

Poznań, 5 kwietnia 2024 r.

Dr hab. K. Dorota Raczyńska, prof. UAM
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Pauliny Pietras pt.: „Analiza udziału krypt komórkowych i granuli stresu w procesach zwiększających zdolności przeżyciowe komórek nowotworowych po ich ekspozycji na leki przeciwnowotworowe”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. UMP, dr hab. n. med. Witolda Szaflarskiego, a zrealizowana w Zakładzie Histologii i Embriologii, Instytutu Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karłona Marcinkowskiego w Poznaniu.

Praca doktorska stanowi cykl trzech prac naukowych, z których dwie zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, mianowicie:

1. Pietras P., Leśniczak M., Sowiński M., Szaflarski W. Molecular structure of stress granules and their role in the eukaryotic cell. *Med J Cell Biol*, 2021; 9(1):33-41.
2. Pietras P., Leśniczak-Staszak M., Kasprzak A., Andrzejewska M., Jopek K., Sowiński M., Ruciński M., Lyons S.M., Ivanov P., Szaflarski W. MVP expression facilitates tumor cell proliferation and migration supporting the metastasis of colorectal cancer cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12121.
3. Pietras P., Aulas A., Fay M.M., Leśniczak-Staszak M., Sowiński M., Lyons S.M., Szaflarski W., Ivanov P. Translation inhibition and suppression of stress granules formation by cisplatin. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145:112382.

Tematyka badań koncentruje się wokół hipotezy zakładającej udział krypt komórkowych oraz ciał stresowych w uruchamianiu mechanizmów promujących przeżycie komórek nowotworowych po ich ekspozycji na leki. Aby potwierdzić udział obu struktur w utrzymaniu żywotności komórek nowotworowych, doktorantka i) przeprowadziła analizy ekspresji i funkcji głównego białka krypt komórkowych, MVP, wykazując, że indukuje ono migrację, inwazję i powstawanie przerzutów nowotworowych; ii) opisała mechanizm cytotoksyczności cisplatinu oparty na hamowaniu tworzenia kanonicznych ciał stresowych i indukcji apoptozy komórek nowotworowych, tym samym przedstawiając nową rolę tego leku. Badania doktorantki mają wysoką wartość naukową i niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do progresji choroby nowotworowej i wskazują nowe cele dla terapii przeciwnowotworowych.

Publikacja 1, w której mgr Paulina Pietras jest pierwszym autorem to praca przeglądowa, podsumowująca ogólnie doniesienia literaturowe z ostatni ok. 20 lat, dotyczące struktury,

powstawania i funkcji ciał stresowych SG oraz udział tych struktur w nowotworzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych. Praca jest dobrym wprowadzeniem do tematyki badawczej realizowanej w ramach publikacji 3.

Wyniki badań eksperymentalnych, opisane w pracach 2 i 3, zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *International Journal of Molecular Sciences* i *Biomedicine and Pharmacotherapy*, o wartościach współczynnika wpływu IF, odpowiednio, 6,208 i 7,419. Są to czasopisma recenzowane, w związku z tym opublikowane w nich prace, w tym również prace mgr Pauliny Pietras, są wysokiej jakości.

Publikacja 2 to praca z pierwszym współdzielonym autorstwem mgr Pauliny Pietras. Naukowcy opisali w niej udział białka MVP w procesach związanych z przeżyciem komórek w odpowiedzi na traktowanie lekami przeciwnowotworowymi. Po pierwsze, zaobserwowali wzrost poziomu białka MVP w komórkach przerzutowych węzłów chłonnych co powiązali z funkcją białka MVP bądź nawet całych krypt w migracji i inwazji komórek nowotworowych, prowadzących do przerzutów. Następnie, wykonali wysokoprzepustowe analizy ekspresji genów z użyciem mikromacierzy w komórkach z wyciszeniem genu białka MVP z użyciem technologii CRISPR-Cas9, w porównaniu do komórek kontrolnych. W badaniach tych wytypowali cztery procesy potencjalnie regulowane przez MVP, tj.: adhezja komórkowa, adhezja biologiczna, proliferacja komórek oraz migracja komórek. W kolejnych badaniach eksperymentalnych potwierdzili aktywatorowe działanie białka MVP na migrację, proliferację, wzrost i przeżycie komórek. Mimo wysokiej wartości uzyskanych wyników, nie jest dla mnie do końca jasne, dlaczego część analiz była wykonana na komórkach U2OS, a inne na komórkach HAP1. Wydaje mi się też, że analizy transkryptomyczne powinny zostać wykonane także materialem z komórek HAP1. Ponadto, odnośnie do tej pracy nasunęły mi się także inne pytania, mianowicie:

1. Pokazano, że w komórkach HAP1-PAR, w odróżnieniu od komórek USOS-PAR, poziom białka MVP pozostaje poniżej poziomu detekcji z użyciem techniki Western blot (Fig. 2A). Czy badacze podjęli próbę detekcji z użyciem innych metod, np.: RT-qPCR lub immunofluorescencji? Jeśli nie, skąd pewność, że w tych komórkach białko w ogóle ulega ekspresji? Jeśli nie ma takiej pewności, używanie do analiz mutantu typu knockout dla genu, którego ekspresja nie została potwierdzona, wydaje mi się trochę bezasadne. Co prawda, zaobserwowano pewne zmiany fenotypowe w komórkach HAP1- Δ MVP vs komórki HAP1-PAR, ale jaka jest pewność, że wynikają one bezpośrednio z braku ekspresji białka MVP? Dlaczego analiz przedstawionych na Fig. 2C-E nie wykonano z użyciem linii USOS-PAR i USOS- Δ MVP, gdzie różnica w poziomie ekspresji MVP była wyraźna?
2. Jak wynika z Fig. 1B, w komórkach tkanek zdrowych i nowotworowych obserwuje się zarówno spadek jak i wzrost poziomu ekspresji MVP, są wyraźne różnice obserwowane między pacjentami. Jak wyjaśnić tak różne zmiany?
3. Czy znany jest molekularny mechanizm regulacji ekspresji genu MVP? Co bezpośrednio wpływa na wzrost poziomu białka w komórkach przerzutowych?
4. Jaki, zdaniem doktorantki, jest molekularny mechanizm regulacji ekspresji innych genów (co sugerują dane z wyników mikromacierzy) przez białko MVP?

5. Efekt wyciszenia MVP badano w komórkach nowotworowych, ma to wówczas pozytywne znaczenie terapeutycznie – obniża przeżywalność komórek nowotworowych. Ciekawi mnie, czy te same szlaki będą uruchamiane i ten sam efekt będzie obserwowany w komórkach tkanek zdrowych z obniżoną ekspresją MVP – czy też będą się charakteryzowały niższą proliferacją, zwiększoną apoptozą i śmiertelnością? Czy może w komórkach nowotworowych szlaki regulowane przez MVP są nieco inne?

Publikacja 3 to praca opisująca powstawanie ognisk cytoplazmatycznych przypominających ciała stresowe SG, indukowanych obecnością leku przeciwnowotworowego cisplatyny (CisPt). Badacze pokazali alternatywną drogę działania CisPt, która może indukować efekt cytotoksyczności poprzez regulację ekspresji genów na etapie translacji. Mianowicie, w wyniku hamowania biosyntezy białka, indukcji rozpadu polisomów oraz agregacji podjednostek rybosomów, CisPt hamuje tworzenie kanonicznych ciał stresowych (ciał SG), które naturalne są wytwarzane w komórce jako jeden z mechanizmów obronnych na stres, zwiększający przeżywalność komórek. Zamiast tego, powstają ogniska cytoplazmatyczne, o nieco innych składzie, biogenezie i większej stabilności. Praca jest ciekawa i wnosi istotny wkład w tematykę badań nad formowaniem się anormalnych cytoplazmatycznych struktur, cytotoksyczności niektórych substancji, np. związków pochodzenia platynowego i zwiększenia efektywności terapii przeciwnowotworowych opartych na tych lekach. Niemniej, choć praca jest opublikowana w czasopiśmie recenzowanym, to znalazłam w niej kilka niedociągnięć: błędy edytorskie, cytowanie figur nie w kolejności ich powstawania (jako pierwsza cytowana Fig. S6, potem Fig. 1A, 3A, 3C, 3B, 2B itp). Z istotniejszych błędów: brak nałożenia obrazów (tzw. „merge”) w Fig.2A i 3B czy niepoprawne, nie skorelowane w czasie wskazany na pojedynczych analizach nałożenie obrazu frakcji polisomów z różnych warunków na Fig. 6A. W trakcie czytania tej pracy nasunęły mi się ponadto pytania dotyczące składu i biogenezy ognisk cytoplazmatycznych CisPt, o których chciałabym podyskutować z doktorantką podczas obrony, mianowicie:

1. Czy znany jest skład proteomiczny ognisk cytoplazmatycznych CisPt? Czy podobnie jak ciała SG zawierają wiele białek wiążących RNA? Jeśli nie, jakie techniki zaproponowałyby doktorantka do ich zbadania?
2. Jeśli ogniska cytoplazmatyczne indukowane cisplatyną są inne od ciał SG, co indukuje tak naprawdę powstawanie tych ciał, co jest pierwszym etapem? Wydaje się, że w przypadku ciał stresowych to akumulacja białek RBP o właściwościach separacji faz ciec-ciecz jest czynnikiem inicjującym powstawanie tych nieobłonionych a jednak odrębnych struktur. Czy tak też może być w przypadku ciał CisPt? W kontekście chorób neurodegeneracyjnych (np. ALS), czy zdaniem doktorantki, w komórkach z ekspresją mutantu białka TDP-43 lub FUS skorelowanych z ALS traktowanych cisplatyną, mutanty TDP-43 i FUS gromadziłyby się w ogniskach cytoplazmatycznych CisPt, tak jak gromadzą się w ciałach stresowych?

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach Szkoły Doktorskiej UMP. Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr Paulina Pietras jest współautorką w sumie 7 publikacji naukowych o łącznej wartości współczynnika oddziaływania IF 36,508, a jej index Hirscha

wynosi 3, co stanowi naprawdę imponujący dorobek dla tak młodego naukowca. Obecnie realizuje studia podyplomowe „Badania kliniczne i biomedyczne badania naukowe” na UMP. Wyniki swoich badań przedstawiała na zebraniu naukowym Poznańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, którego jest członkiem. Recenzowała już prace naukowe dla czasopisma *Adv. Clin. Exp. Med.* Doświadczenie badawcze zdobywała odbywając praktyki i staże naukowe na UMP, UAM i IChB PAN. Przez dwa lata udzielała się także w Uczelnianym Laboratorium Koronawirusa, utworzonym na UMP w czasie pandemii.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich, których osiągnięcia opisane są w publikacjach naukowych. Oprócz spisu publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe doktorantki znajdujemy „Wprowadzenie” do tematyki pracy doktorskiej, w której doktorantka zwięźle, ale wystarczająco wprowadza czytelnika w tematykę prac wchodzących w skład dysertacji, czyli struktury i funkcji krypt komórkowych i ciał stresowych oraz ich udział w ścieżkach promujących przeżycie komórek w niekorzystnych warunkach. Niemniej, rażąco jest tu brak figur. Przydałby się chociażby model krypty komórkowej czy schemat szlaków inhibicji biosyntezy białek prowadzących do powstawania ciał SG. Figury nie tylko ubarwiłyby tę część pracy, ale też ułatwiłyby śledzenie przyswajanych informacji. W kolejnych rozdziałach mgr Paulina Pietras wyczerpująco przedstawia cykl prac naukowych wchodzących w skład rozprawy, które podsumowuje w poprawnie sformułowanych wnioskach. W dysertacji znajdujemy także informacje o aktywności naukowej doktorantki, wykaz skrótów, streszczenia oraz oświadczenia współautorów.

Wyniki badań eksperymentalnych zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej: *International Journal of Molecular Sciences* i *Biomedicine and Pharmacotherapy*, o wartościach współczynnika wpływu IF, odpowiednio, 6,208 i 7,419. Są to czasopisma recenzowane, w związku z tym opublikowane w nich prace, w tym również prace mgr Pauliny Pietras, są wysokiej jakości. Warto jednak wspomnieć, że pozostała część rozprawy, rozdziały „Wprowadzenie”, „Omówienie osiągnięć badawczych”, „Podsumowanie i wnioski” oraz „Streszczenie” są również rzetelnie przygotowane, napisane poprawną polszczyzną, z właściwym doбором słów i znajomością terminologii w zakresie dyscypliny. Autorka unika żargonu laboratoryjnego, zdania są jasne, wnioski sformułowane poprawnie. Zdarzają się naprawdę nieliczne błędy, np.: „czynnik eIF4E ma zdolność wiązania struktury czapeczki mRNA, będącej charakterystycznym elementem większości genów” – kiedy struktura czapeczki jest charakterystycznym elementem cząsteczek mRNA, czy niewłaściwe sformułowania typu „vtRNA - niekodujące RNA krypt komórkowych” zamiast „niekodujący RNA krypt”, które jednak nie umniejszają dużej wartości naukowej niniejszej pracy.

Warto podkreślić, że wyniki opublikowane w pracach wchodzących w skład cyklu publikacji powstały z wykorzystaniem bogatego repertuaru technik molekularnych, choć niestety, trudno wskazać, które z nich zostały w całości wykonane przez doktorantkę. Trudno też ogólnie ocenić wkład autorki w powstanie prac, bo choć dysertacja zawiera oświadczenia współautorów, nie są one wystarczająco precyzyjne, tak że nie do końca wiadomo jaki jest prawdziwy wkład mgr Pauliny Pietras w każdą z nich.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Pauliny Pietras uważam za wartościową naukowo i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Badania naukowe wykonane wraz z

zespołem potwierdziły udział białka MVP w procesach związanych z przeżyciem komórek nowotworowych w odpowiedzi na traktowanie lekami. Ponadto, pokazano nowy mechanizm działania cisplatyny, poza potwierdzoną wcześniej rolą w indukcji uszkodzeń DNA, związany z zahamowaniem translacji i supresją ciał SG, odpowiedzialny za wysoki stopień cytotoksyczności tego leku. Tematyka, którą zajęła się doktorantka jest nadal słabo poznana, zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie przeżycia komórek w odpowiedzi na traktowanie lekami przeciwnowotworowymi nadal stanowi wyzwanie w obszarze opracowywania skutecznych terapii. W tym aspekcie, uzyskane wyniki są niezwykle cenne.

W mojej opinii, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” oraz w sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała Senatu UMP nr 33/2021) i wnioskuję do Kapituły Kolegium Nauk UMP o dopuszczenie mgr Pauliny Pietras do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Katarzyna Dorota Raczyńska