



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

dr hab. inż. Małgorzata Zakłós-Szyda, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Łódź, dnia 14.09.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Biesiekierskiej
na temat „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.

Podstawę prawną wykonanej recenzji stanowi Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo
o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) oraz
decyzja Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki
biologiczne z dnia 27 czerwca 2023 r.

Ocena układu rozprawy

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla
doktorskich prac eksperymentalnych i zawiera 13 rozdziałów. Praca składa się ze 112 stron
tekstu wzbogaconego o 33 ryciny i 8 tabel. Po spisie treści pojawia się informacja dotycząca
źródeł finansowania badań, wykaz skrótów zawierający polskie i angielskie odpowiedniki,
wstęp i cele pracy, w których którym mgr inż. Marta Biesiekierska przedstawia powody
podjętej tematyki oraz etapy mające doprowadzić do osiągnięcia założonego celu.
W kolejnych rozdziałach przedstawiono sposób przygotowania modeli badawczych, materiał
biologiczny wykorzystany w badaniach oraz metody badawcze zastosowane w pracy. Po
rozdziale opisującym uzyskane przez Doktorantkę wyniki znajduje się ich dyskusja,

podsumowanie wyników i wniosków oraz uwagi podsumowujące. Do pracy dołączono polskie i angielskie streszczenie, a także dorobek naukowy Doktorantki (publikacje naukowe, rozdziały w monografiach, doniesienia konferencyjne, plakaty).

Praca doktorska dotyczy powiązania wpływu diety ketogenicznej i generowanych ciał ketonowych w terapii nowotworów, w szczególności raka szyjki macicy. Temat ten jest niezwykle ciekawy i aktualny, gdyż zgodnie z danymi WHO choroby nowotworowe należą do najistotniejszych problemów zdrowotnych XXI wieku. Mimo postępującego rozwoju technik farmakologicznych, to dotychczas nie poznano skutecznej terapii tego typu schorzeń. Natomiast coraz więcej danych wskazuje na potencjalne działanie prewencyjne i wspomagające leczenie przez składniki diety. Aktywność prozdrowotną przypisuje się nie tylko fitozwiązkom, ale także makroskładnikom, które istotnie mogą regulować stan metaboliczny organizmu. Dieta ketogeniczna, która jest dietą bardzo niskowęglowodanową, natomiast wysokotłuszczową, okazała się mieć działanie terapeutyczne w leczeniu padaczki, ale także chorób o podłożu metabolicznym, jak cukrzyca i otyłość. Dziecie tej towarzyszy wytwarzanie ciał ketonowych, które są wykorzystywane jako źródło energii, ale mogą one także pełnić rolę cząsteczek sygnałowych. Ze względu na efekt Warburga, zablokowanie glikolizy oraz fermentacji mleczanowej w komórkach nowotworowych wydaje się mieć znaczenie antynowotworowe. We wstępie teoretycznym pracy doktorskiej Autorka przedstawiła stan wiedzy w zakresie wpływu indukowanej ketozy na rozwój raka szyjki macicy, w tym na mikrobiom, jej udział w leczeniu nowotworów oraz na epigenom.

Sposób wprowadzenia mnie, jako czytelnika, do przedstawionej pracy oceniam bardzo wysoko. Autorka przedstawiła zagadnienia metabolizmu komórkowego związanego z procesem nowotworzenia, który jest tematem skomplikowanym, w sposób niezwykle płynny i pozbawiony natłoku zbędnych informacji mogących utrudniać zrozumienie poruszonej tematyki. Chociaż w pracy utrzymana została konwencja dotycząca nomenklatury genów, to jednak w treści czasami przemyka się użycie terminu „mikroflora”, zamiast „mikrobiota”. Autorka wykazała się w pracy bardzo dobrą znajomością poruszanej tematyki powołując się na 200 pozycji literaturowych. W większości są to oryginalne prace anglojęzyczne, opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat. Dobór piśmiennictwa przez Doktorantkę nie budzi najmniejszych zastrzeżeń.

Układ przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko z uwagi na jej bardzo przejrzysty charakter, wysokie walory estetyczne, a także zrozumiały i piękny język narracyjny.

Wskazanie oraz ocena celu pracy Kandydatki

Celem rozprawy Pani mgr inż. Marty Biesiekierskiej było sprawdzenie roli genu *OXCT1* kodującego transferazę bursztyniło-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT) oraz białka SCOT w regulacji potencjału metastatycznego (EMT) komórek raka szyjki macicy w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem modelowej ludzkiej linii komórek HeLa. W szczególności Doktorantka zbadała wpływ wybranych ciał ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoctanu) na aktywność biologiczną komórek HeLa, w tym komórek z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1*, a także z jego nadekspresją. Dodatkowo, podjęto próbę określenia wpływu ww. ciał ketonowych na wybrane modyfikacje potranslacyjne w komórkach HeLa.

W mojej ocenie cel pracy Doktorantki był bardzo ambitny, a jego osiągnięcie przedstawione w pracy stanowi niezwykle cenną wartość poznawczą nie tylko w obszarze nauki, gdzie jest podstawą do zasadności kontynuacji prowadzenia badań w zakresie regulacji metabolizmu komórek nowotworowych w oparciu o składniki diety, ale przede wszystkim w generowaniu zwyczajów dieto-terapeutycznych.

Wskazanie oraz ocena zastosowanych metod badawczych

Aby zrealizować postawiony sobie cel Doktorantka wykorzystwała nowoczesne i adekwatne narzędzia badawcze, do których zaliczyć można między innymi generowanie modeli komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie (o nazwie odpowiednio HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-}) ekspresją genu *OXCT1* metodą CRISPR/Cas9, co nie jest prostą czynnością i wymaga bardzo dużego nakładu pracy. Równocześnie prowadzono analogiczne badania na modelu z nadekspresją genu *OXCT1* uzyskaną na drodze transfekcji wektorem ekspresyjnym (model HeLa pIRES_*OXCT1*). Działania te pozwoliły na weryfikację wpływu ciał ketonowych na metabolizm komórek HeLa i ich potencjał do przejścia epitelialno-mezenchymalnego wykorzystując analizy morfologiczne (np. analizy mikroskopowe) i funkcjonalne (np. migracja, inwazja, test kometowy), pomiar ekspresji genów kodujących wybrane targety molekularne na poziomie mRNA (qRT-PCR) oraz białka (WB, immunohistochemia), a także analiza modyfikacji potranslacyjnych (WB, immunohistochemia). Podczas eksperymentów z uzyskanymi modelowymi wariantami komórek HeLa równolegle analizowano aktywność komórek kontrolnych (odpowiednio niemodyfikowanych (HeLa WT), a także transfekowanych pustym wektorem (HeLa pIRES)). Niemniej jednak procedura uzyskanych modeli opisana została w sposób dość ogólny, co wzbudziło mój niedosyt, gdyż bez dodatkowych wyjaśnień niemożliwym jest odtworzenie żadnego z wyżej przytaczanych eksperymentów. Podobnie, dokładniejszego

wyjaśnienia wymaga zastosowana przez Doktorantkę metoda wiszącej kropli (gdzie wg informacji komórki naniesione na wieczko szalki w postaci kropli i hodowano przez 7 dni), a także analiza potencjału migracyjnego i inwazyjnego (w zakresie fotografowania komórek znajdujących się na dolnej powierzchni membrany czy też na dnie dołka płytki). W przypadku prowadzonej analizy qRT-PCR ułatwieniem śledzenia przedstawionych wyników dla niewprawionego czytelnika byłoby uzupełnienie Tabeli 5 o słowną nazwę białek kodowanych przez geny, dla których analizy poziomu ekspresji podano sekwencje starterowe (w tym wskazanie źródła dla sekwencje starterów – opracowanie własne czy zaczerpnięte z publikacji). Wyjaśnienia wymaga także metodologiczny sposób analizy wyników służący do przedstawienia poziomu ekspresji genu *OXCT1* eksprymowanego w różnych liniach komórkowych (Rycina 12), w tym wskazania próby odniesienia.

W przypadku badań komórkowych Autorka nie zawsze konsekwentnie odnosiła się do gęstości komórek wymaganych do przeprowadzenia analiz. Natomiast moja ostatnia uwaga tyczy się analizy aktywności komórek z wykorzystaniem resazuryny oraz MTT. Obydwa testy bazują na określeniu aktywności metabolicznej komórek na podstawie pomiaru ilościowego produktu powstałego na drodze enzymatycznej, natomiast Doktorantka ocenia z ich wykorzystaniem proces proliferacji komórek. Proces proliferacji komórek można określić raczej poprzez pomiar tempa syntezy DNA, np. z wykorzystaniem znacznika BrdU lub testu CyQuant. Prosiłabym także o odniesienie się Doktorantki w tym względzie do zastosowania w pracy H_2O_2 oraz *tert*-BOOH jako cytostatyków.

Pragnę jednak zaznaczyć, że przedstawione powyżej uwagi nie stanowią w żadnym razie krytyki zastosowanych metod badawczych, a są raczej uwagami recenzenta. Reasumując, oceniam wybór i zastosowanie metod badawczych, które są nowoczesne, ale niełatwe do wykonania, jako prawidłowe i adekwatne dla osiągnięcia założonych celów badawczych.

Ocena części rozprawy doktorskiej dotyczącej omówienia wyników badań

Rozdział Wyniki jest przygotowany przejrzysto, z dobrze dobranymi wykresami, tabelami oraz zdjęciami mikroskopowymi ilustrującymi otrzymane wyniki. Wyniki nie pozostawiają wątpliwości, które z określonych różnic są istotne statystycznie. Nieczęsty brak bezpośredniego opisu rycin (np. Rycina 25, 26) wynagradza jednak dokładne prześledzenie tekstu odnoszącego się do przedstawionych wyników.

Doktorantka wykazała, że stopień poziomu ekspresji genu *OXCT1* w komórkach HeLa (wyciszenie mono- lub bialleliczne, czy też nadekspresja) istotnie wpływa na podziały komórkowe, zdolność do tworzenia sfer w hodowli 3D, procesy naprawcze DNA, a także

wrażliwość na działanie wybranych cytostatyków stosowanych w terapii raka szyjki macicy (doksorubicyny i cisplatyny). Wiele z uzyskanych wyników nie jest jednoznacznych, co wskazuje na złożony charakter aktywności białka SCOT. Jednakże w przypadku komórek z biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1* zaobserwowano zwiększenie ich potencjału do migracji i inwazji, większą oporność na działanie doksorubicyny i cisplatyny, a także zwiększenie ekspresji czynnika SNAIL na poziomie mRNA i białka, który to został zidentyfikowany jako jeden z kluczowych regulatorów przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Komórki HeLa *OXCT1*^{-/-} cechował także spadek ekspresji genów i białek zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych, np. dehydrogenazy β -hydroksymaślanowej.

Doktorantka przeanalizowała także wpływ genu *OXCT1* na modyfikacje potranslacyjne białek histonowych związanych z aktywacją i wyciszeniem procesu transkrypcji. Brak wpływu wyciszenia *OXCT1* na poziom acetylacji i β -hydroksybutyrylacji histonów zaskoczył Doktorantkę, która podjęła się w tym zakresie dyskusji, co potwierdza jej dojrzałość w analizie uzyskanych wyników.

Zakończeniem pracy eksperymentalnej Doktorantki, która to praca musiała zostać w pewnym momencie zakończona i odzwierciedlona w recenzowanej dysertacji, jest przeprowadzenie wstępnych analiz wpływu ciał ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoctanu) w stężeniu odpowiadającym ketozie na przeżywalność komórek HeLa. Okazało się, że ciała ketonowe stymulują przeżywalność komórek hodowanych w medium symulującym hiperglikemię, natomiast zredukowanie stężenia glukozy zmniejszało przeżywalność komórek, szczególnie inkubowanych w obecności β -hydroksymaślanu. Uzyskany wynik może mieć przyszłe znaczenie aplikacyjne.

Reasumując, część Wyniki stanowi bardzo interesujący element pracy doktorskiej Pani Marty Biesiekierskiej. Chciałabym podkreślić, że umiejętne zaplanowanie przez nią badań, sformułowanie tez pracy i konsekwentne ich realizowanie dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym, a co więcej, mającym przesłanki w kierunku wykorzystania genu *OXCT1* jako narzędzia do poszukiwania i rozwoju substancji będących terapeutykami nowotworu raka szyjki macicy. Oczywiście, przedstawione badania zostały wykonane w warunkach *in vitro* na linii komórkowej, skąd jeszcze daleka droga do analiz *in vivo*, jednakże próba przedstawienia wpływu ciał ketonowych na metabolizm i funkcjonalność komórek z nadekspresją oraz wyciszeniem genu kodującego białko SCOT, pozwoliła na zidentyfikowanie zaangażowania genu *OXCT1* w kontrolowaniu podziałów komórek raka szyjki macicy sprzyjających promowaniu rozwoju guza. Pani Marta Biesiekierska w sposób wyczerpujący omówiła uzyskane wyniki i

odniosła się do danych tematycznych dostępnych w literaturze wskazując na dalsze potencjalne prace badawcze, które mogłyby uzupełnić uzyskane wyniki. Przy wyciąganiu wniosków wykazała się także ostrożnością odpowiedzialnej badaczki, która zdaje sobie sprawę, że jej praca dotyczyła ograniczonego fragmentu większej i skomplikowanej całości, i wymaga dalszego pogłębienia tego fascynującego zagadnienia, a więc oceny wpływu diety ketogenicznej na proces nowotworzenia. Biorąc pod uwagę, iż jednym z badanych ciał ketonowych był β -hydroksymaślan, chciałabym prosić o Doktorantkę o podjęcie próby bardziej dogłębnego wyjaśnienia działania tego związku, który wydaje się mieć działanie antynowotworowe.

Podsumowując, po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pani Marty Biesiekierskiej stwierdzam, że Doktorantka bardzo trafnie wybrała tematykę badań, jasno sformułowała cele pracy, dobrze zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością interpretacji i dyskusji oraz wyciągania właściwych wniosków, a także umiejętnie sformułowała podsumowanie pracy. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest więc kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera wiele nowatorskich elementów i spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, a w szczególności art. 187 wymienionej Ustawy, i w związku z tym **popieram wniosek o nadanie stopnia naukowego doktora** mgr inż. Marcie Biesiekierskiej.

Jednocześnie mając na uwadze niezwykle wysoki poziom merytoryczny rozprawy, kompleksowość i wysoką jakość przeprowadzonych badań, a także dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki będącej młodym badaczem (jest współautorką sumarycznie pięciu prac opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, współautorką dwóch rozdziałów w monografiach, oraz współautorką licznych doniesień konferencyjnych), wnioskuję by **wyróżnić recenzowaną pracę doktorską** z uwagi na jej wysoką wartość naukową i praktyczną oraz znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy naukowej. Chciałabym także pogratulować Promotorowi pracy, dr hab. Anecie Balcerczyk, prof. UŁ, wkładu w rozwój nauki, jak również młodej kadry naukowej i życzyć dalszych sukcesów na tym polu.

Marta Biesiekierska *Wiesława*