

Warszawa 15.10.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

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

Autor: *mgr Tomáš Pilžys*

Wśród wielu białek uczestniczących w procesach naprawy materiału genetycznego rodzina białek AlkB jest związana z usuwaniem uszkodzeń spowodowanych przez czynniki alkilujące. Uszkodzenia tego typu, zwane też epi-mutacjami, są usuwane na drodze bezpośredniej, podobnie jak to jest w przypadku O-6-metykoguaniny lub na drodze enzymatycznej. Ten ostatni proces jest związany z rodziną białek enzymatycznych AlkB. Są to dioksygenazy zależne od dwuwartościowego żelaza Fe(II) i kofaktora 2-oksylglutaranu. W organizmie ssaków rodzina białek AlkB składa się z ośmiu dioksygenaz nazywanych AlkB 1-8 i dioksygenazy FTO. Większość białek należących do tej rodziny poza usuwaniem uszkodzeń alkilacyjnych pełni w komórce wiele innych dodatkowych funkcji. Ta dodatkowa rola białek rodziny AlkB nie jest do końca wyjaśniona. Dlatego podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. W tym kontekście szczególnie interesująca wydaje się być rola niektórych członków tej rodziny w rozwoju chorób cywilizacyjnych takich jak nowotwory, otyłość czy cukrzyca typu 2.

Przedstawiona praca doktorska została skompilowana z dwóch części: części w języku polskim w skład której wchodzi krótki Wstęp, Cel pracy, króciutkie Omówienia Publikacji Wchodzących w Skład Rozprawy Doktorskiej, Dyskusja oraz Podsumowanie. Tę część kończy

Spis Literatury liczący aż 237 pozycji. Drugą część stanowi zszywka trzech publikacji w anglojęzycznych czasopismach naukowych o sumarycznym indeksie oddziaływania IF= 11,2. Dwie z tych prac to publikacje eksperymentalne. Trzecia jest pracą przeglądową. We wszystkich tych pracach Tomáš Pilžys jest pierwszym lub równorzędnym pierwszym autorem.

We Wstępie autor opisał całą rodzinę białek ALKBH. U ludzi rodzina liczy aż dziewięciu członków (izoformy ALKBH od 1 do 8 i białko FTO). Białka te biorą udział w usuwaniu grup alkilowych z DNA i RNA. Głównymi substratami większości tych enzymów są 1-metyloadenina i 3-metylocytozyna. Kofaktorami reakcji są dwuwartościowe żelazo i 2-oksoglutaran. Aktywność większości białek ALKBH jest wiązana z regulacją podstawowych procesów komórkowych takich jak naprawa DNA, angiogeneza czy proces kancerogenezy. Głównym substratem ALKBH5 i FTO jest N⁶metyloadenina w mRNA. Białko FTO dodatkowo odgrywa ważną rolę w adipogenezie i regulacji masy ciała. Aktywność tego białka związana jest również z procesem kancerogenezy.

Celem tej pracy była próba zbadania funkcji białek enzymatycznych z rodziny ALKBH u ssaków, w tym szczególnie u ludzi oraz ocena ich roli w procesie nowotworzenia i w rozwoju chorób cywilizacyjnych takich jak nadwaga, otyłość czy cukrzyca typu 2.

Metodykę stosowaną w tej pracy można ocenić jedynie na podstawie opublikowanych prac. Z opisu wynika, że autor swobodnie posługuje się zarówno szerokim spektrum nowoczesnych technik molekularnych, takich jak izolacja RNA i białek, techniki Western, czy wykorzystanie technik immunohistochemicznych oraz technik z zakresu hodowli komórkowych. Wskazuje to na dobre opanowanie współczesnego warsztatu biologa molekularnego.

Najważniejszym wynikiem tej pracy jest potwierdzenie uczestnictwa ludzkich białek z rodziny ALKBH w procesie nowotworzenia. Aż siedem z dziewięciu białek z rodziny AKLBH wykazywało wysoki poziom ekspresji zarówno w guzach nowotworowych, jak i w różnych

liniach ludzkich komórek nowotworowych. Autorowi udało się też wykazać dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji białek ALKBH3 i FTO a wielkością guza nowotworowego oraz, że spadek ekspresji któregoś z członków rodziny prowadzi do zmiany poziomu ekspresji pozostałych członków rodziny. Cechą charakterystyczną był wysoki poziom ekspresji różnych członków rodziny ALKBH w różnych typach nowotworów.

Analizując poziom ekspresji poszczególnych białek ALKBH u 40 pacjentów z rakiem głowy i szyi wykazano znacznie wyższy poziom ekspresji badanych białek w guzie w porównaniu z tzw. zdrową tkanką pobraną z obrzeża guza. Największe zmiany obserwowano dla ALKBH2 i FTO. Nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomach ekspresji w przypadku izoformy 6 i 7. Autor zauważył też, że niski poziom ekspresji prowadzi do ograniczenia szybkości wzrostu nowotworu.

Kolejną ciekawą obserwacją jest zmiana lokalizacji niektórych członków rodziny ALKBH z jądrowej na cytoplazmatyczną. Tego typu zmiany często niosą ze sobą zmianę funkcji biologicznej zmieniających lokalizację białek, a to zwykle prowadzi do zaburzenia homeostazy komórkowej. Może też być zjawiskiem sprzyjającym transformacji nowotworowej. W nowotworach głowy i szyi zmienioną lokalizację z jądrowej na cytoplazmatyczną zaobserwowano w przypadku ALKBH3. Natomiast ALKBH2 i ALKBH5 były zlokalizowane zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie. Powiązanie procesu transformacji nowotworowej ze zmianą lokalizacji, a więc i funkcją białek ALKBH sugeruje, że można by wykorzystać ten punkt uchwytu do opracowania molekularnie nacelowanych inhibitorów zmian w poziomie ekspresji (głównie chodzi o obniżenie nawet do zera poziomu ekspresji) i lokalizacji tych białek. Takie próby, jak zaznacza doktorant, zostały już podjęte w macierzystej jednostce autora.

Badania nad FTO, dziewiątym członkiem rodziny ALKBH wykazały, że białko to jest zaangażowane w wiele różnych procesów biologicznych. Poziom ekspresji tego białka

wykazuje korelację z nadwagą, otyłością i cukrzycą typu 2. Ze względu na niewystarczające podobieństwo organizmu myszy większość badań nad otyłością i cukrzycą przeprowadzono na świniach, które bardziej przypominają organizm ludzki. Analiza poziomu ekspresji przeprowadzona w różnych organach świni ujawniła znamienne różnice w poziomie ekspresji w zależności od typu tkanki. Wysoki poziom ekspresji FTO był charakterystyczny dla tkanek i organów szybko rozwijających się po urodzeniu. Zebrane dane potwierdziły także, że FTO bierze udział w proliferacji i różnicowaniu pre-adipocytów i mioblastów. Warto też podkreślić, że poziom ekspresji FTO w trzustce jest zależny od poziomu ekspresji tego białka w komórkach Langerhansa. Bowiem jedynie w tym typie komórek trzustki obserwowano ekspresję FTO. Zaobserwowano też zmiany w poziomie ekspresji FTO w zależności od wieku, statusu metabolicznego i stosowanej diety. Poziom ekspresji FTO był najwyższy przy podawaniu zwierzęciu diety wysokoenergetycznej. Z kolei wysoki poziom ekspresji FTO - jak ustalono - sprzyja rozwojowi nowotworu. Te dane jednoznacznie sugerują rolę białek z rodziny ALKBH (przynajmniej niektórych) w chorobach takich jak otyłość czy cukrzyca typu 2. Autorowi nie udało się jednak wykazać, czy jest to rola pośrednia czy bezpośrednia. Większość zgromadzonych danych sugeruje raczej zróżnicowaną rolę w zależności od izoformy. W większości stawiałbym na rolę pośrednią choć niektóre izoformy, np. te które zmieniają swoją lokalizację mogą uczestniczyć w kancerogenezie w sposób bezpośredni. Aby w pełni wyjaśnić rolę poszczególnych białek w otyłości i cukrzycy typu 2 ale także w procesie kancerogenezy konieczne są jednak dalsze badania. Chciałbym poprosić doktoranta o przedstawienie jego opinii.

Podsumowując uważam, że mgr Tomasz Pilżys osiągnął stawiane sobie cele. Wyniki obu prac eksperymentalnych pozwoliły na zebranie danych wskazujących na silny związek pomiędzy funkcją białek z rodziny ALKBH, a indukcją chorób cywilizacyjnych takich jak nowotworzenie, otyłość i cukrzyca typu 2. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa

doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust.1 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki o dopuszczenie autora pracy mgr. Tomáša Pilžys’a do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz Siedlecki