



Prof. dr hab. Marta Międzyńska
Pracownia Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Dzielnica MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 16.06.2015
L.dz. nr 21/2015

Due

Warszawa, 14.06.2015 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Alicji Sznarkowskiej

p.t.: “Aktywacja białka TAp73 jako strategia zwalczania komórek nowotworowych pozbawionych białka p53”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa P. Bielawskiego
na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed

Rozprawa doktorska pani mgr Sznarkowskiej dotyczy mechanizmów molekularnych działania białek z rodziny p53 w regulacji procesów onkogenezy. Białko p53 jest kluczowym supresorem nowotworzenia w komórce: mutacje genu i/lub zaburzenia aktywności tego białka występują w znacznej proporcji różnych typów nowotworów. O ile białko p53 jest przedmiotem intensywnych badań od ponad trzech dekad, to jego dwa później odkryte ortologi - białka p63 i p73 - pozostają słabiej poznane. Regulacja aktywności poszczególnych członków rodziny p53 jest bardzo złożona i zachodzi na różnych poziomach, począwszy od transkrypcji i alternatywnego składania mRNA aż po modyfikacje potranslacyjne i kontrolę stabilności białek. Wydaje się, że z powodu swego możliwego działania jako supresory nowotworów także białka p63 i p73 mogłyby stanowić cel interwencji terapeutycznych, a recenzowana rozprawa wpisuje się w ten nurt światowych badań. Jej celem było określenie mechanizmów działania fotouczulacza protoporfiryny IX (PpIX) w komórkach pozbawionych białka p53, a w szczególności jego wpływu na supresorowe izoformy białka p73 (tzw. białka TAp73). Zaprezentowane badania dotyczą ważnego problemu naukowego i medycznego, a ich wyniki przyczyniają się do zrozumienia podłoża molekularnego indukowanej terapeutycznie śmierci komórek nowotworowych.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 101 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniem oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp (23 strony) zawiera 6 podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po jednostronicowym przedstawieniu celów pracy następuje opis materiałów i metod (15 stron). Wyniki (24 strony) są podzielone na 6 podrozdziałów, a dyskusja w formie 3 podrozdziałów liczy 11 stron. Rozprawa kończy się jednostronicowym podsumowaniem i

MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ W WARSZAWIE

ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa
secretariat@iimcb.gov.pl

tel.: (48 22) 597 07 00, fax: (48 22) 597 07 15
www.iimcb.gov.pl

wykazem wniosków, spisem literatury zawierającym 155 pozycji (niestety niepełnym, co opisano poniżej) oraz spisem rycin i tabel.

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy jest bardzo dobrym, jasnym i uporządkowanym omówieniem zagadnień leżących u podstaw pracy doktorskiej: roli białek z rodziny p53 w nowotworzeniu, aktywności białka TAp73 i mechanizmów jej kontroli w komórce, charakterystyki związków niskocząsteczkowych przywracających funkcjonalność białkom z rodziny p53 oraz mechanizmów stresu siateczki śródplazmatycznej i autofagii indukowanych przez związki niskocząsteczkowe. Wstęp jest bardzo bogato ilustrowany aż czternastoma rycinami, co znacząco przyczynia się do jego dużej przejrzystości i łatwości w czytaniu.

Bardzo wysoko oceniam tę część rozprawy, którą przeczytałam z zaciekawieniem. Na pochwałę zasługuje odpowiedni dobór treści, podanych w sposób logiczny i czytelny, na właściwym poziomie szczegółowości. Wstęp jest oparty na bogatym piśmiennictwie i dokumentuje dużą wiedzę Autorki w tematyce pracy.

Moje uwagi do tej części rozprawy są ograniczone do drobnych niedociągnięć formalnych i terminologicznych, wymienionych poniżej, które nie wpływają na moją bardzo wysoką jej ocenę:

- nazwa handlowa preparatu trastuzumab to Herceptin® (a nie Hercepin®, str. 10),
- nieprawidłowa pisownia genów „bcr i abl” (powinno być „*BCR* i *ABL1*”, str. 11),
- oficjalne nazwy genów kodujących białka p63 i p73 u myszy to: *Trp63* i *Trp73* (a nie *TP63*, *TP73*, gdyż są to oficjalne nazwy genów ludzkich; str. 14),
- w języku polskim nie występuje słowo „ksenograft” (str. 20 oraz w dalszych częściach rozprawy), jego możliwe określenia to: przeszczep heterologowy, ksenogeniczny czy obcogatunkowy,
- poprawna pisownia „Eucaryota” to Eukaryota (str. 33),
- niespójne używanie nazw sekwestosom 1 lub p62/SQTM1, bez wyjaśnienia, że dotyczą tego samego białka (str. 34-35).

W rozdziale **Cele pracy** wypunktowano trzy krótkie cele szczegółowe, które zostały poprawnie sformułowane i zrealizowane w toku pracy. Zastanawia jedynie, iż cele te koncentrują się bardziej na mechanizmach działania protoporfiryny PpIX, niż aktywacji białka TAp73, czego można by oczekiwać po tytule rozprawy. Wydaje się, że tytuł mógłby precyzyjniej odzwierciedlać cele i treść pracy.

Materiały i metody zostały przedstawione w kolejnym rozdziale i dobrane odpowiednio do założonych celów. Ich zakres jest szeroki, co wskazuje na dużą biegłość i sprawność Doktorantki w posługiwaniu się warszatem doświadczalnym w dziedzinie molekularnej biologii komórki. W zdecydowanej większości opis metod jest kompletny i wystarczająco szczegółowy do powtórzenia doświadczeń. Dodatkowych uzupełnień wymagałyby jedynie podrozdziały: 3.2.6 Mikroskopia fluorescencyjna i 3.2.14 Wyciszenie ekspresji genów. W tym pierwszym zabrakło podania używanych stężeń barwników do znakowania organelli oraz warunków obrazowania mikroskopowego, w tym zakresów długości fali do wzbudzania i zbierania emitowanej przez PpIX fluorescencji. Dobrym

przewodnikiem w zakresie poprawnego opisu metod obrazowania, a także dopuszczalnej obróbki obrazów mikroskopowych, są instrukcje dla autorów w czasopiśmie *Journal of Cell Biology*, które są obecnie światowym standardem. Z kolei w opisie metod wyciszenia ekspresji genów nie podano źródła nukleotydów siRNA oraz typu użytej kontroli negatywnej. Ponadto przydatne byłoby wskazanie gdzie w obrębie genu *TP73* leżą sekwencje docelowe dla użytych preparatów siRNA, aby zrozumieć które z izoform mogą być przez nie wyciszone.

Wyniki pracy obejmują 24 ryciny i jedną tabelę, przedstawiając wpływ protoporfiryny PpIX kolejno na: apoptozę, stres siateczki śródplazmatycznej, stres oksydacyjny, autofagię i stabilizację białka TAp73 w komórkach pozbawionych białka p53, a kończąc na doświadczeniach testujących rolę białka TAp73 w apoptozie wywołanej działaniem PpIX. Autorka badała dwie nowotworowe linie komórkowe (raka płuca i jelita grubego) pozbawione białka p53. Wykazała, że PpIX powoduje ich śmierć na drodze apoptozy indukowanej na ścieżce wewnętrznej, której towarzyszył chroniczny stres siateczki śródplazmatycznej oraz wzmożona autofagia. Ponadto Doktorantka udowodniła, że PpIX wiąże się do białka TAp73 i zaburza jego oddziaływanie z białkami Itch, MDM2 i NQO-1, co prowadzi do stabilizacji TAp73 w komórce. Z kolei obniżenie poziomu białka TAp73 powodowało zmniejszoną odpowiedź apoptotyczną komórek na PpIX, wskazując, że białko TAp73 sprzyja śmierci komórek nowotworowych traktowanych PpIX.

Generalnie bardzo pozytywnie oceniam poziom merytoryczny i techniczny zamieszczonych w rozprawie wyników, a także sposób ich prezentacji. Autorka przedstawiła spójną linię badawczą, jasno przedstawiła i poprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki. Badania Doktorantki przyczyniają się do bardziej szczegółowego zrozumienia molekularnych mechanizmów działania PpIX w komórkach nowotworowych, co jest istotne dla zastosowań terapeutycznych tego związku.

Podczas lektury tej części rozprawy nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

- Nie jest dla mnie jasne w jaki sposób wyliczano procent komórek apoptotycznych po traktowaniu PpIX, wyznaczony metodą cytometrii przepływowej z użyciem jodku propidyny (PI), który znakuje komórki martwe (Ryc. 4.1 i 4.13). Autorka stwierdza, że „liczbę PI-pozytywnych komórek po traktowaniu PpIX normalizowano do liczby takich komórek w nietraktowanej kontroli”, a na wykresach przedstawiono „% komórek PI-pozytywnych normalizowanych do kontroli”. Normalizacja oznacza zwyczajowo porównywanie do kontroli uznawanej za jedną jednostkę lub 100%. W przypadku opisywanych doświadczeń kontrola nietraktowana zawierająca 100% komórek martwych nie ma sensu biologicznego, a wartości po traktowaniu komórek PpIX na poziomie 40-60% wskazywałyby wręcz na wzrost przeżywalności komórek czyli przeciwnie do twierdzeń Autorki. Zgodnie z zamieszczoną w rozprawie interpretacją zakładam więc, że wykresy prezentują odsetek komórek martwych wśród wszystkich komórek w danej próbie (określonych jako 100%), choć nie jest to zgodne z opisem rycin. Jaki jednak był podstawowy poziom apoptozy w komórkach nietraktowanych PpIX? Proszę o wyjaśnienie tego problemu podczas obrony.

- W rozdziale 4.6.1 Autorka prezentuje dwa przeciwstawne wnioski dotyczące tej samej kwestii. Tytuł podrozdziału brzmi: „Wyciszenie ekspresji *TAP73* zmniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na PpIX”, podczas gdy w tekście stwierdzono: „Komórki z wyciszoną ekspresją supresorowych izoform białka TAp73 były bardziej wrażliwe na

protoporfirynę IX niż komórki kontrolne”, podobnie jak podpis pod ryciną 4.22: „Wyciszenie ekspresji *TP73* w linii H1299 uwrażliwia komórki na protoporfirynę IX”. Sądząc po zamieszczonych zdjęciach szalek z komórkami wybarwionymi fioletem krystalicznym, prawdziwe jest stwierdzenie z tytułu rozdziału.

- W doświadczeniach z normalnymi ludzkimi fibroblastami traktowanymi PpIX (Ryc. 4.3) należałoby przeprowadzić dalsze testy (nie tylko sprawdzanie cięcia polimerazy PARP-1), aby przekonująco argumentować o mniejszej wrażliwości komórek prawidłowych na proapoptotyczne działanie PpIX. Zakres testów powinien być co najmniej podobny do tych wykonanych dla komórek nowotworowych (Ryc. 4.2).

- Pewne zastrzeżenia budzi analiza lokalizacji wewnątrzkomórkowej PpIX przedstawiona w rozdziale 4.2.1. Autorka pisze o danych literaturowych opisujących lokalizację PpIX w błonie komórkowej, mitochondriach i aparacie Golgiego, ale nie podaje żadnych cytowań (jedno pojawia się dopiero w dyskusji). Ponadto Doktorantka stwierdza, że w rozprawie wykazano po raz pierwszy akumulację PpIX w strukturach siateczki śródplazmatycznej komórek nowotworowych, co nie jest prawdą, bo taka informacja jest dostępna w literaturze (np. Chen R i wsp. Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy. *Int J Oncol.* 2008; 32:861-7, gdzie analizowano komórki chłoniaka). Z kolei przedstawione na rycinach 4.4-4.6 są mało przejrzyste z uwagi na użyte kolory. W dziedzinie obrazowania standardem jest przedstawianie obrazów jednokanałowych w skali szarości, a jedynie złożenie kilku kanałów w kolorze. Jest to spowodowane faktem, że oko ludzkie może rozpoznać dużo więcej odcieni szarości odpowiadających intensywności barwienia niż odcieni kolorów zielonego, czerwonego czy niebieskiego. Z tego względu kolorowe obrazy mikroskopowe, są dużo trudniejsze do subiektywnej oceny intensywności fluorescencji niż obrazy czarno-białe. Warto pamiętać, że obrazy rejestrowane przez systemy konfokalne i większość kamer mikroskopów fluorescencyjnych są czarno-białe, więc kolor ostatecznej prezentacji jest i tak pseudokolorem nadanym podczas obróbki obrazu. Wśród przedstawionych obrazów, barwienie PpIX w komórkach H1299 (Ryc. 4.5) jest słabe (w porównaniu do Ryc. 4.4 i 4.6), a jego współwystępowanie ze znacznikami przedziałów wewnątrzkomórkowych jest przez to mało przekonujące.

- Autorka dokumentuje wzrost ilości białka TAp73 w komórkach nowotworowych traktowanych PpIX, co jest przedstawione np. na Ryc. 4.16, 4.18 czy 4.24. Takiego wzrostu nie widać jednak w analizach Western blot z Ryc. 4.17. Czy w doświadczeniu tym można być pewnym poprawnego działania PpIX?

- Na wykresie Ryc. 4.23 przedstawiono wpływ wyciszenia ekspresji genu *TP73* na ekspresję genu *PUMA* (oficjalna nazwa to *BBC3*) w komórkach traktowanych PpIX. Zastosowana normalizacja nie pozwala jednak ocenić czy wyciszenie ekspresji *TP73* powodowało zmiany w poziomie transkryptu *BBC3* w komórkach nietraktowanych PpIX. Jest to istotna informacja, której zabrakło w tekście.

Dyskusja rozprawy jest dojrzałym, solidnym i ciekawym opracowaniem, które omawia i interpretuje wyniki własne w kontekście danych literaturowych. Podobnie jak i Wstęp rozprawy, również tę jej część oceniam bardzo wysoko. Podział Dyskusji na trzy podrozdziały jest logiczny i porządkuje omawiane zagadnienia. Ich podsumowaniem jest również przejrzysty schemat zamieszczony jako Ryc. 5.1, stanowiący graficzne streszczenie

wyników i wniosków z rozprawy. Dyskusja jest niewątpliwie potwierdzeniem wiedzy i sprawności Doktorantki w poruszaniu się w skomplikowanej materii biologii komórek nowotworowych. Co istotne, Autorka unika powtórnego omawiania wyników doświadczeń, a jedynie w sposób krytyczny konfrontuje własne dane z doniesieniami literaturowymi. Doktorantka celnie identyfikuje też kierunki przyszłych badań, proponując dalsze doświadczenia do wykonania w oparciu o uzyskane rezultaty.

W tej części rozprawy chcę podzielić się jedną wątpliwością, dotyczącą w mojej opinii nadinterpretacji wyników. W początkowym paragrafie Dyskusji Autorka stwierdza, że w rozprawie „po raz pierwszy opisano chroniczny stres ER jako mechanizm prowadzący do śmierci komórek nowotworowych po traktowaniu protoporfiryną IX”. Uważam, że poprawnym byłoby stwierdzenie, że opisano chroniczny stres ER jako mechanizm towarzyszący śmierci komórek po traktowaniu PpIX. W pracy nie wykazano bowiem zależności przyczynowej, że stres ER powoduje apoptozę komórek traktowanych PpIX (choć oczywiście jest to prawdopodobne). Aby taką zależność ustalić, należałoby wykonać dodatkowe doświadczenia, tak jak to zrobiono badając rolę autofagii w indukcji śmierci komórek (zahamowanie autofagii zmniejszyło apoptozę pod wpływem PpIX).

Ponadto, w Dyskusji zwracają uwagę wielokrotne odniesienia do „danych niepublikowanych”. Nie jest dla mnie jasne czy są to własne dane Autorki (a jeśli tak, to dlaczego nie zostały zamieszczone w rozprawie), zespołu Autorki czy innych badaczy?

Jednostronicowy rozdział **Podsumowanie i wnioski** kończy rozprawę. Z wyjątkiem powyższego zastrzeżenia co do roli stresu ER jako mechanizmu prowadzącego do śmierci komórek traktowanych PpIX, wnioski zostały poprawnie sformułowane.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem i stosunkowo starannie, z dość nielicznymi błędami literowymi, których nie będę wymieniać. W paru miejscach pojawiły się niezgrabne anglicyzmy, np. „sygnalizacja (...) jest finalnie transmitowana” (str. 33), „atenuacja translacji” (str. 60), „promocja wiązania białka” (str. 86) czy „*clue* personalizowanej medycyny” (str. 88 – po polsku używamy w tym kontekście francuskiego słowa *clou*).

Jednak najpoważniejszym problemem rozprawy są liczne błędy w spisie literatury. Mimo iż chciałam jedynie wrywkowo znaleźć w spisie piśmiennictwa interesujące mnie pozycje cytowane w tekście, to natknęłam się na liczne braki i pomyłki, które wymieniam poniżej.

W spisie literatury brak cytowanych w tekście pozycji: Yu i wsp. 2014 (str. 11); Tovar i wsp. 2013 (str. 26); Bykov i wsp. 2011 (str. 30); Murray-Zmijewski i wsp. 2006 (str. 70), Shazadi i wsp. 2011 (str. 79); Candi i wsp. 2014 oraz Dobbstein i wsp. 2004 (str. 84).

Następujące pozycje mają w tekście inny rok publikacji niż w spisie literatury (przy założeniu, że chodzi o te same publikacje): Li Q i wsp. 2013/2012 (str. 29), Sznarkowska i wsp. 2010/2011 (str. 49, 66 i dalsze), Li i wsp. 2013/2014 oraz Su i wsp. 2014/2013 (str. 77), Zawacka-Pankau i wsp. 2008/2007 (str. 83) oraz Soussi 2003/2004 (str. 87). Pozycja Venkatanarayan i wsp., 2015 (str 20) w spisie literatury jest datowana na 2014 i brak w niej

szczegółowych danych bibliograficznych. Podobnych danych brak w pozycjach spisu numer 7, 16, 27, 38 i 91.

W spisie literatury są liczne pomyłki w kolejności alfabetycznej pozycji, co dodatkowo utrudnia ich szukanie.

Inne niedociągnięcia edytorskie to: rozdział 4.5 na str. 71 powinien być numerowany jako 4.5.5 oraz nieprawidłowy nagłówek „Spis piśmiennictwa” na stronie rozdziału 6 „Podsumowanie i wnioski”.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Alicji Sznarkowskiej podejmuje istotny problem naukowy z dziedziny molekularnej biologii komórki, o potencjalnym znaczeniu klinicznym w terapii nowotworów. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, a uzyskane wyniki są cennym przyczynkiem do wiedzy przedmiotu i solidną podstawą do dalszych badań. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i sprawnością eksperymentatora. Moje uwagi mają przede wszystkim charakter dydaktyczny i nie umniejszają wartości rozprawy, a są wskazówkami do planowania przyszłych badań i prezentacji ich wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Alicji Sznarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marko Kizyński