

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

1. Tematyka badawcza rozprawy

Mgr Paulina Pietras przedstawiła pracę dotyczącą poszukiwania mechanizmów molekularnych regulujących przeżywalność komórek nowotworowych po ekspozycji na terapię. Oporność na cytostatyki jest ciągle jedną z głównych przyczyn niepowodzeń systemowych terapii przeciw nowotworowych. Najlepiej poznanym mechanizmem warunkującym powstanie lekooporności jest działanie błonowych białek transportowych, które aktywnie usuwają leki z komórek nowotworowych. Podwyższona ich ekspresja jest najczęściej opisywanym czynnikiem związanym z opornością nowotworów na cytostatyki. Spośród komórkowych białek transportowych kluczową funkcję pełni glikoproteina P (Pgp). Wzrost poziomu ekspresji tego białka uznaje się za niekorzystny czynnik rokowniczy zarówno w przypadku białaczek, jak i innych nowotworów litych. Znaczenie kliniczne różnych białek związanych z opornością wielolekową jak np. MRP1 (multidrug resistant protein 1) lub LRP (lung resistant protein) oraz mechanizm ich działania jest przedmiotem intensywnych badań. Ich katalizatorem są obserwacje tworzenia niedocenianych dotychczas biomolekularnych kondensatów komórkowych powstających pod wpływem leków. Te nowe struktury wymagają ponownego spojrzenia na mechanizmy odpowiedzi komórki na czynniki zewnętrzne i wpływ otoczenia. Komórka jest podstawową jednostką strukturalną i funkcjonalną żywego organizmu w której przebiega równocześnie niezliczona ilość reakcji chemicznych. Prawidłowe jej funkcjonowanie możliwe jest dzięki funkcjonowaniu specyficznych kompartmentów (struktur czy organelli) rozdzielających precyzyjnie kontrolowane procesy czy szlaki biochemiczne. Organelle mają określony skład molekularny i budowę, będącą wynikiem swoistej selekcji, doboru cząsteczek, niezbędnych do stworzenia określonej struktury. W utrzymaniu molekularnej unikalności organelli komórkowych ważną rolę odgrywa błona lipidowa stanowiąca fizyczną barierę oraz filtr selektywności. Jednak w ostatnich latach pokazano, iż prawidłowe funkcjonowanie komórki, w dużej mierze zależy również od kondensatów makromolekularnych, które są integralnymi



strukturami komórkowymi bez błony komórkowej. Są to tzw. organelle bezbłonowe (ang. membraneless organelles, MLOs), granule czy ciała komórkowe (ang. cellular bodies) tworzące się na pewnych etapach cyklu komórkowego a także pod wpływem sygnałów pochodzących z otoczenia komórki. MLOs są obecne zarówno w cytoplazmie jak i w innych organelach, głównie w jądrze komórkowym. Proces ich formowania nazwano separacją faz ciecz-ciecz (ang. liquid-liquid phase separation, LLPS), białkową separacją faz (ang. protein phase separation, PPS), lub przejściem fazowym (ang. phase transition). Powstają one na drodze spontanicznej separacji faz ciecz-ciecz w odpowiedzi na zmieniające się czynniki fizykochemiczne otoczenia. Białka tworzące organelle posiadają regiony wewnątrznie nieuporządkowane (ang. intrinsically disordered regions, IDRs) a także miejsca wiązania kwasów nukleinowych – głównie RNA. W wyniku separacji faz w cytoplazmie może wydzielić się faza stała wskutek precypitacji, albo może nastąpić wydzielenie się fazy ciekłej lub fazy amorficznej, bezpostaciowej, której składniki mają pełną swobodę przemieszczania się w danej objętości (*Holehouse AS, Kragelund BB, The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions, Nat Rev Mol Cell Biol. 2024;25(3):187-211*). Proces ten nie wymaga energii (hydroliza ATP) i nie ma bariery energetycznej obniżanej przez enzymy. LLPS zachodzi spontanicznie zgodnie z drugim prawem termodynamiki, jeśli zmiana energii swobodnej Gibbsa (ΔG) danego procesu ma wartość ujemną. Za białkową separację faz odpowiadają słabe, bardzo słabe, wielorakie i zazwyczaj multiwalentne oddziaływania. Spontaniczne mieszanie składników odbywa się w wyniku dyfuzji chemicznej w określonej czasoprzestrzeni właściwej dla danej aktywności komórki. swoistą. Zatem zmiana czynników fizykochemicznych, takich jak np. temperatura, siła jonowa, stężenie makrocząsteczek czy ich modyfikacje po translacyjne, zmieniające np. ładunek danej reszty aminokwasowej, mogą wywołać spontaniczną LLPS w układach biologicznych. Fluktuacje strukturalne w kondensatach wpływają na kluczowe procesy związane z patologią komórek nowotworowych i mogą sterować ontogenezą. Komórki nowotworowe charakteryzują się zaburzonym cyklem komórkowym oraz niekontrolowanymi podziałami. Co ważne, w procesie starzenia lub nowotworzenia, w rezultacie międzycząsteczkowych oddziaływań, kondensat może ulegać przemianom które prowadzą do utworzenia innej formy amorficznej charakteryzującej się mniejszą dynamiką relaksacyjną wynikającą z większego stopnia sieciowania makromolekuł lub nawet ich budowy. Wydzielanie frakcji MLOs, można uznać za krople cieczy stabilnie współistniejące w innej cieczy. W układach wieloskładnikowych często dochodzi do samoistnego mieszania się składników. Wynika to z dążenia układu do podniesienia poziomu entropii, czyli wzrostu stopnia nieuporządkowania kondensatów (*Boeynaems S, Chong S, Gsponer J, Holt L, Milovanovic D, Mitrea DM, Mueller-Cajar O, Portz B, Reilly JF, Reinkemeier CD, Sabari BR, Sanulli S, Shorter J, Sontag E, Strader L,*

Molecular Biology, 2023;435(5):167971). Przykładami takich kondensatów są granule stresu (SG – stress granules), ciała degradujące (PB – processing bodies), granule egzosomalne (exosome granules), ciała Cajala, cętki jądrowe, ciała P, granule powodowane promieniowaniem UV oraz granule EGP (glucose depletion P-bodies) a także krypty komórkowe.

Granule stresowe (GS) są to dynamiczne, cytoplazmatyczne kompleksy RNA-białko. Powstają w odpowiedzi na zatrzymanie inicjacji translacji. Zawierają głównie białka wiążące mRNA i czynniki inicjujące translację. Granule stresowe (pęcherzyki) powodują przejściową (podczas stresu) stabilizację (ochronę) informacyjnego RNA. Rolę GS wykazano w wielu procesach, np. w zakażeniach wirusowych, przez co uznaje się je także za nowy element odporności naturalnej. GS sekwestrują mRNA podczas stresu, aby zachować transkryptom, i umożliwić wznowienie translacji po zaniku warunków stresowych. Są one niezbędnymi strukturami umożliwiającymi komórce pełnienie istotnych funkcji życiowych i zabezpieczającymi właściwą odpowiedź na stres. Granule stresowe w skład których wchodzi białka i RNA powstają w wyniku ekspozycji komórki na różnego rodzaju biotyczne i abiotyczne bodźce stresowe. Głównym elementem SG jest białko G3BP1 (Ras-GTPase-activating protein (SH3 domain) binding protein 1), zbudowane z 466 aminokwasów i masie cząsteczkowej 68kDa, które uznawane jest jako swoisty znacznik (marker) granulii stresowych. Wyróżniającą cechą tego białka jest obecność 3 regionów o nieuporządkowanej strukturze IDR. W zależności od rodzaju bodźca stresowego, skład granulii stresowych może być różny. Duże znaczenie ma również czas utrzymywania się stresu, rodzaj komórki i lokalizacja komórkowa stresu. Wydaje się, że tworzenie SG jest związane ze zwiększoną opornością komórek nowotworowych na terapeutyki, co sprawia, że granule mogą być dobrym celem terapeutycznym dla zwiększenia wrażliwości na leki (Yidong Ge, Jiabei Jin, Jinyun Li, Meng Ye, Xiaofeng Jin, *The roles of G3BP1 in human diseases (review)*, *Gene*, 2022;821:146294). Krypty komórkowe to największe cytoplazmatyczne kompleksy rybonukleoproteinowe występujące w większości komórek eukariotycznych. Ich stała sedymentacji wynosi 150S a masa cząsteczkowa 13 MDa. Zawierają 6 kopii vtRNA ale tylko 5% całości RNA. Głównym białkiem krypt jest MVP (ang. major vault protein). Występują także białka: TEP1 i vPARP. MVP uczestniczy w regulacji transport komórkowego, różnicowaniu, proliferacji, odpowiedzi immunologicznej, czy też może wpływać na aktywność szlaków transdukcji sygnału. MVP ulega nadekspresji w komórkach eksponowanych na ksenobiotyki oraz w przypadku nowotworów, takich jak czerniak, rak okrężnicy, czy glejaki (Rodolfo Gamaliel Avila-Bonilla, Juan Pablo Martínez-Montero, *Crosstalk between vault RNAs and innate immunity*, *Molecular Biology Reports*, 2024;51(1):38).

Tworzenie, przemiany i dojrzewanie kondensatów komórkowych stanowią obecnie obszar intensywnych i perspektywicznych badań, gdyż istnieje ścisły związek między zaburzeniami tych mechanizmów i rozwojem różnych patologicznych procesów komórkowych. Z tego krótkiego

opisu budowy i funkcji bez membranowych, dynamicznych kondensatów komórkowych albo kompleksów białkowo-nukleinowych wylania się ich potencjał regulacyjny nie tylko biosyntezy białka ale także nowe możliwości rozpoznawania mechanizmu działania terapeutyków.

Przedstawiona rozprawa doktorska p. Pauliny Pietras wpisuje się moim zdaniem w panoramę nowych, ambitnych działań skierowanych na zrozumienie mechanizmów kontroli ekspresji genów wywoływanych subtelnymi zmianami i wpływem środowiska komórkowego. Mają one na celu analizę i poznanie molekularnych podstaw powstawania oporności w odpowiedzi na stosowane terapeutyki w leczeniu nowotworów.

2. Cele rozprawy doktorskiej

Indukcja oporności na leki np. przeciw nowotworowe stanowi ważny problem w praktyce klinicznej oraz medycynie translacyjnej. Oporność wielolekowa jest zjawiskiem uodpornienia się komórek nowotworowych na działanie leków odmiennych pod względem właściwości, mechanizmów działania, oraz budowy chemicznej. Wiąże się to ze znacznym ograniczeniem możliwości leczenia pacjentów onkologicznie chorych ale nie tylko. W przypadku komórek nowotworowych cecha ta może być nabyta lub posiadać pierwotne pochodzenie. Jednym z takich terapeutyków jest cisplatyna, która stosowana jest w lecznictwie od ponad czterdziestu lat ze względu na znane i potwierdzone właściwości w blokowaniu replikacji DNA komórek. Z klinicznego punktu widzenia, cisplatyna jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych u osób z nowotworami jądra, jajnika, głowy i szyi, pęcherza, szyjki macicy, zarówno w monoterapii, jak i chemioterapii skojarzonej.

W świetle ostatnich doniesień wskazujących na udział różnego rodzaju kondensatów komórkowych kształtowaniu lekooporności, Doktorantka podjęła problem udziału krypt komórkowych oraz granuli stresowych w rozwoju nowotworu oraz poznanie wpływu terapeutyków przeciw nowotworowych na przeżywalność komórek. Ten cel doktorantka postanowiła uzyskać poprzez realizację 5 zadań cząstkowych:

- a. Analizę poziomu ekspresji głównego białka krypt (MVP) w komórkach prawidłowych, guzie pierwotnym oraz w przerzutach.
- b. Charakterystykę transkryptomów w komórkach kostniakomiesaka U2OS niosącym gen MVP.
- c. Ewaluację wpływu białka MVP na aktywność komórkowych ścieżek sygnalizacyjnych związanych z adhezją i migracją.
- d. Analizę wpływu cisplatyny na przebieg procesu biosyntezy białka.
- e. Charakterystyka procesu powstawania granuli stresu indukowanych cisplatyną i arseninem sodu.

Przeprowadzone badania pokazały, że białko MVP, jako główny składnik krypt i ortolog białka oporności raka płuc (LRP), wpływa na migrację, proliferację i adhezję komórek nowotworowych. Wyłączenie ekspresji białka MVP skutkowało uwrażliwieniem komórek na stosowane leki

przeciwnowotworowe, co może wskazywać na jego udział, a nawet całych krypt w uruchamianiu mechanizmów sprzyjających przeżyciu komórek w warunkach stresowych. Okazało się również, że granule stresu tworzą się w cytoplazmie komórek nowotworowych pod wpływem leków przeciwnowotworowych, i stymulują przeżycie komórek.

Wyniki badań własnych Doktorantka opisała w dwóch pracach oryginalnych i opublikowanych:

1. Pietras Paulina, Leśniczak Marta, Sowiński Mateusz, Szaflarski Witold, *Molecular structure of stress granules and their role in the eukaryotic cell*, *Medical Journal of Cell Biology*. 2021;9(1): 33-41.
2. Pietras Paulina, Aulas Anais, Fay Marta M., Leśniczak-Staszak Marta, Sowiński Mateusz, Lyons Shawn M., Szaflarski Witold, Ivanov Pavel, *Translation inhibition and suppression of stress granules formation by cisplatin*, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2022; 145:112382.

Do rozprawy włączona jest również praca przeglądowa:

Pietras Paulina, Leśniczak-Staszak Marta, Kasprzak Aldona, Andrzejewska Małgorzata, Jopek Karol, Sowiński Mateusz, Ruciński Marcin, Lyons Shawn M., Ivanov Pavel, Szaflarski Witold, *MVP expression facilitates tumor cell proliferation and migration supporting the metastasis of colorectal cancer cells*, *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22(22):12121.

Publikacja ta omawia dotychczas poznane mechanizmy tworzenia granuli stresu, ich skład oraz udział w regulacji syntezy białka w komórkach zmienionych nowotworowo. Jej włączenie do rozprawy jest uzasadnione, ze względu na bogaty materiał faktograficzny niezbędny do przeprowadzenia kompetentnej dyskusji wyników badań własnych.

Rozprawa doktorska jest faktycznie zbiorem 3 publikacji, które zaopatrzone są komentarzem (33 strony) oraz zestawieniem cytowanych prac (10 stron).

3. Wyniki badań własnych opisanych w pracy doktorskiej:

1. Stwierdzono porównywalną ekspresję białka MVP w tkance nowotworowej i prawidłowej oraz jego podwyższony poziom w komórkach przerzutowych, co może wskazywać na udział MVP w inwazji komórek nowotworowych oraz powstawaniu przerzutów.
2. Analiza transkryptomów komórek U2OS po transfekcji plazmidem z MVP oraz z wyłączoną ekspresją białka MVP (U2OS- Δ MVP) za pomocą mikromacierzy pokazała podwyższony poziom 48 oraz obniżony poziom 118 transkryptów w komórkach U2OS- Δ MVP w porównaniu do komórek niemodyfikowanych. Większość tych genów jest zaangażowana w adhezję, proliferację oraz migrację komórek. Obecność genów HIST1H2A, PCDHB2, UNC13D, SMARCA1) potwierdzono techniką RT-qPCR.

3. Stwierdzono obniżoną migrację komórek U2OS- Δ MVP, wolniejsze tempo zablźniania rany oraz zmniejszony ich potencjał proliferacyjny. Uzyskane wyniki potwierdzają, że białko MVP uczestniczy w tych procesach.
4. Komórki HAP1- Δ MVP z wyłączoną ekspresją białka MVP wykazywały wolniejszy wzrost, krótszy czas przeżycia oraz mniejszy potencjał proliferacyjny, co jest związane z defosforylacją S473 AKT (ang. v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1). Jednocześnie zauważono podwyższony poziom fosforylowanego białka p53 (S150).
5. Stwierdzono, że wyłączenie ekspresji MVP wpływa na obniżenie aktywność szlaku sygnałowego PI3K/mTOR/AKT.
6. W komórkach U2OS MVP nie obserwowano fosforylacji paksyliny natomiast dla U2OS- Δ MVP zanotowano zwiększony poziom jej fosforylowanej formy. Fosfosforylowana treonina (T118) może powodować stabilizację adhezji ogniskowej, a tym samym ograniczać potencjał migracyjny komórek.
7. Białko MVP bierze udział w procesach takich jak adhezja komórkowa, adhezja biologiczna, proliferacja oraz migracja.
8. Wykazano, że CisPt hamuje tworzenie kanonicznych granuli stresowych poprzez hamowanie biosyntezy białka, rozpad polisomów oraz agregację podjednostek rybosomu.
10. Połączenia chemiczne platyny: cisplatyna, oksaliplatyna, czy karboplatyna powodują powstanie granuli stresowych w liniach komórkowych U2OS, Hela, MES-SA oraz SiHa.
11. Wykazano, że cisplatinowe ogniska cytoplazmatyczne różnią się od SG indukowanych arseninem sodowym (tzw. kanonicznych). Zawierają białka, takie jak TIAR, FxR1, TIA-1, CAPRIN1, UPF1 czy RPS6 (kanoniczne). Nie znaleziono czynników inicjacji translacji eIF3b i eIF4G oraz mRNA poli A+). Metodą FISH stwierdzono obecność 18S rRNA w cisplatinowych SG. W obu typach SG nie zidentyfikowano białka P0.
12. W obrębie agregatów cisplatinowych wykryto białka takie jak kinaza P70-S6, TRAF2 (ang. TNF receptor-associated factor 2) oraz RSK2 (ang. ribosomal S6 kinase 2). Może to sugerować ich udział SG w adaptacji do stresu i promowaniu przeżycia komórek.
13. Brak białka Dcp1, które jest znacznikiem PB w ogniskach CisPt sugeruje brak podobieństwa do ciałek P (ang. P bodies, PB).
14. Wykazano długi czas życia (ponad 4 h), dla cytoplazmatycznych ognisk CisPt, w porównaniu do SG indukowanych SA (1 h), od zaniku bodźca stresowego.
15. Wykorzystując komórki niezdolne do syntezy białka G3BP1 (U2OS- Δ G3BP1/2), pokazano, że białko G3BP1 jest niezbędne dla tworzenia ognisk cytoplazmatycznych.

16. Cykloheksymid (CHX) i emetyna (Eme), które hamują translację, powodują rozpad SG indukowanych arsenianem sodu ale nie ognisk cisplatynowych. Puromycyna zwiększa składanie SG indukowanych SA, ale nie ognisk cisplatynowych.
17. Stwierdzono, że CisPt powoduje rozpad polisomów, akumulację monosomów i podjednostek rybosomów, natomiast SA indukuje tworzenie monosomów, ale nie akumulację podjednostek rybosomów.
18. Wykorzystując linie komórkowe HAP1 i HAP1- eIF2 α S51A, oraz MEF i MEF- eIF2 α S51A wykazano, że tworzenie ognisk CisPt nie jest zależne od fosforylacji eIF2 α , ale może stymulować ich tworzenie.
19. Zaobserwowano, że CisPt hamuje translację niezależnie od zdolności komórek do formowania ognisk cytoplazmatycznych, w przeciwieństwie do komórek traktowanych SA, gdzie hamowanie translacji i formowanie SG są od siebie zależne.
20. Proponowany jest nowy mechanizm działania CisPt, który związany jest z oddziaływaniem na metabolizm RNA, a w szczególności na proces biosyntezy białka. CisPt hamuje translację częściowo poprzez inaktywację szlaku mTOR i/lub uniemożliwienie formowania kompleksu fosforylowanego czynnika eIF4F.

4. Uwagi do rozprawy doktorskiej

1. Tytuł pracy powinien odzwierciedlać zawartość pracy ale niekoniecznie wyszczególniać jej części składowe. Rozprawa musi stanowić spójne dzieło a nie jej pojedyncze elementy konstrukcyjne.
2. Tłumaczenie nazwy białka G3BP1 (str. 7) na język polski jest niezręczne.
3. W pracy (str. 13, 21) znajduje się stwierdzenie, że białko krypt uczestniczy w regulacji takich procesów jak np. transport jądrowo-cytoplazmatyczny. Czy Autorka zastanawiała się nad molekularnymi sygnałami importu białka do jądra i eksportu do cytoplazmy w głównych białkach kondensatów?
4. Kinazy należą do grupy transferaz katalizujących reakcję przeniesienia grupy fosforanowej z ATP do substratu. Kinaza fosforyzująca nie jest dobrym terminem (str. 15).
5. Co oznacza, że białko i mRNA tworzą agregaty, kondensaty czy kompleksy (str. 16)?
6. Niezręczne jest stwierdzenie, że: Istnieje słaba korelacja między wrażliwością komórek na lek a stopniem platynowania DNA?
7. Co oznacza: Agregaty cytoplazmatyczne z białkiem G3BP1? (str. 28).
8. Określenie - technika rybopuromycylacji (str. 31) brzmi dziwnie.
9. Zapis literatury (str. 34, 35, 36 itd...) wymaga korekty.



10. Doktoranta stwierdza, że „zbadaliśmy” inną alternatywną drogę działania cisPt, t.j. wpływ tego leku na potranskrypcyjną regulację ekspresji genów, która może indukować efekt cytotoxyczności. Wydaje się, że to stwierdzenie jest zbyt daleko idące (*Lugones Y, Loren P, Salazar LA, Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved, Biomolecules. 2022;12(10):1365; Tatjana Lumpp, Sandra Stöber, Franziska Fischer, Andrea Hartwig, Beate Köberle Role of Epigenetics for the Efficacy of Cisplatin International Journal of Molecular Sciences 2024;25(2):1130*).
11. Autorka twierdzi, że ogniska cytoplazmatyczne wykazują pewne podobieństwa do kanonicznych SG np. obecność G3BP1. Ta obserwacja jest zbyt słaba, aby uzasadniała taki wniosek (*Sandra Stöber, Tatjana Lumpp, Franziska Fische, Sarah Gunesch, Paul Schumacher, Andrea Hartwig Effect of Long-Term Low-Dose Arsenic Exposure on DNA Methylation and Gene Expression in Human Liver Cells, International Journal of Molecular Sciences 2023;24(20):15238*).

5. Wniosek końcowy

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć badawczych mgr Pauliny Pietras uważam, że Doktorantka:

- i) rozporządza rozległą wiedzą teoretyczną w tematyce objętej rozprawą,
- ii) dysponuje umiejętnościami niezbędnymi do prowadzenia prac eksperymentalnych,
- iii) posiada potencjał intelektualny do rozwiązywania problemów badawczych,
- iv) ma zdolność stawiania hipotez oraz proponowania rozwiązań.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 22018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami), ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późniejszymi zmianami) oraz wypełnia Regulamin postępowania w sprawie nadania stopnia doktora na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu.

Wnoszę do Kapituły Kolegium Nauk Medycznych o dopuszczenie mgr Pauliny Pietras do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Pietras oparta jest na dwóch pracach eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie międzynarodowych o współczynniku wpływu IF 140 i 100. Jest to warunek konieczny do wyróżnienia rozprawy. W związku z tym zwracam się z uprzejmą prośbą do Kapituły Kolegium Nauk Medycznych UMP o rozważenie wyróżnienia rozprawy.

