

Bydgoszcz, 12.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Biesiekierskiej pt.

„Analiza możliwości wykorzystania ciał ketonowych i transferazy bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA jako potencjalnych narzędzi w terapii raka szyjki macicy w warunkach in vitro.”

wykonanej w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego
pod kierunkiem dr. hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójną tematycznie monografię dotyczącą ingerencji w metabolizm energetyczny komórek nowotworowych zarówno na poziomie ekspresji genów kodujących enzymy metabolizmu jak i poprzez zmiany dostępności substratów. Doktorantka na cel obrała sobie jeden z kluczowych enzymów odpowiedzialnych za metabolizm związków ketonowych jakim jest transferaza bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT). Dodatkowym aspektem pracy są zagadnienia dotyczące coraz bardziej aktualnego podejścia terapeutycznego w chorobach nowotworowych, nutriterapii. Dieta ketogeniczna, nie rzadko stosowana w chorobach nowotworowych, wywodzi się bardziej z poglądów dotyczących efektu Warburga aniżeli z udokumentowanych pozytywnych skutków jej stosowania.

Różnorodność komórek określonego typu nowotworu, odmienna wrażliwość na chemio- czy radioterapię, często jest efektem 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. Wybór genu *OXCT1* kodującego białko SCOT, w aspekcie wpływu na przeprogramowanie metaboliczne w kierunku wykorzystywania związków ketonowych przez komórki nowotworowe uważam za trafny, temat pracy doktorskiej bardzo aktualny, a zastosowane modele badawcze wskazują na dużą nowatorskość przeprowadzonych badań.

Praca doktorska przygotowana bardzo starannie. W części teoretycznej zawiera podstawowe elementy, takie jak: spis treści, stosowane skróty, wprowadzenie teoretyczne oraz postawione cele badawcze. W części praktycznej doktorantka przedstawiła dość szczegółowo informacje na temat modeli badawczych oraz metodyki stosowanej w badaniach. Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie wyników i wnioski poprzedzają streszczenie oraz wykaz literatury. Dodatkowo zamieszczono 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 metabolizmowi energetycznemu komórek z uwzględnieniem metabolizmu komórek nowotworowych charakteryzującym się wzmożonym wychwytem i wykorzystaniem glukozy w celu promowania ich wzrostu i proliferacji. Zjawisko to, nazywane efektem Warburga, jest dość nieoczywiste z uwagi na zachodzące w jego ramach przekształcenie glukozy do mleczanu, nawet w warunkach tlenowych. Dodatkowo, we wstępie teoretycznym znalazły się informacje na temat aktualnych badań dotyczących udziału diety ketogenicznej w leczeniu niektórych nowotworów oraz dość szerokiego oddziaływania na komórki nowotworowe β -hydroksymaślanu. Dokonano przeglądu literaturowego zagadnień związanych z wpływem związków ketonowych na progresję nowotworów. Część wstępu teoretycznego dotyczy już konkretnie raka szyjki macicy i przez pryzmat tego nowotworu dokonano przeglądu literaturowego dotyczącego zarówno mikrobiomu, jak i prób przeprogramowania metabolicznego. Wykazano, że katabolizm związków ketonowych scentralizowany jest wokół transferazy bursztyni- CoA :3-ketokwas- CoA kodowanej przez gen *OXCT1*, ograniczającej prędkość ketolizy. Zawarte we wstępie teoretycznym treści, w moim przekonaniu dobrano poprawnie, pozwalając czytelnikowi lepiej zrozumieć problemy stawiane do rozwiązania w Celach pracy.

Głównym celem pracy doktorskiej było sprawdzenie roli genu *OXCT1* i produkowanego przez niego białka – SCOT – w regulacji potencjału metastatycznego komórek raka szyjki macicy HeLa. Scharakteryzowano cele szczegółowe, które znalazły odzwierciedlenie w rozdziale „Wyniki”.

Jako materiał badawczy wytypowano linię komórkową HeLa. Analiza ekspresji genu *OXCT1* w wybranych liniach komórkowych za pomocą techniki RT-qPCR wykazała, że komórki raka szyjki macicy HeLa charakteryzują się bardzo wysoką ekspresją tego genu. Badania prowadzono na trzech modelach badawczych: komórkach HeLa z (1) wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* i (2) nadekspresją genu *OXCT1* oraz (3) na komórkach HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych. Efektywność wyciszenia genu *OXCT1* w komórkach HeLa, a także transfekcji komórek wektorami ekspresyjnymi oceniono wykonując analizy ekspresji genu *OXCT1* i poziomu białka SCOT.

Dobór materiału badawczego oraz metod analitycznych uważam za właściwy. Precyzyjny opis metod pozwala na odtworzenie eksperymentów w innych laboratoriach przez innych badaczy, co świadczy o profesjonalnym podejściu Doktorantki do badań naukowych.

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 dla komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* KO) oraz analogiczne badania dla komórek z nadekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* OX). Badania te obejmowały ekspresję *OXCT1*/SCOT na poziomie transkrypty i białka, proliferację i wzrost komórek, wrażliwość na wybrane cytostatyki oraz możliwości migracyjne i inwazyjne. Dodatkowo badano metabolizm ciał ketonowych oraz ich wpływ na poziom modyfikacji potranslacyjnych w zmodyfikowanych komórkach HeLa.

Ostatnim etapem badań była analiza komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych wraz z dodatkiem związków ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoctanu) i badanie ich wpływu na szybkość proliferacji komórek HeLa.

Uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów wyniki Doktorantka przedyskutowała z wynikami innych zespołów. Dość obszerna literatura (200 pozycji) pochodzi w dużej mierze z

ostatnich pięciu lat. Jeden z aspektów diskutowanych przez Doktorantkę dotyczy roli jaką odgrywa w katabolizmie ciał ketonowych transferaza bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT), enzym kodowany przez gen *OXCT1*, którego wyciszenie potencjalnie prowadzi do zwiększenia poziomu ciał ketonowych na skutek zahamowanego ich dalszego rozkładu. Spora część dyskusji dotyczy cyklu komórkowego oraz białek odpowiedzialnych za jego regulację, których poziomy kształtują się dość nieoczekiwanie w zależności od modelu badawczego. Wyniki dotyczące migracji i inwazyjności wzbogacone o poziom białek uczestniczących w przejściu epithelialno-mezenchymalnym to kolejny aspekt dyskusji dość niejednoznacznych obserwacji w wykonanych badaniach. Lekooporność, uszkodzenia DNA oraz modyfikacje epigenetyczne, szczególnie białek histonowych, to kolejne zagadnienia dość szczegółowo diskutowane przez Doktorantkę, a często dotyczące odmiennych danych literaturowych.

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 między komórkami HeLa *OXCT1*+/- i HeLa *OXCT1*-/-. Doktorantka podejrzewa, że zjawisko spowolnionych podziałów komórkowych HeLa *OXCT1*+/- najprawdopodobniej jest konsekwencją tzw. „off-targetu” polegającego na wyciszeniu oprócz *OXCT1* jeszcze innego, bliżej nieokreślonego genu i rekomenduje ostrożność w interpretacji wyników analiz z wykorzystaniem komórek manipulowanych genetycznie. Obserwacje z przeprowadzonych analiz proliferacji oraz rozkładu faz cyklu komórkowego komórek HeLa *OXCT1* KO sugerują, iż gen *OXCT1* może być zaangażowany w szlaki sygnałowe kontrolujące podziały komórkowe w raku szyjki macicy a analizy zwiększonej oporności komórek HeLa *OXCT1*-/- na doksorubicynę i cisplatynę, w połączeniu ze zwiększonym potencjałem migracyjnym i inwazyjnym, może mieć związek z hybrydowym charakterem epithelialno-mezenchymalnym badanych komórek. Komórki 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: bialleliczne wyciszenie genu *OXCT1* w komórkach HeLa zwiększa oporność komórek na klasyczne chemioterapeutyki stosowane w terapii raka szyjki macicy, tj. doksorubicynę, cisplatynę. Nadekspresja genu *OXCT1* w komórkach HeLa wpływa na zwiększenie wrażliwości komórek na działanie tych samych związków. Fenotyp komórek HeLa *OXCT1*-/- i HeLa *pIRES_OXCT1* jest hybrydowy z uwagi na brak jednoznacznego ukierunkowania względem strony epithelialnej lub mezenchymalnej w badaniach nad EMT. Brak efektów suplementacji ciałami ketonowymi przy równoczesnych niedoborach glukozy, sugeruje upośledzoną zdolność komórek nowotworowych do wykorzystywania ciał ketonowych jako główne źródło energii.

Puentując ten etap recenzji, stwierdzam, że postawione cele pracy zostały w pełni osiągnięte, a wyniki przeprowadzonych badań mają bardzo duże znaczenie poznawcze.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie ma ich dużo. Rozprawa napisana poprawnym językiem z zachowaniem dobrego stylu, czyta się z przyjemnością. Drobne nieliczne błędy stylistyczne są prawie niezauważalne i nie wpływają na wartość merytoryczną opracowania.

Niemiej jednak, z obowiązku recenzenta chciałbym dopytać: dlaczego nie porównano uzyskanych wyników z badań dla linii komórkowej HeLa z wynikami badań tych samych parametrów dla komórek HeLa transfekowanych wektorami pIRES. Co prawda, nie jest to bezpośredni związek z postawionymi hipotezami badawczymi, to jednak moja ciekawość dotyczy potencjalnego wpływu lub jego braku, samej transfekcji komórek na zmiany badanych parametrów.

Druga uwaga dotyczy wyboru modelu komórkowego. Mile zaskoczony byłem wyborem linii komórkowej raka szyjki macicy (HeLa) na podstawie oceny ekspresji genu *OXCT1* w wybranych liniach komórkowych. „W analizowanej grupie komórek znalazły się linie nowotworu płuc (komórki A549), okrężnicy (LS180, LoVo, HCT116, HT29), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF7) i jelita grubego (Caco-2), a także unieśmiertelniona linia komórkowa wywodząca się z embrionalnej komórki nerki człowieka (HEK293) i immortalizowane komórki śródbłonna mikronaczyniowego (HMEC-1)”. Zaskoczeniem dla mnie była tak wysoka ekspresja badanego genu w komórkach HeLa, ponieważ wykorzystywanie związków ketonowych w warunkach niedoborów energetycznych przypisywane jest przede wszystkim komórkom układu nerwowego, komórkom nerki i w niewielkim stopniu komórkom mięśniowym. Szkoda, że w tym zestawieniu linii komórkowych nie znalazły się komórki nowotworów układu nerwowego.

Analizując przedstawione opracowanie stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora, należy stwierdzić, że mgr. Marta Biesiekierska 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 widoczna w dysertacji etapowość zaplanowanych badań. W skład całkowitego dorobku naukowego Doktorantki wchodzi współautorstwo 5 artykułów w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 2 rozdziałów monograficznych oraz udział w konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym, których efektem jest 8 wystąpień ustnych i 6 doniesień zjazdowych. Należy również wspomnieć, że mgr. Marta Biesiekierska swoje doświadczenie naukowe wzbogaciła o badania w ramach realizacji Doktoranckiego Grantu Badawczego oraz jako wykonawca w projekcie Harmonia finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, a którego Kierownikiem jest Pani Promotor Prof. Aneta Balcerczyk.

Podsumowując, w oparciu o ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz dorobku naukowego stwierdzam, że mgr. Marta Biesiekierska spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (z późn. zm.). Badania, których efektem jest oceniana monografia, stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologicznej. Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologicznej o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Marty Biesiekierskiej i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Biesiekierskiej.

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. Na uznanie zasługuje wybrany model badawczy obejmujący modyfikacje ekspresji badanego genu zarówno w kierunku wyciszenia jak i nadekspresji. Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę w zakresie zarówno zmian metabolicznych, fenotypowych badanych modeli komórkowych jak i wpływu badanego genu/białka na cykl komórkowy, proliferację, inwazyjność i migrację. Uzyskane wyniki dotyczące przestawienia niemodyfikowanych komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych jako źródła energii w warunkach obniżonego dostępu glukozy, pomimo negatywnej konkluzji, nie zamykają tematu i poddają pod dyskusję stosowanie diety ketogennej jako uzupełnienie leczenia onkologicznego.

KIEROWNIK
Katedra Biochemii Klinicznej

dr hab. Marek Foksinski/ prof. UMK