

Ocena

pracy doktorskiej mgr Tomaša Pilžysa

„Aktywność białek z rodziny AlkB w warunkach homeostazy i stanach patologicznych”

Naprawa DNA przez bezpośrednią rewersję, choć ewolucyjnie „przyćmiona” przez naprawę przez wycinanie zasad i naprawę przez wycinanie nukleotydów, odgrywa ważną rolę w reakcji komórki na uszkodzenia DNA, a w szczególności w reakcjach adaptacyjnych do związków uszkadzających DNA u organizmów niższych. Rodzina białek AlkB, a ściślej rodzina dioksygenaz AlkB zależnych od Fe(II) i α -ketoglutarenu, stanowi klasę enzymów naprawy DNA przez bezpośrednią rewersję usuwających alkilowanie addukty z zasad azotowych DNA i RNA przez oksydacyjną dealkilację. Prototypem tej rodziny jest białko AlkB *Escherichia coli* chroniące genom bakteryjny przed alkilacyjnymi uszkodzeniami DNA i biorące udział w reakcji adaptacyjnej do związków alkilujących. Zidentyfikowano 9 homologów białka AlkB u ssaków (ALB1-8 i FTO), lecz nie wszystkim można przypisać bezpośredni udział w naprawie DNA/RNA. Występowanie homologów AlkB jest w pewnym sensie zaskakujące, bo nie występują one u bakterii anaerobowych, lecz mogą być kodowane przez jednoniciowe wirusy RNA infekujące rośliny. Dlatego ważne są badania nie tylko nad funkcjami, ale także występowaniem tych enzymów. Działanie białek rodziny AlkB jest ważne, gdyż usuwają one uszkodzenia DNA/RNA, z których wiele jest promutagennych, a także blokuje proces replikacji DNA. Pomimo, że nasza wiedza o funkcjach i aktywnościach komórkowych dioksygenaz rodziny AlkB wzrasta, a lista substratów, dla poszczególnych członków rodziny, w szczególności homologów występujących u człowieka, jest (prawie) kompletna, dalej bez jednoznacznych odpowiedzi pozostaje szereg pytań dotyczących specyficznej regulacji tych białek, w szczególności ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji i związkiem z transformacją nowotworową, poprzez funkcjonowanie genów kodujących białka rodziny AlkB jako geny supresorowe, ale i jako geny, których produkty mogą przyczyniać się do oporności na chemoterapię i promować wzrost guzów. Dlatego podjęcie tematu wiążącego się z badaniami mechanizmu udziału enzymów rodziny AlkB w transformacji nowotworowej oraz ich występowaniem w różnych organizmach przez doktoranta, pana Tomaša Pilžysa i promotor jego rozprawy, Panią profesor Elżbietę Grzesiuk, światowej klasy specjalistkę w zagadnieniach związanych z naprawą DNA, uważam za uzasadnione. Doktorant w swej pracy badał udział enzymów rodziny AlkB u człowieka, świni i (konceptyjnie) *Arabidopsis*. Badania prowadził na materiale pozyskanym z guzów nowotworowych, tkanek świni i liniach komórkowych nowotworów człowieka. Podążał więc chyba najbardziej „pożądanymi” nurtami badań nad rodziną AlkB, o czym świadczyć może

opublikowanie wyników badań, w których brał udział, i przemyśleń nad nimi, w liczących się czasopiśmie. W takim ujęciu tematyka rozprawy może być uważana za oryginalną w szerokim rozumieniu znaczenia tego słowa.

W pracy podano jako źródło finansowania trzy granty, dwa z Narodowego Centrum Nauki, jeden z Funduszy Norweskich, lecz brak informacji o kierownikach owych grantów.

Tytuł rozprawy jest nieco „tajemniczy”, charakteryzuje się stopniem ogólności nieznajdującym uzasadnienia w zakresie przeprowadzonych badań. Może lepiej byłoby skonkretyzować owe „stany patologiczne”? I dać człowieka, świnię i *Arabidopsis*?

Podstawę rozprawy doktorskiej pana Pilżysa stanowią 3 publikacje, w pierwszej z nich Doktorant jest pierwszym autorem, z zaznaczeniem równorzędności udziału z dwoma innymi współautorami, w drugiej i trzeciej pracy jest wymieniany na drugiej pozycji, z zaznaczeniem równego udziału, co pierwszy autor. Pierwsza praca została opublikowana w *Scientific Reports* (*impact factor* 3,998 i 100 pkt. MNIŚZW) i jest firmowana przez 15 współautorów, praca druga także w *Scientific Reports* i podpisało się pod nią 9 autorów. Trzecia praca to praca przeglądowa w *IUBPM Life* (*impact factor* 3,244 i 100 pkt. MNIŚZW), także z udziałem 9 współautorów. Z pierwszej analizy tych prac wynika, że:

1. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie mających dobry współczynnik oddziaływania.
2. Mgr Tomasz Pilżys odgrywał znaczącą rolę w powstaniu każdej z nich.
3. Prace te są wieloautorskie (do 15 współautorów)
4. Brak pracy z wyraźnie zaznaczoną pozycją pierwszego autora, tzn. dzielącego tej pozycji z innym współautorem.

Prace te zostały krótko omówione w opracowaniu Doktoranta. Po zakończeniu omówienia każdej z nich mgr Tomasz Pilżys krótko przedstawia swój wkład w jej powstanie i w każdym przypadku jest on znaczący: udział w planowaniu i rozwijaniu koncepcji badań, pobieranie materiału biologicznego, wykonanie oznaczeń, znaczący wkład w pisaniu i edytowaniu tekstu prac. Do opracowania dołączone są oświadczenia współautorów wszystkich trzech prac, opisujące ich udział w powstanie danej pracy. Żadne z nich nie kwestionuje znaczącej roli mgr. Tomasa Pilżysa w powstanie prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Nie uważam, aby rolą recenzenta rozprawy doktorskiej przedstawianej jako zbiór publikacji, było powtórne ich recenzowanie, ale z drugiej strony, oprócz ogólnej oceny wartości tych prac, zdeterminowanej głównie przez rangę czasopism, w jakich zostały opublikowane, oraz oceny udziału Doktoranta w ich powstaniu, uważam za celowe podniesienie tych ich aspektów, które mogą mieć znaczenie dla oceny tych prac jako składowych rozprawy doktorskiej.

Praca „*ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy*” opublikowana w *Scientific Reports* jest pracą doświadczalną, w której mgr Tomasz Pilżys jest pierwszym autorem, jednak z zastrzeżeniem równego wkładu z dwoma innymi współautorami. W pracy tej stwierdzono nadekspresję genów kodujących białka rodziny ALKH w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi (HNSCC). Stwierdzono również pozytywną korelację pomiędzy ekspresją

ALKBH3 i FTO i rozmiarami guza. Jednym z najważniejszych, jeśli nie najważniejszym wynikiem tej pracy jest stwierdzenie cytoplazmatycznej lokalizacji białek ALKBH2 i 5 w HNSCC. Badania na materiale klinicznym zostały potwierdzone w szeregu nowotworowych linii komórkowych człowieka. Wyciszenie ALKBH poprzez siRNA w komórkach HeLa powodowało spadek ich żywotności. Dodatkowo w pracy przebadano szereg potencjalnych inhibitorów ALKBH i przedyskutowano ich potencjał terapeutyczny w nowotworach złośliwych. W pracy jasno postawiono hipotezę badawczą i sposób jej weryfikacji na właściwie dobranym materiale biologicznym, a badania eksperymentalne uzupełniono analiza bioinformatyczną. Wprawdzie HNSCC to bardzo niejednorodna grupa nowotworów złośliwych, a linia HeLa, kluczowa dla pracy, to linia wywodząca się z komórek raka szyjki macicy, ale nowotwory złośliwe mają przecież cechy wspólne w swoich kluczowych aspektach. Na podkreślenie zasługuje zakres tej pracy – 9 genów/białek, 7 linii komórkowych i 6 potencjalnych chemoterapeutyków. Dyskusja otrzymanych wyników ma bardzo oryginalny, a więc i twórczy charakter. Brakuje mi jednak bardziej zdecydowanego odniesienia do kwestii udziału białek ALKBH5 i FTO w transformacji nowotworowej poprzez naprawę DNA/RNA.

Druga praca „*Intracellular and tissue specific expression of FTO protein in pig: changes with age, energy intake and metabolic status*” została opublikowana także w *Scientific Reports* i w pracy tej Pan Tomasz Pilżys jest drugim autorem z zastrzeżeniem równego wkładu w jej powstanie z pierwszą autorką. Uzasadnieniem podjęcia tematu pracy było stwierdzenie związku pomiędzy polimorfizmami genu *FTO* i występowaniem cukrzycy typu 2. W pracy tej, wykonanej na świniami w różnym wieku, diecie i statusie metabolicznym, stwierdzono cytoplazmatyczną lokalizację białka FTO w różnych komórkach świnii, w tym komórkach beta trzustki. Uzyskane wyniki potraktowano z uzasadnioną w tym wypadku ostrożnością, nie sugerując pewnych narzucających się wniosków, lecz poprzestając na hipotezie o wysokim potencjale białka FTO do udziału w szeregu mechanizmów komórkowych, specyficznych dla jego lokalizacji. Zwraca uwagę wysokiej jakości dokumentacja (zdjęcia) uzyskanych wyników oraz szeroki zakres pracy.

Praca „*Human and Arabidopsis alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog proteins – new players in important regulatory processes*” opublikowana w *IUBM Life* budzi moje szczególne zainteresowanie ze względu na wkład we frapujące (nie tylko) mnie zagadnienie związane z zależnością pomiędzy wielkością genomu i stopniem złożoności organizmów. W pracy tej mgr Tomasz Pilżys jest drugim autorem z zastrzeżeniem równego wkładu z pierwszym autorem. Stawia bardzo odważną hipotezę zasygnalizowaną w jej tytule. Praca ta zgodnie z przyjętym podziałem prac na “doświadczalne” i “przeglądowe”, powinna być zaliczona do tej drugiej kategorii, ale chciałbym zwrócić, że praca ta ma znacznie bardziej twórczy niż dokumentalistyczny aspekt, charakteryzujący niestety wiele prac przeglądowych. I tak przy 9 białkach ALKBH człowieka *Arabidopsis thaliana* ma ich (aż) 13. Pan mgr Tomasz Pilżys, wraz ze współautorami prowadzi twórcze rozważania nad podobieństwami i różnicami, zarówno strukturalnymi, jak i funkcjonalnymi białek AlkB w obydwu typach organizmów, zwracając szczególną uwagę na ALKBH5 i FTO (człowiek) oraz ALKBH10B. Niestety, końcowy wniosek nie bardzo pasuje do zakresu pracy i jej zamierzeń – to, że jeszcze dużo musimy się uczyć o białkach AlkB i potranslacyjne

modyfikacje mogą mieć znaczenie dla ich funkcji, jest chyba oczywiste. Lekki niedosyt. Jednakże w pracy tej postawiono odważne hipotezy i w elegancki sposób je zweryfikowano, co bardzo dobrze świadczy o jej autorach, a więc także Doktorancie, będąc świadectwem dojrzałości w doborze tematyki, poprawności formułowania problemów i hipotez. Dodatkowo, autorzy przedstawili tam kompendium wiedzy dotyczącej rodziny AlkB u człowieka i *Arabidopsis* poprzez trafny wybór źródeł i właściwe ich wykorzystanie.

Jak wspomniałem, nie zamierzam dokonywać merytorycznej oceny prac stanowiących rozprawę doktorską, chciałbym jednak sformułować dwie syntetyczne uwagi (pytania), dotyczącego przesłania rozprawy, a więc wszystkich trzech prac wchodzących w jej skład. Po pierwsze, czy wszystkie obserwowane, przewidywane i hipotetyczne funkcje białek rodziny AlkB mają związek z naprawą DNA/RNA? Albo może inaczej – czy na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych w nich wyników, można sugerować, że niektóre białka rodziny mogą nie brać udziału w naprawie DNA/RNA? Oczywiście na poziomie spekulacji, ale nie w pejoratywnym znaczeniu tego słowa. Po drugie, jak można traktować rodzinę AlkB z punktu widzenia mechanizmów transformacji nowotworowej? Jako supresory, czy onkogeny? A może tylko jako enzymy odpowiedzialne za utrzymanie stabilności genomu? Jak połączyć odpowiedź na pytanie pierwsze z drugim?

Prace stanowiące podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora mgr. Tomaša Pilžysa są umieszczone w zwartym opracowaniu „Praca doktorska”. Niestety jego jakość nie dorównuje bardzo wysokiej jakości publikacji. Już na początku w podrozdziale „Stosowane skróty”, zawierającym prawie wyłącznie akronimy, a nie skróty, mamy sporo wyrażen, bez znajomości których nie wyobrażam sobie czytania tej rozprawy ze zrozumieniem, a podawanie rozwinięć NCN i SGGW uważam za kuriozalne. No ale to oczywiście bez znaczenia dla oceny wartości samej rozprawy. Nie wiedzieć, czemu właściwy początek opracowania stanowi rozdział „Choroby cywilizacyjne”? Z niektórymi stwierdzeniami mgr. Tomaša Pilžysa nie mogę się zgodzić, na przykład, że uszkodzenia genu *TP53* powodują zwiększoną ekspresję p53 (str. 18, zabrakło „mogą”?). „ALKH2 oddziałuje z Ku70, zaangażowanym w naprawę DNA, a tym samym bierze udział w regulacji transkrypcji rybosomalnego DNA poprzez naprawę DNA” – uogólnienie o ograniczonym sensie. Pisownia „egzon”. Wiadomo o co chodzi, ale ostatnia rekomendacja PTBioch to chyba jednak „ekson”. Takich „momentów” w tym opracowaniu jest znacznie więcej, niż te przeze mnie wymienione, ale przecież nie rzutują one na publikacje, które są podstawą do ubiegania się o stopień doktora.

Repertuar metod zastosowanych przez Autora w badaniach w swojej rozprawie doktorskiej jest bogaty: wyciszanie ekspresji genów przez siRNA, metody immunocytochemiczne, szereg analiz wysokoprzepustowych, analiza *in silico*, analiza białek.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr. Tomaša Pilžysa jest sukcesem naukowym jej promotora Pani profesor Elżbiety Grzesiuk i samego Pana Tomaša. Największym osiągnięciem rozprawy jest przeprowadzenie oryginalnych badań, których wyniki mogą rzucić światło na wzajemne powiązania pozornie odległych procesów biologicznych zachodzących z udziałem białek rodziny AlkB. W takim kontekście szczególnie ważne wydaje się określenie funkcjonalnej lokalizacji komórkowej białek rodziny. Myślę,

że wyniki uzyskane przez Doktoranta stanowią dobrą podstawę do kontynuowania badań nad powiązaniem białek rodziny AlkB z patogenezą szeregu stanów patologicznych, w tym nowotworami złośliwymi i cukrzycą typu 2. Podjęcie tej tematyki uważam za trafne i uzasadnione. Wyniki uzyskane przez Doktoranta oraz ich interpretacja a także rozważania uzasadniające wagę podjętej przez Niego problematyki zostały opublikowane w czasopismach mających dobrą renomę w międzynarodowej społeczności naukowej. Doktorant zastosował w swej pracy szereg nowoczesnych technik biologii molekularnej i to zastosował ze znanstwem. Uważam, że rozprawa doktorska mgr. Tomáša Pilžysa spełnia warunki określone w art. 185-197 ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Dlatego wnoszę do Wysockiej Rady Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Tomáša Pilžysa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, uprzejmie wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej. Swą opinię o wyróżnienie uzasadniam, oprócz oczywistego odniesienia do innych prac doktorskich, z którymi miałem okazję się zapoznać, bardzo szerokim zakresem prac eksperymentalnych z jednoczesną ich wysoką jakością oraz wyróżniającym poziomem interpretacji i dyskusji wszystkich otrzymanych wyników.

Janusz Błasiak

