

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723628
fax.: 042 2723630

e-mail:
jboncela@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

Dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN

Łódź, 7 sierpnia 2024 r.

Pracownia Sygnalizacji Komórkowej

Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr. Piotra Ciesielskiego

pt. Dioksygenazy TET i O-GlcNAc transferaza w progresji nowotworów endometrium

Choroby nowotworowe to narastający problem zdrowotny, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Pomimo dużego postępu w diagnostyce i leczeniu nowotworów, wciąż prowadzi się intensywnie badania ukierunkowane na identyfikację wiarygodnych czynników, które mogłyby stanowić markery wczesnych zmian nowotworowych lub też być celem skutecznej terapii. Tematyka rozprawy Pana mgr. Piotra Ciesielskiego niewątpliwie wpisuje się w ten ważny obszar badawczy.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Anny Krześlak w ramach kształcenia w Studium Doktoranckim Biochemiczno-Biofizycznym na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem pomocniczym był dr Paweł Józwiak. Rozprawa jest częściowo wynikiem realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Preludium 10).

Rozprawa doktorska Pana mgr. Piotra Ciesielskiego została przygotowana na podstawie dwóch opublikowanych prac oryginalnych oraz spójnych tematycznie nie opublikowanych wyników. Kopie publikacji wraz oświadczeniami współautorów zostały włączone do rozprawy doktorskiej. Wszystkie wyniki badań zamieszczone w dwóch publikacjach eksperymentalnych i wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie *Tumor Biology* lub *International Journal of Molecular Science*. Pan mgr Piotr Ciesielski jest pierwszym autorem w w/w publikacjach. Dołączone oświadczenia współautorów potwierdzają wiodącą rolę Doktoranta w przygotowaniu koncepcji badań, ich realizacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu do publikacji. Fakt ten potwierdza, że Pan mgr Piotr Ciesielski posiada ustawową umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, obejmuje łącznie 94 strony. Do rozprawy dołączono 5 załączników, załącznik 1-3 to opublikowane prace eksperymentalne z uzupełnieniami,

załącznik 4 – wyniki nie umieszczone w publikacjach i załącznik 5 – oświadczenia współautorów. Część opisowa rozprawy została klasycznie podzielona na następujące rozdziały: *Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały, Metody, Omówienie wyników, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski* oraz *Bibliografia*. Wyżej wymienione rozdziały zostały uzupełnione o alfabetyczny wykaz skrótów umieszczonych w pracy, chronologicznie przedstawione w pracy ryciny i tabele, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim oraz bibliografię. Rozdział *Bibliografia* zawiera 233 pozycji literaturowych, które są prawidłowo cytowane przez Autora w poszczególnych częściach rozprawy. Pod względem edytorskim, część opisowa pracy została przygotowana w sposób bardzo staranny i przejrzysty.

W części *Wstęp* Pan mgr Piotr Ciesielski w sposób jasny i przystępny wprowadza czytelnika w przedmiot swoich badań. Autor opisał następujące aspekty swojej rozprawy: strukturę i funkcje, dioksygenaz TET (z ang. ten-eleven translocation), ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w regulacji epigenetycznej ekspresji genów oraz wpływie na proces nowotworzenia, przebieg procesu O-GlcNAcyacji w komórce i rolę głównych enzymów regulujących ten proces, czyli transferaz OGT (z ang. O-linked N-acetylglucosamine) i hydrolaz OGA (z ang. O-GlcNAcase) oraz zaburzenia w/w procesu w komórkach nowotworowych. Poszczególne podrozdziały zestawione są logicznie i nie zawierają zbędnych informacji. Dodatkowo wybrane, najistotniejsze części rozdziału zostały zilustrowane na 3 rycinach, co świadczy o dobrym zrozumieniu prezentowanych zagadnień przez Autora.

Głównym celem pracy Pana mgr. Piotra Ciesielskiego była analiza ekspresji i wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami TET i OGT w kontekście procesów związanych z progresją nowotworową. Tak sformułowany cel uważam za ambitny i nowatorski. Ze względu na to, że zaproponowane badania były prowadzone w odniesieniu do raka endometrium, który jest często diagnozowanym rakiem u kobiet, odznaczającym się dużym potencjałem inwazyjnym, wybór modelu eksperymentalnego uważam za słuszny a zarazem ciekawy do realizacji celów badawczych w ramach pracy doktorskiej. Dodatkowo przeprowadzenie analizy ekspresji genów kodujących w/w białka w próbkach od pacjentek oraz podjęcie próby skorelowania ich ekspresji z wartością prognostyczną w raku endometrium, uważam również za dobrze przemyślane i niezwykle interesujące podejście eksperymentalne.

Główny cel pracy został przez Doktoranta osiągnięty w toku prowadzonych badań poprzez realizację szeregu celów szczegółowych wymienionych w rozprawie. Cele te obejmowały min. analizę ekspresji genów *TET1-3*, *OGT* i *OGA* oraz genów zaangażowanych w proces EMT w tkankach zmienionych nowotworowo i prawidłowym nabłonku oraz próbę korelacji poziomu ekspresji badanych genów z rokowaniem u pacjentek, a także ocenę oddziaływań pomiędzy białkami TET i OGT w kontekście ich zdolności do modyfikacji histonów i wpływu na zdolności migracyjne komórek raka endometrium.

Część doświadczalna pracy zaczyna się od opisu materiałów użytych do wykonania poszczególnych eksperymentów. W tym miejscu za godny podkreślenie uważam, fakt, że do analizy ekspresji genów Doktorant wykorzystał materiał kliniczny pozyskany dzięki współpracy z Kliniką Ginekologii Onkologicznej Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi. Podjęcie współpracy z lekarzami uważam za bardzo cenne, bo wyniki uzyskane bezpośrednio na bazie materiału klinicznego znacznie podnoszą wartość wszystkich wyników pracy i mocno uwiarygadniają wnioski końcowe rozprawy. Do badań funkcjonalnych natomiast, Doktorant użył dwóch linii komórkowych, HEC-1 lub Ishikawa,

wyprowadzonych od pacjentek z gruczolakorakiem endometrium o różnym stopniu zróżnicowania. Linie te pochodziły z amerykańskiej (ATCC) lub europejskiej (ECACC) kolekcji linii komórkowych.

Następny rozdział *Metody* został przygotowany w sposób rzetelny, adekwatny do części *Wyniki* oraz umożliwiający odtworzenie eksperymentów, co powinno być sednem tego rozdziału.

Znaczenie białek TET i OGT w progresji endometrium zostało ocenione poprzez zastosowanie szeregu technik eksperymentalnych do analizy ekspresji genów, identyfikacji białek, oceny właściwości funkcjonalnych komórek. Wśród zastosowanych metod znalazły się metody modyfikacji poziomu białka w komórkach, tj. wyciszenie (siRNA) i nadekspresja białek za pomocą plazmidów ekspresyjnych, izolowanie RNA i DNA, RTPCR i qPCR, immunoprecypitcja chromatyny, analiza zawartości poszczególnych frakcji komórkowych, identyfikacja białek metodą Western Immunoblotting, testy funkcjonalne, tj. test zarostania rany lub inwazji przez mieszaninę białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Matrigel). Zastosowanie całego spektrum powyższych metod pozwoliło Panu Piotrowi Ciesielskiemu na wielowymiarową analizę postawionego problemu badawczego oraz na osiągnięcie zaplanowanych celów szczegółowych rozprawy.

Rozdział *Wyniki* został zorganizowany w logiczny sposób w odniesieniu do opisu roli i funkcji białek TET i OGT zawartego we wstępie rozprawy doktorskiej. Rozdział ten Autor podzielił na osiem części, z których każda to krótki i syntetyczny opis wyników zebranych w publikacjach dołączonych do rozprawy, z odpowiednimi odniesieniami do opublikowanych rycin. Uważam, że taki sposób przedstawienia wyników był bardzo dobrą decyzją Autora, bo znacznie ułatwia całościowe i pogłębione zrozumienie założonego celu rozprawy i jest dobrym wprowadzeniem do publikacji załączonych do rozprawy. Po lekturze dołączonych załączników zawierających wyniki będące podstawą rozprawy Pana mgr. Piotra Ciesielskiego stwierdzam, że osiągnięcie założonych celów badawczych było możliwe dzięki temu, że eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób przemyślany, stanowią logiczną całość, nie brakuje odpowiednich kontroli. Do najbardziej wartościowych i oryginalnych wyników uzyskanych podczas realizacji rozprawy doktorskiej zaliczyłabym:

1. Ocenę ekspresji genów *TET 1,2,3* w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentek z rakiem endometrium.
2. Wykazanie, że ekspresja *TET1* i *TET2* w raku endometrium jest niższa w tkankach zmienionych nowotworowo w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem.
3. Wykazanie, że ekspresja *TET3* jest wyższa w raku endometrium w zmianach o charakterze bardziej agresywnym, o mniejszym stopniu zróżnicowania.
4. Potwierdzenie, za pomocą odpowiednio dobranych testów statystycznych, że obniżona ekspresja *TET1* może być potencjalnym markerem prognostycznym w raku endometrium
5. Potwierdzenie oraz analizę współzależności pomiędzy białkiem TET3 i OGT, z użyciem dwóch linii komórkowych raka endometrium, w kontekście procesów komórkowych, takich jak: regulacja epigenetycznej ekspresji genów oraz migracja i inwazja komórek.

Na podstawie powyższego podsumowania wyników stwierdzam, że Pan mgr Piotr Ciesielski w sposób oryginalny i nowatorski przeanalizował i opisał relacje pomiędzy białkami TET i OGT w kontekście procesów komórkowych prowadzących do progresji raka endometrium.

W rozdziale *Dyskusja* Autor przedyskutował uzyskane wyniki w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych i adekwatnie do opisów zawartych w rozdziale *Wstęp* i *Wyniki*, co powoduje, że cała rozprawa stanowi spójną i zwartą całość. W mojej ocenie dyskusja jest trafna, rzetelna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników, co potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Ilość zacytowanych pozycji literaturowych oraz sposób przedstawiania swoich własnych wyników na tle aktualnej wiedzy potwierdza dogłębną znajomość omawianej problematyki przez Autora.

Podsumowując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Pan mgr Piotr Ciesielski w swojej rozprawie doktorskiej przedstawił oryginalne rozwiązanie problemu badawczego oraz poprawnie przedstawił efekty swojej pracy eksperymentalnej w rozprawie doktorskiej. Ponadto wykazał się wnikliwością badacza, umiejętnością wykorzystania szeregu technik biologii komórki i biologii molekularnej, prezentacji swoich wyników i ich interpretacji.

Biorąc jednak pod uwagę obowiązki recenzenta związane z krytycznym spojrzeniem na ocenianą rozprawę doktorską chciałabym poddać pod rozważenie Doktoranta następujące uwagi:

Rozdział *Wstęp*

- Autor wprowadził element zamieszania do tekstu, jeśli chodzi o stosowanie i rozwijanie skrótów w tekście, moim zdaniem korzystana jest dla czytelnika zasada, że nazwa skrótu jest rozwijana, w miejscu, w którym skrót pojawia się po raz pierwszy w tekście. Niestety Autor nie stosował konsekwentnie tej zasady w rozprawie, co znacznie utrudnia zrozumienie tekstu, np. skrót TET pojawia się na str. 6, rozwinięcie jest na str.7, skrót 2-KG – str.8, rozwinięcie skrótu str.10 itp.
- W całej rozprawie brak jest również konsekwencji w stosowanej pisowni nazw genów i białek ludzkich. Wydaje się, że Autor przyjął zasadę pisowni nazw genów kursywą, a nie zawsze tak jest np.str.41 „kopii mRNA genu HRT1”, podczas gdy a na str.42 „kopii mRNA genu *HRT1*” itp.
- Czy można napisać „*OGT mogła modyfikować histon H2B na serynie 112.*” (str.16) czy raczej w serynie 112. Jak jest prawidłowa forma?
- Proszę o wyjaśnienie co Autor miał na myśli pisząc „*sekwencjonowanie egzomu*” (str.18) oraz „*szklak mTOR*” (str.30), w tym ostatnim wypadku chyba to jest niefortunna kalka językowa z angielskiego.
- W części tej, jak i również w pozostałych częściach rozprawy, nie znalazłam jasnego wytłumaczenia, dlaczego w rozprawie nie zaplanowano analizy ekspresji czynnika transkrypcyjnego Snail, który jest pierwszym czynnikiem, inicjującym proces EMT. Stwierdzenie, że badane czynniki zostały wybrane na podstawie danych literaturowych pozostawia pewien niedosyt informacji u czytelnika, dlatego proszę o wyjaśnienie jakie to są dane i co pokazują?

Rozdział *Materiały i metody*

- Rozdział 7.1. Czy FBS używany do hodowli był inaktywowany termicznie?
- Na jakiej podstawie dokonywano wyboru genu referencyjnego w poszczególnych reakcjach qPCR, czy i jak była sprawdzana stabilność genu/genów referencyjnych, czy wybór oparto na danych literaturowych?
- Czy po izolacji RNA był określany współczynnik integralności, RIN?

- Podrozdział 7.14.5, jaki czynnik zastosowano do blokowania wolnych miejsc na membranie, czy zastosowano tylko bufor?

Rozdział *Wyniki*

- Do modyfikacji ekspresji badanych genów wykorzystano metodę przejściowej transfekcji. Do eksperymentów brane były komórki 24 h po transfekcji plazmidami do nadekspresji lub 48 h po wyciszeniu za pomocą siRNA. Z opisu zamieszczonego w rozprawie wynika, że wykonano analizę efektów nadekspresji lub wyciszenia genów badanych białek tylko odpowiednio po 24h godzinach lub 48 (rozdział metody), czy potwierdzono także, że efekty transfekcji utrzymują się po dłuższym czasie czyli po 72h lub 96h czyli de facto w czasie obserwacji eksperymentalnych dotyczących np. inwazji komórek lub analizy frakcji komórkowych, czy analizowano jak długo utrzymywały się w komórkach zastosowane modyfikacje ekspresji? Czy poziom regulacji poziomu badanych białek był analizowany za pomocą WB czy tylko oznaczano poziom mRNA (załącznik 2, publikacja w *IJMS*, Figura 1A.) Moje wątpliwości budzi WB przedstawiony na następnej rycinie w tej opublikowanej pracy (Figura 2B, *IJMS*, załącznik 2), gdzie poziom nadekspresji białka TET3 w komórkach linii Ishikawa nie różni się od poziomu kontroli, w przeciwieństwie do komórek linii HEC-1, czy to jest analiza nadekspresji po 24 h od transfekcji? A pozostałe zestawione paski WB to analiza wyników eksperymentów po jakim czasie? Czy do analizy w/w WB wykorzystano narzędzia analizy obrazu, np. program Image J.

Rozdział *Dyskusja*

- Pomimo tego, że uważam, że jest to bardzo dobrze napisany rozdział to trochę brakuje mi w tym rozdziale osobistego odniesienia się Autora do otrzymanych wyników, poprzez np. używanie stwierżeń, „moim zdaniem”, „uważam”.

Przedstawione przeze mnie powyższe uwagi nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej mi rozprawy. Mam nadzieję, że Pan mgr Ciesielski potraktuje je jako niezbędne elementy w dyskusji naukowej.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana magistra Piotra Ciesielskiego spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W poszczególnych rozdziałach rozprawy Pan magister Piotr Ciesielski wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. A zatem zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana magistra Piotra Ciesielskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.