



Dr hab. Elżbieta Speina
Tel.: +48 22 592 3023
e-mail: elasp@ibb.waw.pl

Warszawa, 15.05.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Kamila Wojnickiego

The role of BLM and RecQL4 helicases in defining the response of glioma cells to chemotherapeutics

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Centrum Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie. Promotorem rozprawy jest Pani prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek. Pan Kamil Wojnicki opublikował czternaście artykułów naukowych o wysokim współczynniku wpływu, a trzy z nich są bezpośrednio związane z doktoratem.

A) Znaczenie i oryginalność tematu naukowego:

Prowadzone badania dotyczą biologii glejaków, łącząc nauki podstawowe wraz z dyscyplinami medyczno-klinicznymi. Glejaki są najczęstszymi pierwotnymi, złośliwymi nowotworami mózgu u osób dorosłych, które szybko się powiększają, są wysoce inwazyjne i śmiertelne. Ponieważ ta złożona heterogenna choroba często wiąże się z obecnością różnych zmian genomowych i epigenetycznych stanowi wyzwanie zarówno dla naukowców, jak i klinicystów. Pomimo znacznych postępów w badaniach molekularnych oraz odkryciu nowych i obiecujących środków terapeutycznych w postaci inhibitorów PARP, stosowanych w powiązaniu z klasyczną radio- i chemoterapią, nadal brakuje nowoczesnych metod leczenia zaawansowanych, lekoopornych guzów mózgu, dających przerzuty. Zatem potrzebne są dalsze badania w celu udoskonalenia strategii terapeutycznych oferowanych pacjentom z

zaawansowaną chorobą nowotworową. Projekt pracy doktorskiej oceniany w tym raporcie świetnie wpisuje się i kontynuuje poszerzanie wiedzy w tym zakresie, demonstrując pozytywny związek między podwyższonym wyrażaniem genów *BLM* i *RECQL4* a stopniem złośliwości glejaków oraz, co ważne, zmienioną odpowiedź komórek glejaków na stosowaną współcześnie terapię przeciwnowotworową po usunięciu genu *BLM*. Białka Blooma (*BLM*, *RECQ2*, *RECQL2*) i *REQL4* należą do rodziny helikaz *RecQ*. Ze względu na udział w procesach związanych z utrzymaniem stabilności genomu, takich jak: rekombinacja, replikacja i naprawa DNA, helikazy *RecQ* zaliczane są do białek nazywanych „strażnikami” genomu (ang. *caretakers of the genome*). Te 3'–5' helikazy DNA rozplatają szeroką gamę potencjalnie rekombinogennych struktur DNA, w tym połączenia czteroniciowe, pętle D i kwadrupleksy G DNA. Mutacje w genach kodujących helikazy *BLM* i *RECQL4* odpowiedzialne są za rzadkie choroby genetyczne. Jednocześnie komórki z niedoborem *BLM* wykazują znacznie wyższe, bo aż stokrotnie ryzyko transformacji nowotworowej w porównaniu do komórek zawierających w pełni funkcjonalną helikazę *BLM*. Ekspresja obu helikaz jest tkankowo-specyficzna; najwyższy ich poziom występuje w komórkach szybko dzielących się oraz w niektórych nowotworach złośliwych. Chociaż nadekspresja białka *BLM* była obserwowana w glejakach wielopostaciowych (ang. *glioblastoma multiforme*, *GBM*) już wcześniej, dane dotyczące mechanizmów molekularnych modulujących ekspresję *BLM* i roli białka *BLM* w rozwoju i oporności wielolekowej *GBM* pozostają nieznane. Dlatego celem badania było ustalenie jakie geny są regulowane w nieobecności *BLM* i czy zmiana ich poziomów (regulacja w górę lub w dół) wpływa na właściwości rakotwórcze komórek glejaków wielopostaciowych oraz czy zmienia ich wrażliwość wobec chemoterapii. Szczegółowe analizy wykonane przez Doktoranta pozwoliły następnie na określenie kluczowych procesów biologicznych, które ulegają zmianie po usunięciu genu *BLM*. Dogłębne poznanie tych procesów ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale zawiera również ogromny potencjał praktyczny, gdyż zwiększenie efektywności działania leków poprzez pokonanie oporności komórek neoplastycznych może być kluczowe dla powodzenia terapii. Uzyskane wyniki sugerują, że inhibitory *BLM* mogłyby być potencjalnymi lekami w ukierunkowanej terapii chorób nowotworowych. Być może będzie to nowy kierunek badań nad tą helikazą.

B) Znaczenie wyników:

Głównym celem pracy było wykazanie roli helikazy BLM (a także, choć w mniejszym stopniu, RECQL4) w rozwoju glejaka wielopostaciowego oraz w regulacji lekooporności wobec połączonej terapii temozolomidem i inhibitorami PARP. Badania przeprowadzono na modelowych liniach komórkowych wyizolowanych z guzów pacjentów cierpiących na glejaka wielopostaciowego. Ponadto mgr Wojnicki rozszerzył projekt o zbadanie potencjalnego powiązania między brakiem wyrażania obu helikaz a zaburzeniami rozwojowymi u zarodków żab *Xenopus*.

Badania przedstawione w rozprawie są nowatorskie. Doktorant wykazał, że BLM i RECQL4 ulegają silnej ekspresji w próbkach GBM i komórkach pochodzących z GBM, a nadmiar BLM koreluje ujemnie z przeżywalnością pacjentów. Warto zauważyć, że ekspresja obu helikaz w glejakiach o niskim i wysokim stopniu złośliwości znacznie się różniła, zarówno co do zawartości, jak i lokalizacji komórkowej. W niezmiennych patologicznie tkankach mózgu oraz w glejakiach o niskim stopniu złośliwości większość BLM znajdowała się w jądrze, podczas gdy w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości BLM miało lokalizację zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną. Ponadto ujawniono ujemną korelację między jądrową zawartością BLM a stopniem zaawansowania glejaka. Co ciekawe, w niezmiennych próbkach mózgu helikaza RECQL4 znajdowała się głównie w cytoplazmie, z niewielkim wybarwieniem jądrowym, natomiast jej zawartość zmniejszyła się w glejakiach o wysokim stopniu złośliwości. Aby rozszyfrować rolę BLM w ludzkich komórkach glejaka, Doktorant usunął fragment genu BLM za pomocą inżynierii genomowej i wyprowadził dwie linie komórkowe glejaka trwale pozbawione wyrażania białka BLM. Następnie wykonał szeroko zakrojone analizy transkryptomiczne, aby poszukać zmian różnicujących linie komórkowe pozbawione genu *BLM* w stosunku do kontrolnych, w tym także po traktowaniu temozolomidem wraz z inhibitorami PARP1. Dane te pokazały znaczące zmiany w profilach ekspresji licznych genów. Wykazano zmiany w regulacji wielu ścieżek metabolicznych, obejmowały one, w zależności od linii, adhezję, apoptozę, cykl komórkowy, kaskadę sygnałową MAPK i PI3K-Akt, naprawę DNA oraz senescencję. W dalszych badaniach, wykorzystując klasyczne techniki biologii

komórkowej i molekularnej ujawniono, że usunięcie genu *BLM* nie miało istotnego wpływu na przeżywalność komórek *in vitro*, natomiast czyniło je bardziej opornymi w stosunku do terapii przeciwnowotworowej, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego i kierując komórki glejaka na ścieżkę senescencji. Co ciekawe, wykorzystując komórki uprzednio skonstruowane w laboratorium prof. Kamińskiej-Kaczmarek, Autor pokazał, że niedobór RECQL4 nie ma wpływu na odpowiedź w stosunku do połączonej terapii temozolomidem i olaparibem. Na samym końcu zaprezentował znaczną śmiertelność oraz morfologiczne i funkcjonalne nieprawidłowości rozwojowe kijanek *Xenopus* po uszkodzeniu genów *blm* i *recql4*.

C) Metodologia:

Rozprawa napisana jest w języku angielskim, przejrzysta i poprawnie. Manuskrypt liczący 127 stron zawiera wszystkie elementy typowe dla pracy doktorskiej: wstęp, cele, wyniki, dyskusję i szczegółową metodologię. Cytowana literatura stanowi solidną podstawę badanej i omawianej tematyki – zacytowano ponad 350 publikacji.

- We wstępie Pan Wojnicki kompleksowo przedstawił aktualną wiedzę dotyczącą helikaz z rodziny RecQ oraz szczegółowo scharakteryzował dwie z nich. Wyczerpująco opisana jest również biologia glejaków i stosowane współcześnie terapie. Nie zabrakło też omówienia najnowszych ukierunkowanych terapii guzów mózgu z wykorzystaniem inhibitorów PARP1. Na końcu przedstawiono mechanizmy oporności komórek nowotworowych na stosowane leki. Tekst został wsparty bardzo dobrze dobranymi i przygotowanymi ilustracjami. Cytowana literatura jest adekwatna do opisywanej tematyki.
- Zaproponowane cele badawcze zostały dobrze określone i są spójne ze stanem wiedzy w badanej dziedzinie.
- Rozdział Materiały i Metody jest dobrze napisany i zawiera szczegółowe informacje na temat zastosowanych metod. Materiał badawczy stanowiły głównie pochodzące z GBM linie komórkowe LN18, LN229, T98G (T98), U87-MG (U87) i U251. Kandydat wykorzystał szeroki panel nowoczesnych technik badawczych. Zastosowano różne metody biologii

molekularnej, w tym: RT-qPCR, sekwencjonowanie RNA i ultra-głębokie sekwencjonowanie DNA, western blotting, konstrukcję komórek trwale wyrażających lub pozbawionych docelowych genów metodami inżynierii genetycznej oraz obrazowanie fluorescencyjne. Jako badacz o wysokich kwalifikacjach Doktorant nie tylko przeprowadzał eksperymenty, ale również, przede wszystkim odpowiednio analizował wygenerowane dane. Korzystał z dedykowanego oprogramowania, które umożliwia analizę statystyczną oraz tworzenie wysokiej jakości grafiki.

- Sekcja wyników jest opisana poprawnie. Podjęte doświadczenia w celu udzielenia odpowiedzi na pytania naukowe, które pojawiły się podczas badań, zostały starannie zaprojektowane i wykonane. Dane są ilustrowane doskonale dopracowanymi rycinami, wykresami i obrazami. Walidacja wyników przy użyciu różnych niezależnych technik została przeprowadzona prawidłowo. Analizę statystyczną i bioinformatyczną danych wykonano za pomocą odpowiednio dobranych testów.
- Dyskusja jest wnikliwa i właściwie konfrontuje uzyskane dane z dostępną literaturą. Dostarczone wyjaśnienia i interpretacja danych dowodzą, że Pan Kamil Wojnicki prezentuje wysoki poziom wiedzy i dojrzałość naukową, która umożliwia mu samodzielne prowadzenie badań.
- Wnioski kończące pracę zebrane są w zwarte punkty; zawierają one najważniejsze refleksje płynące z ocenianej tu rozprawy, co pozwala czytelnikowi w jasny sposób ocenić zawartość całości. Rozprawę uzupełnia streszczenie graficzne ilustrujące i podsumowujące najważniejsze uzyskane wyniki.

D) Pytania i uwagi:

Po przeanalizowaniu rozprawy, myślę, że jest kilka interesujących zagadnień, które mogą zasługiwać na dalsze omówienie podczas jej obrony. Zwracam się więc do Kandydata z prośbą o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- a) Zgromadzone w bazach dane wskazują, że wraz ze wzrostem stopnia złośliwości glejaka następuje „przesuwanie” białka BLM z jądra komórkowego do cytoplazmy. Co więcej, stan

taki powiązany jest ze wzrostem oporności na dostępne obecnie terapie, zarówno klasyczne, jak i celowane. Wydaje się, że znalezione mutacje w domenie sygnału lokalizacji jądrowej BLM mogą tylko w niewielkim stopniu wytłumaczyć ten fenomen, jako że wskaźnik mutacji w glejakach stopnia trzeciego wynosi tylko 1%. Czy Doktorant mógłby podjąć dyskusję na temat innych możliwych przyczyn. Czy wśród nich mogłaby znaleźć się taka, mówiąca o tym, iż białko BLM ulega uszkodzeniom pod wpływem wolnych rodników i produktów peroksydacji lipidów generowanych na podwyższonym poziomie w macierzy nowotworu, co wpływałoby na jego kierowanie do cytoplazmy w celu proteolizy? Tak więc, pomimo zwiększonej całkowitej zawartości białka BLM w komórce, jego poziom w jądrze glejaków stopnia 2, 3 i 4 ulegałby zmniejszeniu. Czy to mogłoby tłumaczyć słabszą naprawę DNA w takich komórkach i większą niestabilność genomu prowadzącą do wzrastania stopnia złośliwości?

- b) W sekcji Materiały i Metody przydałaby się krótka charakterystyka wymienionych linii komórkowych wykorzystanych do badań, np. podanie istotnych informacji co do statusu białka p53 i enzymu naprawiającego uszkodzenia alkilacyjne, metylotransferazy O⁶ metyloguaniny DNA. Informacje te pojawiają się dopiero w dużo dalszej części opisu wyników.
- c) Sekcja Wyniki, str. 55, Figura 2B: ciekawa jestem, czy istnieje różnica w poziomie i wzorze mutacji w genie *BLM* pomiędzy glejakami o wysokim i niskim stopniu złośliwości? Poproszę o komentarz.
- d) Str. 55, Figura 3C: jakiego testu statystycznego użyto do oznaczenia korelacji pomiędzy BLM a pozostałymi helikazami RECQ? Informacji tej zabrakło w M&M i/lub pod opisem figury. Nie określiłabym korelacji w granicach 0,3 mianem silnej.
- e) Str. 58, Figura 6A i B: jak Autor mógłby wyjaśnić tak duże różnice pomiędzy wyrażaniem mRNA a białka BLM w liniach komórkowych glejaka? Czy przyczyną może być to, że RNA ulega uszkodzeniu w warunkach podwyższonego stresu oksydacyjnego i ulega szybszej degradacji, co mogłoby skutkować obniżonym poziomem translacji?
- f) Str. 68, Figura 14: w jakim celu zastosowano jodek propidyny do oznaczenia granularności komórek?

- h) Str. 71 i 81, Figura 16 i 26: Szkoda, że Autor nie zdecydował się zamieścić przykładowych histogramów pokazujących przebieg cyklu komórkowego.
- i) Na stronie 91 (ostatni paragraf) oraz 100 (przedostatni paragraf) Dyskusji Doktorant powołuje się na wyniki własne, które jednak nie zostały pokazane w rozprawie, nie ma też do nich odwołania w literaturze. Chodzi mianowicie o brak obserwacji podwyższonego wyrażania białka RECQL4 w komórkach BLM-KO.
- j) W spisie literatury bardzo pomocne w odnalezieniu prac byłoby podanie numerów DOI i/lub PMID, zwłaszcza że w dużej części cytowanych publikacji zdecydowano się podać nazwisko tylko pierwszego autora.

E) Ocena końcowa:

Doktorant przedstawił wyniki oryginalnych badań przeprowadzonych w zakresie mechanizmów molekularnych związanych z odpowiedzią komórek glejaka na nowoczesne terapie. Rozprawa charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym, a uzyskane wyniki stanowią ważny wkład w badania nad rolą helikaz z rodziny RecQ w biologii komórek GBM. Biorąc pod uwagę zainteresowanie terapią celowaną w leczeniu nowotworów oraz ciągłą potrzebę nowych podejść terapeutycznych, które mogą doprowadzić do przezwyciężenia oporności, uważam, że praca może mieć potencjalny wpływ na przyszłe zastosowanie translacyjne w postaci opracowania nowatorskich strategii leczniczych. Na tej podstawie **stwierdzam, iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).** Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana mgra Kamila Wojnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na zawartość recenzowanej pracy, jej poziom naukowy, istotność tematyki oraz dorobek naukowy Doktoranta w postaci doskonałych publikacji **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.**

Eulenia Speina

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, profesor UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Polska
Tel.: +48 426354144
e-mail: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Wojnickiego pod tytułem

„The role of BLM and RecQL4 helicases in defining the response of glioma cells to chemotherapeutics”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Kamila Wojnickiego została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek w Laboratorium Biologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy roli helikazy BLM w odpowiedzi komórek glejaka na działanie związku alkilującego DNA – Temozolomidu, inhibitora białek PARP uczestniczących w naprawie DNA – olaparibu, a także kombinacji tych leków. Obydwa związki zostały dopuszczone przez Food and Drug Administration do leczenia odpowiednio glejaków oraz nowotworów piersi, jajników i prostaty charakteryzujących się obecnością germinalnej, uszkadzającej mutacji w genach *BRCA1* lub *BRCA2*. Skuteczność łączenia wspomnianych leków testowano wcześniej na zaawansowanym mięsaku gładkokomórkowym macicy, nawrotowym drobnokomórkowym raku płuc oraz glejakach z mutacjami w obrębie genu dehydrogenazy izocytrynianowej (*IDH*). W przedłożonej do oceny pracy podjęta została próba określenia możliwości wykorzystania helikazy BLM jako potencjalnego celu farmakologicznego w terapii glejaków wyższego stopnia, w których zaobserwowano nadekspresję badanej helikazy. Hipoteza badawcza zakłada, że brak aktywności BLM, która podobnie jak PARP1 jest zaangażowana w naprawę uszkodzeń DNA, może wpływać na cytotoksyczność kombinacji Temozolomidu i Olaparibu względem komórek glejaka.

Postawiony cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska, ponieważ wyniki uzyskane w trakcie jego realizacji w istotny sposób przyczyniają się do poszerzenia wiedzy oraz rozwiązują oryginalny problem naukowy.

Przedłożona rozprawa doktorska ma typowy układ, w skład którego wchodzi streszczenie, wstęp, opis celu pracy, metodyka, rozdział z wynikami, dyskusja, podsumowanie i konkluzje, abstrakt graficzny oraz bardzo obszerny wykaz literatury, na którą powoływał się mgr Kamil Wojnicki. Wstęp jest obszerny, wprowadza w przystępny sposób do zagadnień związanych z rodziną helikaz RecQ, do których należą między innymi BLM i RecQL4, ich struktury, roli w naprawie DNA i ich wzajemnych interakcji. Przedstawiona została molekularna klasyfikacja glejaków z typowymi dla każdego podtypu mutacjami oraz strategię terapeutyczne i przyczyny niepowodzeń ich leczenia. Szczegółowo opisane zostały stosowane w pracy leki – Temozolomid i Olaparib,

mechanizm ich działania ze zwróceniem uwagi na powód, dla którego zostały wykorzystane w pracy doktorskiej. Mgr Kamil Wojnicki poruszył także zagadnienia starzenia komórkowego oraz tworzenia komórek poliploidalnych jako mechanizmów odpowiedzialnych za niską skuteczność terapii. W zrozumieniu opisanych zagadnień pomagają przemysłane i przejrzyste ryciny.

Cel pracy jest jasno zdefiniowany, chociaż w opinii Recenzenta można pominąć pierwsze trzy zdania. Racjonalne uzasadnienie podjęcia tematu wynika ze wstępu, a obecny początek opisu celu pracy jest wyłącznie streszczeniem wybranych, chociaż istotnych dla sformułowania celu zagadnień.

Metodyka rozprawy jest opisana w sposób wyczerpujący, umożliwiając odtworzenie warunków eksperymentalnych. Na uwagę zasługuje mnogość i różnorodność stosowanych procedur. Mgr Kamil Wojnicki wykorzystał w pracy dostępne bazy danych, hodowle i testy komórkowe, technikę CRISPR/Cas9 w celu wyciszenia BLM, analizę ekspresji genów z wykorzystaniem techniki real-time PCR i sekwencjonowania nowej generacji, analizę bioinformatyczną uzyskanych danych oraz hodowlę i charakterystykę żabich kijanek z prawidłowym i wyciszonym poziomem *blm* i *rq4*.

Wyniki opisane są w sposób logiczny, tworzą przemyślany ciąg przyczynowo-skutkowy. Za istotne Recenzent uważa wykazanie zależności pomiędzy stopniem złośliwości glejaków, ich rodzajem a poziomem ekspresji BLM. Wzrost poziomu BLM wraz ze stopniem złośliwości może sugerować udział helikazy w progresji nowotworu. Potwierdzać się to wydają wyniki oceny stopnia proliferacji i żywotności komórek, gdzie wyciszenie BLM powodowało spadek tempa podziałów mitotycznych. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy zastosowane do oceny proliferacji i żywotności techniki nie mierzą przypadkiem tego samego? O ile test z wbudowywaniem bromku urydyny nie pozostawia wątpliwości co do mierzonego parametru, którym jest tempo replikacji DNA, o tyle test MTT ocenia liczbę metabolicznie aktywnych komórek w hodowli, która może być niższa przy obniżonym tempie podziałów, w szczególności gdy odczytu dokonano po 72 godzinach. Czym miałby być spowodowany spadek żywotności komórek po wyciszeniu BLM? Czy komórki umierałyby spontanicznie w hodowli przy braku BLM? Wynik co prawda nie jest istotny statystycznie przez wzgląd na duży błąd, którym obciążony był pomiar, ale średnia wartość dla linii LN229 wskazuje na spadek żywotności poniżej 75%. Potrzebne byłoby tutaj niewątpliwie dodatkowe powtórzenia eksperymentu. Na co może wskazywać niższy stopień korelacji pomiędzy poziomem BLM a tempem podziałów mitotycznych komórek (Fig. 4 - Wyniki; BLM vs G1S i G2M), gdy wyciszenie BLM nieznacznie ale obniża tempo proliferacji komórek w badanych liniach? Jaki jest tego możliwy mechanizm opierając się na danych z sekwencjonowania RNA (LN18+LN229 KO vs WT)? Redystrybucja BLM i wzrost frakcji cytoplazmatycznej w komórkach bardziej niezróżnicowanych może wskazywać na udział BLM w innych komórkowych kaskadach sygnałowych. Czym jeszcze oprócz mutacji pojedynczych aminokwasów w domenie C-końcowej może być spowodowana redystrybucja BLM z jądra do cytoplazmy w komórkach o wyższym stopniu złośliwości? Czy oprócz białek uczestniczących w naprawie DNA (Fig. 4 - Wstęp) znany jest inny interaktom BLM, który mógłby wskazywać na zaangażowanie tego białka w wewnątrzkomórkowe procesy zachodzące między innymi na terenie cytoplazmy? Uzyskane przez mgr. Kamila Wojnickiego wyniki dotyczące ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji helikazy BLM wnoszą cenny komponent poznawczy z punktu widzenia zarówno patofizjologii glejaków, jak i ich leczenia, a także nieznanej dotychczas roli BLM w funkcjonowaniu komórek, która wymaga dalszych badań.

Kolejnym istotnym zagadnieniem poruszonym w przedłożonej do recenzji pracy jest starzenie komórek, na które wpływ ma BLM w komórkach dwóch wybranych linii glejaków. Jak wykazały dane z różnicowej ekspresji, wyciszenie BLM istotnie zwiększa poziom ekspresji genów zaangażowanych w proces starzenia. Czy brak BLM powoduje również zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w endoreduplikację (GO:0042023, GO:0032875, GO:0032876, GO:0032877)? Czy zaobserwowano zmiany w transkrypcji tych genów po dodaniu kombinacji leków w komórkach pozbawionych BLM? Informacja o wpływie BLM na transkrypcję genów odpowiedzialnych za endoreduplikację byłaby uzupełnieniem wyników prezentowanych na wykresie 17, gdzie Temozolomid i Olaparib powodowały silny wzrost frakcji komórek poliploidalnych w linii LN18 z wyciszonym BLM.

Zaskakujący, aczkolwiek bardzo skrupulatnie dowiedziony przez mgr. Kamila Wojnickiego, jest wpływ BLM na śmierć komórek indukowaną kombinacją Temozolomidu i Olaparibu, a także innych inhibitorów PARP. Według danych uzyskanych z różnicowej ekspresji genów jednoczesne podanie Temozolomidu i Olaparibu powoduje wzrost transkrypcji tych, które odpowiedzialne są za między innymi naprawę uszkodzeń DNA, ale również przebieg cyklu komórkowego i starzenie. Pomimo stosunkowo nielicznych mutacji prowadzących do powstania dysfunkcyjnego białka BLM, wyniki te powinny skłonić do ostrożnego stosowania Temozolomidu w połączeniu z inhibitorami PARP w innych typach nowotworów i dokładnego przyjrzenia się prawdopodobnym efektom ubocznym, do których w tym przypadku zaliczyć należy powstawanie komórek poliploidalnych mogących odpowiadać za nieskuteczność chemioterapii.

Wszystkie wyniki zostały opracowane w sposób przejrzysty i czytelny, z naniesioną właściwie przeprowadzoną analizą statystyczną. Legendy ułatwiają zrozumienie przedstawianych na wykresach i schematach danych. Wyniki zostały logicznie podzielone według opisywanych zagadnień co świadczy o dużym wkładzie i wysiłku Doktoranta w przygotowanie rozprawy doktorskiej.

W dyskusji mgr Kamil Wojnicki poruszył wszystkie najważniejsze zagadnienia, którym poświęcona była praca. Ma ona jednak charakter bardzo zachowawczy. Nie podjęto w niej próby funkcjonalnego i molekularnego powiązania aktywności helikazy BLM z p53 i PARP1 w między innymi indukowanej przez Temozolomid i inhibitory PARP polinukleacji czy żywotności w oparciu o chociażby doniesienia literaturowe. Zabrakło mi również hipotezy dotyczącej braku całkowitego zniesienia efektu mutacji p53 na poziom poliploidii w komórkach pozbawionych BLM i traktowanych kombinacją leków po wyindukowaniu w komórkach dzikiego wariantu p53. Zaobserwowany spadek odsetka komórek poliploidalnych po transfekcji komórek dzikim p53 nie przekracza 15% na wykresie 17. Czy inne czynniki mogą determinować powstawanie komórek poliploidalnych w badanym układzie?

Pomocny dla zobrazowania licznych wyników uzyskanych w różnych układach i kombinacjach okazał się abstrakt graficzny, który w prosty i przystępny sposób obrazuje najistotniejsze różnice w badanych układach.

Bibliografia jest bardzo obszerna i wskazuje na bardzo dobre zapoznanie się mgr. Kamila Wojnickiego z badaną i opisywaną tematyką.

Pan mgr Kamil Wojnicki jest współautorem 14 prac, a wyniki rozprawy doktorskiej znalazły się w 3 z nich.

Wniosek końcowy

Pomimo kilku uwag i pytań, które mają na celu zainspirowanie mgr. Kamila Wojnickiego do dalszego zgłębiania zagadnień mogących rozwinąć zakres tematyczny pracy, bardzo wysoko oceniam przedłożoną do oceny rozprawę. W szczególności na uznanie zasługuje wykazanie nadekspresji BLM w bardziej złośliwych typach glejaków oraz udziału helikazy w regulowaniu odpowiedzi komórek na kombinację Temozolomidu i inhibitorów PARP. Dla rozwoju dyscypliny istotne jest zwrócenie uwagi na możliwą nową ścieżkę funkcjonalną, w której skład wchodzi PARP1, BLM i p53 oraz częściowa redystrybucja BLM z jądra komórkowego do cytoplazmy. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz zakres zastosowanych metod i technik badawczych świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym Doktoranta. Jakość zaprezentowanych wyników oraz wyciągnięte ostrożne wnioski potwierdzają oryginalność rozwiązania problemu naukowego, dojrzałość naukową mgr. Kamila Wojnickiego oraz umiejętność samodzielnego rozwiązywania sformułowanych problemów naukowych.

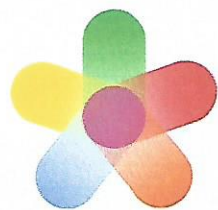
Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Kamila Wojnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę mnogość zastosowanych technik badawczych oraz logicznie przeprowadzony ciąg badań wiążący ze sobą kolejno uzyskiwane wyniki, które zostały zaprezentowane w sposób przyczynowo-skutkowy, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Z poważaniem

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ



Warszawa 25.05.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KAMILA WOJNICKIEGO

pt. "The role of BLM and RecQL4 helicases in defining the response of glioma cells to
chemotherapeutics"

Rozprawa doktorska pana mgr Kamila Wojnickiego jest wartościowym i nowatorskim wkładem w badanie helikaz z rodziny RecQ jako modulatorów odpowiedzi na eksperymentalne terapie antynowotworowe w ludzkim glejaku.

Rozprawa składa się ze streszczenia wyników, wprowadzenia teoretycznego dotyczącego przede wszystkim rodziny helikaz RecQ oraz protokołów terapii testowanych w leczeniu glejaków, dokładnego opisu metodologii, a następnie omówienia wyników. Rozprawa zamknięta jest dyskusją, szeroko omawiającą powiązania z innymi badaniami oraz zwięźle odnoszącą się do tych wyników doświadczalnych z rozprawy, które mogły wydać się zaskakujące. Całość pozwala ocenić wkład pana Wojnickiego w prowadzonych badaniach jako kluczowy, a znajomość omawianych zagadnień jako bardzo dobrą. Rozprawa jest napisana zwięźle, klarownie, z dobrą znajomością języka angielskiego.

Najciekawszą konkluzją z wyników naukowych wydaje się obserwacja, iż usunięcie helikazy BLM oraz, w dalszej części wyników - także helikazy RecQL4, metodą CRISPR-Cas9 z komórek glejaka, zwiększa oporność komórek na część użytych protokołów terapeutycznych, szczególnie kombinację temozolomidu (TMZ) i olaparibu (OLA). Był to wynik być może o tyle nieoczekiwany (przynajmniej przez recenzenta), że poziom badanych helikaz jest często podwyższony w złośliwych glejakach, a wcześniejsze opisane w rozprawie badania sugerowały, że ich usunięcie mogłoby stworzyć okno terapeutyczne dla szeregu inhibitorów systemów naprawczych DNA (np. inhibitorów PARP). Doktorant bardzo rzetelnie podszedł do sprawdzenia mechanizmów reakcji komórek na usunięcie badanych helikaz +/- protokoły terapeutyczne – badając zarówno procesy śmierci czy senescencji komórek, jak profile ekspresji genów w serii testowanych warunków. Wyniki pozwalają wyciągnąć wstępny wniosek, że w analizowanych glejakach helikazy RecQ mogą być czynnikiem uwrażliwiającym, a nie podnoszącym oporność na badane leki. Ciekawym dodatkiem do wyników uzyskiwanych w większości w linach komórkowych *in vitro* jest zbadanie efektu deplecji BLM i RecQL4 na rozwój embrionalny u żab z rodzaju *Xenopus*.

Ogólna zawartość naukowa rozprawy, konsekwencja i dokładność przedstawionych wyników, także pod względem graficznym i statystycznym, są dla mnie jej najsilniejszymi aspektami – to zbiór bardzo rzetelnie wykonanych badań o dużej wartości, podparty dogłębną wiedzą doktoranta w temacie. Moją jedyną uwagą jest względnie skrótowe podejście – zarówno w wynikach, jak dyskusji – do najciekawszej dla mnie kwestii uwrażliwiania komórek glejaka na stosowane inhibitory przez obecność badanych helikaz, a ich nie usunięcie. Być może te kwestie były badane bardziej szczegółowo w innych projektach, przez inne grupy badawcze, czy już po napisaniu rozprawy – a być może dopiero będą zbadane. Dlatego pozwalam sobie z ciekawości zadać na koniec dwa dodatkowe pytania dotyczące tego tematu.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Przeszłam Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN wniosek o dopuszczenie mgr Kamila Wojnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Moje dodatkowe pytania naukowe:

1. Czy na podstawie uzyskanych w ramach doktoratu wyników RNA-seq można wyznaczyć grupę celów molekularnych – niekoniecznie tylko innych helikaz – wśród których warto wykonać ograniczony test przesiewowy (np. siRNA, inhibitorów) w poszukiwaniu kompensatorów usunięcia helikaz DLM i RecQL4. Tego typu kompensatory mogą okazać się kluczowe do uwrażliwienia komórek glejaka z zahamowanymi helikazami RecQ. Jeśli tak – to które szlaki/grupy genów byłby najlepszymi kandydatami do takiego przebadania według doktoranta?
2. Czy wpływ usunięcia badanych helikaz na wrażliwość na leki był zwalidowany innymi metodami/w innych modelach? Czy np. użycie siRNA lub wspomnianego w rozprawie inhibitora BLM ma podobny efekt jak jej trwałe usunięcie? Czy istnieje różnica w reakcji komórek niestrasformowanych nowotworowo i nowotworowych na usunięcie/wyciszenie/inhibicję DLM i RecQL4 oraz podanie badanych leków? Odpowiedzi na te pytania mogą pomóc zrozumieć na ile specyficzne jest obserwowane w komórkach glejaka zwiększenie oporności na wybrane substancje po zahamowaniu helikaz RecQ.

Z gratulacjami i wyrazami szacunku



Dawid Walerych