji mRNA *DNMT2*. Najniższy poziom DNMT2 wykazano dla linii WI-38 w warunkach stresu. Dla tej linii transfekcja kontrolnym siRNA prowadziła do obniżenia poziomu białka DNMT2, a warunki stresu nasilały ten efekt. W przypadku linii BJ efekt wyciszenia obserwowano nie po 24 godzinach, a dopiero po 2 i 7 dniach. Co ciekawe, Doktorantka zaobserwowała wzrost ekspresji *DNMT2* po transfekcji kontrolnym siRNA (metoda qRT-PCR), co może być związane z sugestią rozpoznawania siRNA przez komórkę jako wirusowego RNA. Zjawisko to zostało potwierdzone poprzez ocenę poziomu interferonu β , wykazując najwyższy jego poziom w fibroblastach linii WI-38 transfekowanych siRNA-DNMT2. Doktorantka wykazała, że obniżenie poziomu *DNMT2* inicjuje śmierć apoptotyczną w warunkach kontrolnych, efekt ten obserwowano również w warunkach stresu z zastosowaniem 100 μ M nadtlenu wodoru. Bardziej wrażliwe okazały się komórki linii WI-38. Wyciszenie aktywności genu *DNMT2* w warunkach kontrolnych nie jest skorelowane z zatrzymaniem cyklu podziałowego komórek, natomiast dodanie czynnika stresującego zatrzymuje cykl w fazie G2/M we wszystkich liniach komórkowych. Ponadto obniżenie poziomu DNMT2 prowadzi do obniżenia liczby podziałów komórek, a nadtlenek wodoru wzmacnia ten efekt. Doktorantka obserwowała podwyższony poziom białek p53, p21 i p16 w komórkach z wyciszonym *DNMT2* w warunkach kontrolnych oraz stresu. Obniżenie poziomu *DNMT2* prowadzi do starzenia fibroblastów człowieka w warunkach kontrolnych, podobnie jak w przypadku fibroblastów myszy. Podanie 100 μ M nadtlenu wodoru indukuje przyspieszone starzenie fibroblastów człowieka, przy czym wyciszenie genu *DNMT2* nie wzmacniało procesu starzenia, a nawet nieznacznie obniżało. Doktorantka zaobserwowała ponadto wzrost poziomu białka DNMT2 w starzejących się komórkach, co korelowało ze zwiększoną ekspresją białka p21. Obniżenie poziomu *DNMT2* jest związane z wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu w warunkach kontrolnych w fibroblastach człowieka i myszy. Ponadto zastosowanie warunków stresu z reguły prowadziło do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu. Doktorantka zaobserwowała również nieodwracalną karbonylację białek. Analiza białek szoku termicznego HSP70 i HSP90 wykazała wzrost poziomu białka HSP70 w warunkach stresu zależny od wyciszenia genu *DNMT2*, a białka szoku termicznego gromadzą się w jądrach komórkowych fibroblastów transfekowanych siRNA. Obniżenie poziomu *DNMT2* zwiększa niestabilność genetyczną w fibroblastach

człowieka, a działanie nadtlakiem wodoru nie prowadzi do zwiększenia niestabilności. Doktorantka wykazała wzrost poziomu białka DNMT1 w fibroblastach człowieka z wyciszonym genem *DNMT2* w warunkach kontrolnych. Dodatkowo w komórkach linii BJ zaobserwowała wzrost poziomu białek DNMT3A i DNMT3B. W warunkach kontrolnych nie wystąpiły zmiany poziomu metylacji ogólnej zależne od obniżenia poziomu DNMT2, w przeciwieństwie do zmian obserwowanych po podaniu nadtlaku wodoru. Doktorantka nie zaobserwowała ponadto istotnych statystycznie zmian dotyczących metylacji ogólnej RNA.

Sposób przedstawienia wyników uważam za bardzo dobry, Autorka przedstawia problem badawczy, po czym przedstawia wyniki na rycinach. W ten sposób zapoznaje czytelnika na bieżąco z najważniejszymi osiągnięciami. Należy dodać, że znaczna większość rycin przedstawia wyniki bardzo dobrej jakości. Zwracam również uwagę na poprawne opisy rycin. Podsumowując rozdział **Wyniki** uważam, że badania zostały zrealizowane zgodnie z celem pracy i bardzo kompetentnie przedstawione. Zauważyć można duży nakład pracy Autorki, co doprowadziło do uzyskania wysokiej jakości dokumentacji i oceny statystycznej.

W **Dyskusji** przedstawionej na **12 stronach**, Doktorantka umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki w odniesieniu do danych piśmiennictwa, poczynając od ustosunkowania się do procesu starzenia i udziału zmian epigenetycznych w jego regulacji poprzez zwrócenie uwagi na metylotransferazę 2 (DNMT2), wskazując jednocześnie na bardzo nieliczne dostępne informacje. Następnie uzasadnia wybór dwóch typów komórek ssaków – myszy i człowieka dla wskazania uniwersalności badanych procesów oraz wybór warunków doświadczalnych. Potwierdza udział metylotransferazy w regulacji starzenia komórek ssaków. Dyskutuje regulację przez poziom aktywności DNMT2 białek szoku termicznego czy możliwość zaburzenia wewnątrzkomórkowej równowagi redoks. Zwraca uwagę na skracanie telomerów związane z obniżeniem aktywności telomerazy w komórkach z wyciszonym genem *Dnmt2*. Dyskutuje też metylację na poziomie RNA jako jeden z mechanizmów ochrony w warunkach stresu przed degradacją RNA. Odnosi się również do nieoczekiwanej indukcji przez siRNA w komórkach kontrolnych odpowiedzi przeciwwirusowej z udziałem DNMT2. Wskazuje na DNMT2 jako nowy czynnik regulujący długość życia fibroblastów człowieka. Szeroko dyskutuje wpływ wyciszenia DNMT2 na zmiany epigenetyczne związane z regulacją procesu starzenia. Całość podsumowuje ryciną 42, kończącą ten rozdział.

W podsumowaniu uważam, że dyskusja napisana jest kompetentnie i Doktorantka zachowała w niej kolejność, która odpowiada celom pracy i uzyskanym wynikom. Dyskusja wydaje się być zbyt zwarta, jednak satysfakcjonuje recenzenta. Być może wynikało to z obszerności poruszanych zagadnień oraz przygotowania rozprawy w powiązaniu z publikacjami.

Wnioski Doktorantka zamieściła na **1 stronie**, w 12 krótkich punktach, przedstawiając najważniejsze osiągnięcia rozprawy. Niektóre z wniosków mogłyby być

zgrupowane w jeden, np. wnioski dotyczące obniżenia poziomu DNMT2, a także porównujące wyniki dotyczące fibroblastów myszy i człowieka.

Piśmiennictwo zebrano na **32 stronach**, jest najliczniejsze w recenzowanych przeze mnie pracach, liczy 549 pozycji. Trzeba oddać, że są to prace głównie z obecnego stulecia, a więc stosunkowo nowe. Jeśli Autorka zapoznała się z treścią tak licznych publikacji to chwala Jej, bo na pewno bardzo rozszerzyła swoją wiedzę.

Pytania, które nasunęły się po przeczytaniu rozprawy są następujące: 1) Którą z cech starzenia można określić za najważniejszą? 2) Jaki jest udział zmian epigenetycznych w starzeniu organizmu? 3) Dlaczego zastosowano w hodowlach komórkowych myszy nadtlenek wodoru o stężeniu 200 μM , podczas gdy w hodowlach fibroblastów człowieka o stężeniu 100 μM ? 4) Czy można porównywać wyciszenie genu *DNMT2* uzyskane z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9 i siRNA?

Pod względem edytorskim, rozprawa została przygotowana bardzo dobrze, znalazłem jedynie bardzo drobne błędy nie wpływające na całość wysokiej oceny rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Doktorantka porusza w rozprawie bardzo ciekawy i jednocześnie trudny temat. Jako recenzent odniosłem bardzo pozytywne wrażenie z lektury rozprawy doktorskiej. Mam również pozytywną ocenę sposobu przedstawiania wyników.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że Autorka przygotowała bardzo ciekawą rozprawę, zgodną z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Jagody Barbary Adamczyk-Grochali do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wnikliwą analizę wpływu wyciszenia genu metylotransferazy *DNMT2* na procesy starzenia komórek oraz reakcji na stres, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym dzięki regulacji długości telomerów i poziomu wolnych rodników tlenu, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Prof. dr hab. Ryszard Słomski

Poznań, 27.06.2018 r.

e-mail slomski@up.poznan.pl, <http://www.up.poznan.pl/~slomski/>