

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Jagody Barbary Adamczyk-Grochali

**pt.: „Rola metylotransferazy DNMT2 w odpowiedzi na stres oraz w regulacji
starzenia komórkowego fibroblastów ssaczy”**

53 lata temu L. Hayflick dokonał przełomowego odkrycia procesu limitowania proliferacji ludzkich fibroblastów.¹ Zatrzymanie podziałów komórkowych nazwano limitem Hayflicka i powiązano z brakiem ekspresji i aktywności telomerazy.² W następnych latach odkryto proces starzenia komórkowego zależny od uszkodzeń DNA w regionach nietelomerowych.³ Linie komórkowe wyprowadzone z myszy laboratoryjnych wykazywały aktywność telomerazy i obecność długich telomerów i równocześnie ujawniały związane z procesem starzenia – ograniczenie proliferacji i akumulacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA w standardowych warunkach hodowli komórkowej (20% O₂, 5% CO₂, 37°C).⁴

¹ Exp Cell Res. 1965 Mar;37:614-36.

The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.

Hayflick L.

² Nature. 2003 Nov 13;426(6963):194-8. Epub 2003 Nov 5.

A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.

d'Adda di Fagagna F1, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP.

³ Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):729-40.

Cellular senescence: when bad things happen to good cells.

Campisi J1, d'Adda di Fagagna F.

⁴ Nat Cell Biol. 2003 Aug;5(8):741-7.

Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts.

Parrinello S1, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J.

Modelowy organizm *Drosophila melanogaster* wykazuje aktywność metylotransferazy DNA 2 (DNMT2) regulującej proces starzenia organizmu związany z opornością na stres oksydacyjny.⁵

Kowalencyjna chemiczna modyfikacja kwasów nukleinowych wydaje się odgrywać fundamentalną rolę w regulowaniu biologicznych funkcji DNA i RNA.⁶

Badania ostatnich lat ujawniają znaczenie metylacji DNA jako kluczowego elementu regulacji epigenetycznej.⁷

DNMT2 jest enzymem wykazującym powinowactwo do dwóch substratów, katalizując specyficzną metylację tRNA jak i DNA genomowego. Aktywność metylotransferazy wobec tRNA jest wymagana do prawidłowej syntezy polipeptydów w trakcie hematopoezy.⁸

Mysi DNMT2 jest białkiem zbudowanym z 415 aminokwasów zawierającym charakterystyczny motyw sekwencyjny cytozyny-5 – metylotransferazy DNA.⁹ Nie wykazując aktywności wobec genomowego DNA ujawnia aktywność metylotransferazy wobec tRNA.¹⁰

⁵ J Biol Chem. 2005 Jan 14;280(2):861-4. Epub 2004 Nov 8.

DNA methyltransferase gene dDnmt2 and longevity of *Drosophila*.

Lin MJ1, Tang LY, Reddy MN, Shen CK.

⁶ Genes Dev. 2010 Aug 1;24(15):1590-5. doi: 10.1101/gad.586710.

RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage.

Schaefer M1, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusbürger M, Helm M, Lyko F.

⁷ Trends Biochem Sci. 2006 Feb;31(2):89-97. Epub 2006 Jan 5.

Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.

Klose RJ1, Bird AP.

⁸ EMBO J. 2015 Sep 14;34(18):2350-62. doi: 10.15252/embj.201591382. Epub 2015 Aug 13.

The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis.

Tuorto F1, Herbst F2, Alerasool N1, Bender S1, Popp O3, Federico G4, Reitter S5, Liebers R1, Stoecklin G5, Gröne HJ4, Dittmar G3, Glimm H2, Lyko F6.

⁹ Hum Mol Genet. 1998 Feb;7(2):279-84.

A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast.

Yoder JA1, Bestor TH.

¹⁰ Nucleic Acids Res. 2010 Mar;38(5):1415-30. doi: 10.1093/nar/gkp1117. Epub 2009 Dec 8.

5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions.

Motorin Y1, Lyko F, Helm M.

Celem przedstawionej do oceny dysertacji jest weryfikacja hipotezy odnośnie istotnej roli metylotransferazy DNMT2 w stresie komórkowym i regulacji starzenia komórkowego fibroblastów ssaczych *in Vitro*. Z uwagi na brak doniesień literaturowych na temat roli ssaczego enzymu cel pracy wnosi charakter innowacyjności i wpisuje się w najbardziej interesujące zagadnienia współczesnej biologii i medycyny – regulacja procesu starzenia.

Przedstawiona do oceny rozprawa mgr Jagody Barbary Adamczyk-Grochali. pt.: „Rola metylotransferazy DNMT2 w odpowiedzi na stres oraz w regulacji starzenia komórkowego fibroblastów ssaczych” jest oryginalną pracą doświadczalną poświęconą nowym aspektom molekularnym procesu starzenia komórkowego.

Rozprawa zawiera 171 stron tekstu, w tym 42 ryciny, 5 tabel oraz 549 pozycji piśmiennictwa. Na uznanie zasługuje schemat na str. 137 podsumowujący regulacyjną rolę DNMT2 w odpowiedzi na stres komórkowy.

Struktura całości tekstu jest typowa dla rozpraw doktorskich. Obszerny wstęp rozprawy poprzedzony jest wykazem używanych skrótów i spisem treści. Kolejne rozdziały obejmują streszczenie w języku polskim i angielskim, cele pracy, materiały i metody, wyniki oraz wynikającą z nich dyskusję, która prowadzi do wniosków końcowych ujętych w podsumowaniu.

Wymaga szczególnego podkreślenia iż konkluzje wyciągnięto w sposób niezwykle zwięzły, klarowny i ostrożny.

Wstęp pracy, podzielony na 3 główne podrozdziały, przedstawia współczesny stan wiedzy na temat mechanizmów starzenia komórkowego i organizmów, eliminowania starych komórek jako cel terapeutyczny, oraz roli DNMT2 .

Cel prezentowanej rozprawy został rozbity na 3 odrębne zadania badawcze,

- Zbadanie roli metylotransferazy DNMT2 w regulacji procesu starzenia i komórkowej odpowiedzi na stres w fibroblastach ssaczych
- Określenie mechanizmów molekularnych przez które DNMT2 wpływa i reguluje starzenie komórkowe
- Identyfikacja ścieżek sygnalizacyjnych regulujących cykl komórkowy, w których uczestniczy DNMT2

Tabela 2-ga przedstawia szczegółową analizę układów eksperymentalnych zastosowanych przez Doktorantkę

Doktorantka przeprowadziła szereg doświadczeń w których oceniała wpływ wyciszenia DNMT2 na starzenie komórek fibroblastów mysich (NIH3T3) oraz ludzkich (WI-38, BJ) w warunkach standardowych oraz stresu indukowanego nadtlaniem wodoru.

Poddała ocenie następujące parametry:

Cykl komórkowy, aktywność metaboliczną komórek, starzenie komórkowe, apoptozę długość telomerów. Aktywność telomerazy, stres oksydacyjny oraz uszkodzenia DNA. Badała również zmiany epigenetyczne, tj, metylację DNA i RNA oraz ekspresję metylotransferaz DNA. Otrzymane wyniki doświadczeń pozwoliły na charakterystykę i porównanie fibroblastów z wyciszonym DNMT2 z komórkami niemodyfikowanymi.

Zastosowane metody wydają się być adekwatne do postawionych celów badawczych, świadczą o dobrym opanowaniu warsztatu naukowego. Na podkreślenie zasługuje iż praca powstała we współpracy między doświadczonymi ośrodkami badawczymi Lublina i Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego (Pracownia Pana Prof. Macieja Wnuka)

Zastosowane metody statystyczne umożliwiły wiarygodną ocenę uzyskanych wyników.

Doktorantka wykazała zdolność modulowania starzenia fibroblastów ssaczych przez metylotransferazy DNMT2. Dodatkowo uzyskała dowody na zaangażowanie tego enzymu w komórkową odpowiedź na stres indukowany nadtlaniem wodoru. W linii mysich fibroblastów stabilne wyciszenie DNMT2 na drodze CRISPR/Cas9 doprowadziło do obniżenia aktywności telomerazy i skracania telomerów. Zaobserwowała zależne od wyciszenia DNMT2 zaburzenie równowagi redox w komórkach wyrażony wzrostem poziomu karbonylacji białek. Dodatkowo wyciszenie tego enzymu doprowadziło do wzrostu poziomu uszkodzeń DNA i zwiększenia ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego tj. p21, p53.

W liniach ludzkich fibroblastów WI-38 oraz BJ przejściowe obniżenie poziomu DNMT2 za pomocą technologii siRNA skutkowało wzrostem poziomu RFT, uszkodzeń DNA i zwiększoną ekspresją inhibitorów cyklu komórkowego (p16, p21, p53).

Zmiana poziomu DNMT2 skutkowała zahamowaniem proliferacji, niestabilnością genetyczną, oraz stresem oksydacyjnym indukującym karbonylację białek. Powyższe efekty promowały starzenie komórkowe i apoptozę ludzkich fibroblastów. Nie wykazano aby nadtlenek wodoru wzmacniał proces starzenia ludzkich fibroblastów z obniżonym poziomem DNMT2. Starzenie replikacyjne fibroblastów ssaczych skutkowało wzrostem poziomu DNMT2, a białko wykazywało lokalizację cytoplazmatyczną. Uzyskane w ten sposób ciekawe wyniki są w opinii recenzenta pierwszym tego typu kompleksowym badaniem wykazującym modulacyjną rolę ludzkiej i mysiej metylotransferazy DNA w procesie starzenia jak i w odpowiedzi na stres komórkowy fibroblastów ssaczych.

Doktorantka postuluje tezę, iż modyfikowanie poziomu DNMT2, które prowadzi do zaburzeń struktury telomerów, obniżenie aktywności telomerazy, hamowania proliferacji, i indukowania śmierci apoptotycznej starzejących się komórek może być potencjalną strategią przeciwstarzeniową (działanie senilolityczne) i przeciwnowotworową. Recenzent z satysfakcją zauważa przytomną uwagę Doktorantki, iż tak odważna teza wymaga dalszych dowodów eksperymentalnych *in Vivo*.

Do przykrych obowiązków recenzenta należy analiza błędów i uchybień dysertacji. Na szczęście recenzent nie zauważył zbyt wielu przewinień.

W opinii recenzenta interesującego się molekularnymi aspektami stresu oksydacyjnego zastosowanie modelu komórkowego z nadtlenkiem wodoru, bez chemicznej analizy medium komórkowego jest nie do końca uprawnione. Recenzent nie mógłby szybko powtórzyć eksperymentu ze względu na brak dokładnego opisu użytej pożywki.¹¹ Wątpliwości dotyczą, m.in. obecności kw. pirogronowego, znanego neutralizatora H₂O₂, w składzie medium.

Doktorantka użyła w swoich badaniach fibroblastów. Jako że starzenie człowieka dotyczy wielu organów, m.in. centralnego układu nerwowego. Byłoby bardzo ciekawe wykazanie roli DNMT2 w tym procesie.^{12, 13}

Powyższe uwagi odnośnie uchybień Dysertacji mają na celu ukierunkowanie dociekań Doktorantki na poszerzenie bazy wyników z zakresu starzenia całego organizmu człowieka.

Powyższe uchybienia rozprawy i uwagi recenzenta w niczym nie obniżają zasadniczej wartości recenzowanej pracy, która zawiera niekwestionowany element nowości naukowej. Praca napisana jest przystępnie co sprawiło iż czytałem ją z wielką przyjemnością. W podsumowaniu chciałbym zaznaczyć i przedstawić mi do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka wykazała dużą dojrzałość w stawianiu pytań i poszukiwaniu na nie odpowiedzi, poprzez umiejętne zaplanowanie badań, zastosowanie odpowiednich metod, wnikliwą analizę wyników i wyważoną ostrożną, bardzo merytoryczną

¹¹ In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2009 May-Jun;45(5-6):226-33. doi: 10.1007/s11626-008-9168-z. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals.

Babich H1, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG.

¹² Biogerontology. 2014 Dec;15(6):643-60. doi: 10.1007/s10522-014-9532-1. Epub 2014 Oct 11.

Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders?

Tan FC1, Hutchison ER, Eitan E, Mattson MP.

¹³ Aging Cell. 2012 Dec;11(6):996-1004. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x. Epub 2012 Sep 12.

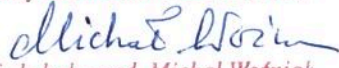
Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. Jurk D1, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tzolou A, Gonos ES, Thrasivoulou C, Saffrey MJ, Cameron K, von Zglinicki T.

i właściwie prowadzoną dyskusję. Wykazała się umiejętności korzystania z aktualnych danych literatury fachowej oraz zdolnością formułowania logicznych wniosków. Mając powyższe na uwadze stwierdzam iż recenzowana praca spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z tym proszę Radę Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Jagody Barbary Adamczyk-Grochali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość pracy, opublikowanie znacznej części wyników w czasopismach z listy filadelfijskiej **wnoszę o wyróżnienie nagrodą rozprawy doktorskiej.**

GDĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1
tel. (+48 58) 349 14 50
fax (+48 58) 349 14 56

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej

prof. dr hab. med. Michał Woźniak