

Bydgoszcz, 11.05.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Aleksandry Szustki** pt.

**„Udział białek Polycomb w regulacji procesu autofagii w komórkach raka endometrium.”**

wykonanej w Katedrze Cytobiochemii Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego  
pod kierunkiem dr. hab. Anny Krześlak, prof. UŁ

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójną tematycznie monografię dotyczącą znaczenia procesów autofagii w rozwoju nowotworów oraz potencjalnego znaczenia regulacji tych procesów w terapii przeciwnowotworowej. Plagą naszych czasów jest zwiększająca się częstość zapadania na choroby nowotworowe i jednym z kluczowych elementów branych pod uwagę, jako przyczyna tego stanu rzeczy, są zmiany środowiskowe, (zanieczyszczenia, powszechność kancerogenów, wysoko przetworzona żywność) oraz coraz to szybsze „tempo życia”. Skutkuje to nasiloną mutagenezą, ale nie tylko mutacje są czynnikiem biorącym udział w procesie nowotworzenia. Szczególnie w ostatnich latach, do łask wróciły zagadnienia związane z regulacją ekspresji genów a epigenetyczne modyfikacje DNA i białek histonowych mogą być czynnikiem, który może decydować również o transformacji nowotworowej. Różnorodność komórek określonego typu nowotworu, odmienna wrażliwość na chemio- czy radioterapię, często wynika z odmienności metabolicznej komórek wynikającej z różnego schematu realizacji informacji genetycznej. Zmiany w komórkach nowotworowych dotyczą zarówno zaburzeń związanych z proliferacją i różnicowaniem się komórek ale i ze zmianami metabolicznymi i strukturalnymi prowadzącymi do różnorodności fenotypowej. Sam proces autofagii jest dość kontrowersyjny, jeżeli chodzi o kierunek zmian w przypadku kancerogenezy. Podobnie jak w przypadku regulacji ekspresji genów, nie do końca wiadomo, czy w danej sytuacji nasilenie tych procesów przynosi pozytywny czy negatywny skutek. Połączenie aktywności białek kompleksu represyjnego Polycomb (PRC1/PRC2) z procesami autofagii przez pryzmat przeżywalności komórek jest dość ciekawym podejściem mogącym mieć znaczenie aplikacyjne w terapii nowotworów. Wobec powyższego, temat pracy doktorskiej jest bardzo aktualny, a zastosowane modele badawcze wskazują na dużą nowatorskość przeprowadzonych badań.

Praca doktorska przygotowana bardzo starannie i poza standardowymi elementami, typu: spis treści, skróty, streszczenie, literatura, zawiera informacje o projektach związanych z prowadzonymi badaniami, wykaz publikacji Doktorantki oraz listę doniesień konferencyjnych zawierających część wyników badań zawartych w recenzowanej pracy doktorskiej.

W części teoretycznej sporo miejsca poświęcono autofagii, wyjaśniając mechanizm molekularny procesu, opisując czynniki regulacyjne i ścieżki sygnałowe kontrolujące jej

przebieg. Zamieszczono również informacje dotyczące kompleksu represyjnego Polycomb 1 ze szczególnym uwzględnieniem białek BMI1 oraz RING1A i RING1B. Ciekawą częścią są zamieszczone informacje z przeglądu literaturowego dotyczące dualistycznego podejścia do znaczenia procesu autofagii w kancerogenezie. Dodatkowo, we wstępie teoretycznym znalazły się informacje na temat aktualnych badań dotyczących udziału białek Polycomb 1 w procesie autofagii. Ta część pracy zakończona jest podrozdziałem dotyczącym prób klinicznych z zastosowaniem inhibitorów i aktywatorów autofagii w terapii nowotworowej i w sposób płynny przechodzi w cele pracy. Zawarte we wstępie teoretycznym treści, w moim przekonaniu dobrano poprawnie, pozwalając czytelnikowi lepiej zrozumieć problemy stawiane do rozwiązania w Celach pracy.

Głównym celem badań było określenie wpływu białek kompleksu PRC1 na proces autofagii oraz badanie efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów kompleksu PRC1 w kombinacji z modulatorami autofagii w raku endometrium. Scharakteryzowano cele szczegółowe, które znalazły odzwierciedlenie w rozdziale „wyniki”. Jako materiał badawczy wytypowano dwie linie komórkowe gruczolakoraka endometrium; HEC-1A i Ishikawa.

Dobór materiału badawczego oraz metod analitycznych poprawny. Opis metod pozwala na odtworzenie eksperymentów w innych laboratoriach przez innych badaczy, co dobrze świadczy o profesjonalizmie badawczym Doktorantki.

Wyniki badań przedstawiono w postaci krótkich opisów oraz dobrze przygotowanych rycin i tabel, co sprawia, że są one przejrzyste i czytelne, pomimo ich ogromnej ilości. Wykonano analizy ekspresji genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po wyciszeniu ekspresji *RING1*, *RNF2* oraz w warunkach standardowego oraz obniżonego stężenia glikozy na poziomie mRNA oraz na poziomie białka. Kolejnym etapem była ocena ekspresji genów po zahamowaniu aktywności *RING1/RNF2* z użyciem inhibitora PRT4165 w warunkach standardowych i obniżonym stężeniu glukozy. Analogicznie badania przeprowadzono z wyciszeniem ekspresji genu *BMI1* oraz po zahamowaniu aktywności białka z użyciem inhibitora PTC-209. Określono również poziom ubikwitynylacji histonu H2A w komórkach z zahamowaną ekspresją/aktywnością RINGA/B i BMI1. Dalsze eksperymenty dotyczyły określenia wpływu zahamowania aktywności białek kompleksu PRC1 pojedynczo lub w kombinacji z induktorami autofagii (metformina i Torin1) na żywotność komórek. Zbadano również wpływ inhibitorów PRT416 i PTC-209 pojedynczo oraz w kombinacji z inhibitorami autofagii (Lys05 i hydroksycyclochiną) oraz określono rodzaj oddziaływań między użytymi związkami dla obu układów. Ostatnim etapem badań było określenie wpływu zahamowania aktywności białek kompleksu PRC1 w kombinacji z Lys05 na apoptozę i nekrotozę przy użyciu cytometrii przepływowej oraz ocena ekspresji białek zaangażowanych w te procesy.

Uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów wyniki Doktorantka przedyskutowała z dość obszerną literaturą z ostatnich lat dotyczącą tematyki białek kompleksu Polycomb oraz regulacji autofagii i udziału tego procesu w kancerogenezie. Spora część dyskusji poświęcona jest potencjalnym próbom użycia induktorów oraz inhibitorów autofagii w leczeniu chorób nowotworowych. Podobnie jak w dobrze zaplanowanej części eksperymentalnej, w dyskusji Autorka wykazała się dużą systematycznością i kolejno każdą z obserwacji porównywała z danymi uzyskanymi przez inne zespoły badawcze oraz szukała danych pozwalających na

wyjaśnienie rozbieżności, ewentualnie tłumaczących potencjalny mechanizm zmian obserwowanych w eksperymencie.

Do najciekawszych efektów przeprowadzonych badań niewątpliwie należą obserwacje dotyczące różnic w odpowiedzi na stosowane procedury w zależności od linii komórkowej. Różne typy komórek wykorzystują różne szlaki sygnalizacyjne przystosowując się do warunków stresowych i zwiększając swoją żywotność. To niewątpliwie ma bardzo istotne znaczenie poznawcze z punktu widzenia nauk podstawowych ale i pod kątem klinicznym, przez pryzmat skuteczności chemioterapii.

Dysertacja kończy się Podsumowaniem, w którym Doktorantka wskazała na kilka ważnych aspektów: wyciszenie ekspresji białek kompleksu PRC1 powoduje zmianę w ekspresji genów zaangażowanych w proces autofagii. Bardzo skutecznym czynnikiem indukującym autofagię są niedobory substratów energetycznych (hipoglikemia), co potwierdza zdolności adaptacyjne komórek do niesprzyjających warunków, dotyczy to również komórek nowotworowych. Różnice w odpowiedzi na stosowane inhibitory białek kompleksu PRC1, induktory i inhibitory autofagii, w zależności od linii komórkowej oraz wykazanie antagonistycznego działania tych związków, stanowi duże ograniczenie dla rozwoju strategii terapeutycznych opartych na tych elementach układanki sygnalizacyjnej w komórkach.

Puentując ten etap recenzji, stwierdzam, że postawione cele pracy zostały w pełni osiągnięte, a wyniki przeprowadzonych badań mają bardzo duże znaczenie poznawcze. Dodatkowo, obserwowane różnice komórkowe (w zależności od badanej linii komórkowej) są kolejnym małym krokiem w rozważaniach strategii leczenia różnych typów nowotworów, szczególnie opornych na standardowe procedury terapeutyczne.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie ma ich dużo. Rozprawa napisana poprawnym językiem z zachowaniem dobrego stylu, czyta się z przyjemnością.

Niemniej jednak, Doktorantka poszerzyła zakres badań o niektóre białka apoptotyczne i nekrotyczne. I tak jak w przypadku apoptozy naukowcy są zgodni, to nekroptoza nadal jest dość dyskusyjną sprawą. Szkoda, że we wstępie teoretycznym zabrakło krótkiego opisu tych procesów.

Kolejnym elementem, na który zwróciłbym uwagę to wybór linii komórkowych do badania. Zabrakło mi pełniejszego opisu linii komórkowych pod względem chociażby receptorów błonowych, wrażliwości na estrogeny, progesteron. Porównanie z innymi liniami komórkowymi raka endometrium.

Drobny niedosyt pozostawia też brak wskazania czynników decydujących o wyborze białek, których ekspresja była oceniana, chociaż uważam, że dobór jest dobry.

Analizując przedstawione opracowanie stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora, należy stwierdzić, że mgr. Aleksandra Szustka opanowała bardzo dobrze warsztat metodyczny, począwszy od podstawowych technik laboratoryjnych poprzez techniki immunochemiczne aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Starannie wyznaczyła sobie cele badawcze i w pełni je osiągnęła. Na uznanie zasługuje obszerność, czasochłonność oraz bardzo widoczna etapowość zaplanowanych badań. W skład całkowitego dorobku naukowego Doktorantki wchodzi 5 artykułów w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 1 w biochemicznym polskim periodyku oraz udział w konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym, których efektem jest 19 doniesień zjazdowych. Należy również wspomnieć, że mgr Aleksandra Szustka swoje

doświadczenie naukowe wzbogaciła o badania w ramach realizacji trzech projektów badawczych, w tym Preludium finansowane przez Narodowe Centrum Nauki.

Podsumowując, w oparciu o ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz dorobku naukowego stwierdzam, że mgr Aleksandra Szustka spełnia wymogi dotyczące ubiegania się o nadanie stopnia doktora określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Aleksandry Szustki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Szustki.

Jako uzasadnienie pragnę podkreślić bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wykonane zostały przy użyciu wyrafinowanych technik biologii molekularnej, które są powszechnie akceptowane przez naukowców zajmujących się tą tematyką. Uzyskane wyniki, pomimo negatywnej konkluzji dotyczącej wzrostu efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów kompleksu PRC1 w połączeniu z modulatorami autofagii, stanowią duży wkład merytoryczny w poznanie zasad regulacji autofagii przez białka uniwersalnego represyjnego kompleksu Polycomb. Również wskazanie na różnorodność odpowiedzi komórkowej na różne czynniki modulujące te procesy dla różnych linii komórkowych raka endometrium, to wskazówka do indywidualnego podejścia terapeutycznego określonych typów nowotworów.

KIEROWNIK  
Katedra Biochemii Klinicznej  
  
dr hab. Marek Foksiński, prof. UMK