

Bydgoszcz, 2 października 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Ciesielskiego,
na stopień doktora nauk biologicznych, pt.:

”Dioksygenazy TET i O-GlcNAc transferaza w progresji nowotworów endometrium”

wykonanej w Katedrze Cytobiochemii Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego,
pod promotorstwem dr. hab. Anny Krześlak, prof. UŁ oraz promotorstwem pomocniczym
dr. Pawła Józwiaka.

Recenzja została przygotowana w oparciu o pismo Przewodniczącej Komisji Uniwersytetu
Łódzkiego ds. Stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 2 lipca 2024 roku wraz z
załącznikami

Dioksygenazy TET to enzymy biorące udział w demetylacji DNA, co wpływa na regulację ekspresji genów. Enzymy te utleniają 5-metylocytozynę do 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny, prowadząc do zmniejszenia metylacji DNA, co może reaktywować geny supresorowe nowotworów lub wpływać na mechanizmy regulacyjne. O-GlcNAc transferaza (OGT) to enzym, który katalizuje proces glikozylacji białek (O-GlcNAcytacji), co wpływa na ich funkcje, stabilność oraz interakcje z innymi białkami. OGT i TET mogą działać synergistycznie w regulacji ekspresji genów. Zmiany w glikozylacji i metylacji mogą prowadzić do zaburzeń w epigenetycznej regulacji genów odpowiedzialnych za progresję nowotworu. Rola i współdziałanie tych enzymów progresji nowotworów endometrium nie były wyczerpująco opisywane, zatem podjęty przez Doktoranta temat uważam za uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę monografii w twardej oprawie, układzie hybrydowym, gdyż zawiera zarówno opublikowane w dwóch artykułach jak i nieopublikowane wyniki prac badawczych. Składa się z części zasadniczej o układzie typowym dla opracowań prac eksperymentalnych zawierającej wszystkie niezbędne elementy tj. stronę tytułową, spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo obejmujące 233 pozycje literaturowe. Rozprawa zawiera pięć załączników, trzy z nich to prace oryginalne współautorstwa Doktoranta wraz z suplementem, w czwartym znajdują się wyniki

badan, które nie zostały opublikowane, a piąty zawiera oświadczenia współautorów. Sposób przygotowania, układ pracy i jej forma nie budzą większych zastrzeżeń, może z wyjątkiem braku numeracji stron zawierających załączniki.

Doktorant wprowadza czytelnika w badany temat w obszernym wstępie teoretycznym, stanowiącym wyczerpujący przegląd doniesień literaturowych. Autor wykazał się erudycją, komunikatywnością oraz zdolnością syntetycznego przekazu treści. Rozpoczyna od ogólnej charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej białek TET a następnie przechodzi do opisu ich roli w procesach pasywnej i aktywnej demetylacji DNA. W dalszej części omawia wpływ interakcji białek TET z innymi białkami na modyfikacje epigenetyczne. Następnie Doktorant wyczerpująco omawia rolę białek TET w procesie nowotworzenia i przechodzi do charakterystyki procesu O-GlcNAcytacji. Po podsumowaniu struktury i funkcji głównych enzymów zaangażowanych w ten proces, charakteryzuje jego rolę w rozwoju i progresji nowotworów, wpływ na metabolizm komórkowy i przekazywanie sygnałów w komórce. W podsumowaniu oceny tej części pracy pragnę stwierdzić, że została ona opracowana poprawnie pod względem merytorycznym i w satysfakcjonującym stopniu prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr. Piotra Ciesielskiego. Zabrakło tylko, choćby krótkiego, opisu tytułowego problemu klinicznego, czyli nowotworów endometrium. Pozostaje mieć nadzieję że usłyszymy nieco o tym podczas publicznej obrony.

Część doświadczalna obejmująca 36 stron napisana jest dokładnie i z uwzględnieniem kolejnych etapów pracy eksperymentalnej, od przyjęcia założeń i celów, przez opis metod badawczych i uzyskanych wyników do dyskusji i sformułowania wniosków.

Głównym celem pracy było określenie związku pomiędzy ekspresją genów TET i OGT a progresją raka endometrium oraz wpływu wzajemnych oddziaływań między TET3 i OGT na regulację ekspresji genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym oraz zdolność komórek raka endometrium do inwazji i przerzutowania. Na podkreślenie i uznanie zasługuje kompleksowe podejście do problemu badawczego poprzez wykorzystanie zarówno materiału klinicznego jak i odpowiednio dobranych modeli komórkowych. W sekcji tej zaproponowane zostały również techniczne cele szczegółowe, które jasno wytyczają kolejne etapy pracy badawczej. W tym miejscu mam jednak zastrzeżenie do sformułowania celu 3 „Określenie wpływu poziomu ekspresji genów TET na rokowanie pacjentek z rakiem endometrium”. W oparciu o zaproponowany model badania niestety nie da się określić wpływu poziomu ekspresji na rokowanie, można co najwyżej oszacować wartość rokowniczą.

Opis metod badawczych dotyczących pozyskania materiału oraz eksperymentów dotyczących analizy ekspresji mRNA oraz białek jest obszerny i wystarczający do rzetelnej oceny sposobu prowadzenia badań, świadczy też o dużej biegłości Doktoranta w obszarze tej części pracy eksperymentalnej. Nie znalazłem niestety informacji o tym jakie były kryteria doboru genów i białek referencyjnych oraz czy poza pomiarem spektrofotometrycznym oceniano jakość wyizolowanego RNA? W kilku miejscach Doktorant posługuje się wyłącznie szybkością wirowania, co bez podania promienia rotora jest informacją w zasadzie bezużyteczną. Niestety w opisie stosowanych metod (Rozdział 7.) nie ma żadnych informacji o analizach zawartości 5-metylocytozyny i 5-hydroksymetylocytozyny w DNA, odnajdujemy je dopiero w Załączniku 1 w sekcji „Materials and methods”. Jednak i tu brakuje kluczowych informacji na temat sposobu kalibracji i interpretacji ilościowej. Czy przedstawione wartości procentowe odnoszą się do relacji molowych czy wagowych? Jakiej ilości DNA użyto do analiz i czy oceniana była potencjalna kontaminacja RNA?

W liczącym nieco ponad 5 stron opisie wyników Doktorant syntetycznie podsumował rezultaty badań opisanych w publikacjach stanowiących Załączniki 1., 2. i 3. jak również nieopublikowanych wyników zawartych w Załączniku 4. Do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

- wykazanie niższego poziomu ekspresji mRNA *TET1* i *TET2* oraz wyższego *TET3* w próbkach raka niż w próbkach prawidłowych tkanek, oraz związku poziomu ekspresji ze stopniem zaawansowania guza.
- zaobserwowanie dodatniej korelacji między zawartością 5-hmC w DNA a względną ekspresją *TET1* i *TET2*,
- identyfikacja ekspresji *TET1* jako potencjalnego czynnika rokowniczego u pacjentek chorych na raka endometrium,
- udowodnienie wpływu zmiany w ekspresji *TET3* i *OGT* na ekspresję *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*,
- określenie zdolności wiązania się białek *TET3* i *OGT* do regionów chromatyny związanych z *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*,
- zaobserwowanie odmiennego wpływu nadekspresji *OGT* i *TET3* na potencjał migracji i inwazji komórek HEC-1A i Ishikawa,
- zaobserwowanie korelację między ekspresją *OGT* a *TWIST1* i *ZEB1* jak również między *TET3* a *FOXC1*.

Po opisie wyników Autor zamieścił blisko ośmiostronicową dyskusję, w której umiejętnie prezentuje własne wyniki w kontekście doniesień innych badaczy. Doktorant doskonale zdaje sobie sprawę z niedoskonałości i ograniczeń badanych modeli i rozważnie je dyskutuje. W mojej ocenie przedstawione wysokiej jakości wyniki upoważniły Doktoranta do wyciągnięcia, przedstawionego w Rozdziale 9.1, wniosku końcowego. Bez wątpienia białka TET odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu endometrium. Interakcje między białkami TET3 i OGT, a odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne oraz wpływają na zdolność komórek do inwazji i przerzutowania. Potencjał na praktyczne zastosowanie ma identyfikacja ekspresji *TET1* jako niezależnego czynnika rokowniczego.

Z recenzenckiego obowiązku przedstawiam również listę drobniejszych uchybień zauważonych w ocenianej rozprawie:

- Autor zamiennie i niekonsekwentnie stosuje polską i angielską terminologię, jak również miesza różne konwencje wyrażania stężeń roztworów,
- w wykazie skrótów pojawia się niewłaściwa nazwa związku – 5-karboksyocytozyna,
- proces przekształcenia 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny oraz dalej do 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny jest procesem utleniania a nie hydroksylacji,
- ilość 5-karboksycytozyny w genomie jest ponad 1000 razy mniejsza niż 5-hydroksymetylocytozyny,
- TDG nie jest jedyną glikozydazą wycinającą 5-formylocytozynę i 5-karboksycytozynę,
- powszechnie stosowanym terminem jest „ubikwitynacja” a nie „ubikwitynylacja”,
- skrót nazwy “single strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase” to SMUG1 a nie SLUG1,
- zamiennie i niekonsekwentnie stosowane są skróty dla 2-ketoglutaranu (2-KG i 2-OG),
- pierwsze zdanie w rozdziale 4.2.1 wymaga przeredagowania stylistycznego,
- przyspieszenia nie wyrażamy w jednostkach „rpm”,
- w kilku miejscach nazwy genów nie zostały napisane kursywą.

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko. Chciałbym, aby stawiane w prezentowanej recenzji pytania oraz przedstawione uwagi nie zostały odebrane jako głos krytyczny, lecz by stały się elementem w dyskusji naukowej z Doktorantem.

Rozprawa doktorska mgr. Piotra Ciesielskiego jest wartościowa badawczo, ma niewątpliwe walory poznawcze oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt opublikowania znaczącej części wyników w pracach, które ukazały się w recenzowanych czasopismach: Tumor Biology oraz International Journal of Molecular Sciences. Doktorant jest pierwszym autorem obu prac, a załączone oświadczenia współautorów jasno wskazują na jego wiodącą rolę w zarówno w części eksperymentalnej jak i podczas przygotowania publikacji. O dojrzałości badawczej mgr. Piotra Ciesielskiego najlepiej świadczy fakt uzyskania i rozliczenia samodzielnego projektu badawczego w konkursie NCN Preludium, jak również dofinansowania w ramach dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa na stopień doktora nauk biologicznych spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1789. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr. Piotra Ciesielskiego w dyscyplinie nauki biologiczne a jej autor udowodnił umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wnoszę zatem do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr. Piotra Ciesielskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.