

Dr hab. Monika Słomińska-Wojewódzka, prof. UG
Katedra Biologii i Genetyki Medycznej
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
tel. 58 523 60 35
e-mail: monika.slominska-wojewodzka@ug.edu.pl

Gdańsk, dnia 29 marca 2021 roku

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Aleksandry Sobolewskiej
„Rola czynnika XPB1 w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego”

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy funkcjonowania retikulum endoplazmatycznego (ER) podczas stresu, wywołanego w odpowiedzi na gromadzące się w tym organellum niesfałdowane lub niepoprawnie sfałdowane białka. Badania związane były bezpośrednio z regulacją szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres ER zwanej odpowiedzią na niezwinięte białka (UPR, ang. *unfolded protein response*), aktywowanej w celu przywrócenia homeostazy retikulum endoplazmatycznego. Praca doktorska została zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Rafała Bartoszewskiego oraz Pana dr hab. Jarosława Króliczewskiego.

Szorstkie retikulum endoplazmatyczne jest wysoce wyspecjalizowanym organellum komórki eukariotycznej odpowiedzialnym za syntezę i prawidłowe fałdowanie białek komórkowego szlaku sekrecji: ER, aparatu Golgiego, endosomów, lizosomów, białek wbudowywanych w błonę komórkową, a także wydzielanych na zewnątrz komórki. Przyjmuje się, że ponad 30% białek syntetyzowanych w komórkach eukariotycznych jest kierowane do tego organellum. Utrzymanie homeostazy białkowej ER jest zatem kluczowe z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania nie tylko pojedynczej komórki, ale także całego organizmu. Odpowiedź UPR odgrywa zasadniczą rolę w tym procesie, prowadzi do redukcji stresu ER i przywrócenia proteostazy, jednakże w przypadku chronicznego stresu zostają uaktywnione mechanizmy apoptozy lub autofagii. Podczas odpowiedzi UPR kluczowa jest aktywacja trzech transbłonowych receptorów: PERK, ATF6 oraz IRE1. Prowadzi to do włączenia określonych szlaków sygnalizacyjnych, czego efektem jest zahamowanie ogólnej syntezy białek, zwiększenie produkcji

określonych białek opiekuńczych, a także degradacja nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów. Mechanizm tego procesu jest skomplikowany i cały czas słabo poznany. Głównym celem pracy doktorskiej mgr Sobolewskiej było uzyskanie modelu badawczego umożliwiającego analizę istotnych czynników transkrypcyjnych UPR: XBP1, ATF4 oraz CHOP w kontekście regulacji odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka oraz decyzji warunkujących przeżycie bądź śmierć komórki. Dokładnie zrozumienie zagadnień związanych ze stresem ER, aktywacją UPR i zależnej od UPR apoptozy są kluczowe w zrozumieniu funkcjonowania komórki eukariotycznej, a zaburzenia tych procesów determinują przebieg szeregu poważnych schorzeń ludzkich. Wybór tematyki badawczej podjętej przez mgr Aleksandrę Sobolewską jest zatem wysoce uzasadniony.

Rozprawa doktorska została przedstawiona w formie manuskryptu liczącego 140 stron. Posiada ona klasyczny układ dla tego typu opracowań. Składa się ze spisu treści, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników oraz dyskusji. Rozprawa zawiera również bibliografię złożoną ze 183 pozycji, obejmujących prace opublikowane w ciągu ostatnich kilkunastu lat.

W rozdziale „Wstęp” doktorantka opisuje retikulum endoplazmatyczne, fałdowanie i modyfikacje białek zachodzące w tym organellum, definiuje odpowiedź UPR, jej poszczególne szlaki sygnalizacyjne, zwraca również szczególną uwagę na działanie czynnika transkrypcyjnego XBP1, a także czynników ATF4 i CHOP. Podkreśla także znaczenie stresu ER w patomechanizmach ludzkich schorzeń. Wstęp w sposób wyczerpujący omawia zagadnienia związane z tematyką pracy, rysunki zostały przygotowane starannie i czytelnie. Uważam jednakże, że Rysunek 3 dotyczący porównania cytoplazmatycznych struktur ludzkiego IRE1 α oraz drożdżowego IRE1, z obszernym opisem obejmującym bardzo dokładną charakterystykę elementów strukturalnych obu białek jest zbędny w kontekście przedstawionej pracy doktorskiej.

Cel rozprawy został precyzyjnie i jasno postawiony, w pracy zawarto także cele szczegółowe. Dobrym dopełnieniem tej części pracy byłoby sformułowanie hipotezy badawczej.

Rozdział „Materiały i Metody” charakteryzuje się bardzo dokładnym opisem stosowanych w pracy materiałów oraz wyczerpującym, drobiazgowym opisem metodologii. W rozdziale tym opisano klonowanie sekwencji czynników transkrypcyjnych, prowadzenie hodowli komórkowych i transfekcję komórek, uzyskanie stabilnych linii komórkowych, indukcję ekspresji genów w systemie Tet-On, analizę poziomu ekspresji genów, wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA, analizy statystyczne, podano także oprogramowanie wykorzystywane przy analizie funkcjonalnej genów. W rozdziale znajduje się także opis elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym oraz reakcji Western blot. Jak wynika z informacji zawartych w dalszej części pracy, elektroforeza SDS-

PAGE oraz Western blot nie były bezpośrednio wykonywane przez Doktorantkę. Informacja na ten temat powinna znaleźć się w opisie metod.

Rozdział „Wyniki” składa się z pięciu głównych części, poprzedzonych bardzo czytelnym schematem badań przeprowadzonych w ramach wykonywanej pracy doktorskiej. W rozdziale „Klonowanie” Autorka dokładnie opisuje przygotowanie konstruktyw plazmidowych wykorzystywanych w dalszych etapach pracy. Rysunek 19 pokazuje analizę wielkości plazmidów po rozdziale w żelu agarozowym. Opis wskazuje, że plazmidy nie były poddane cięciu przez enzymy restrykcyjne. Wynik rozdziału DNA plazmidowego przeprowadzonego w takich warunkach jest dość zaskakujący. Po rozdziale nietrawionego DNA plazmidowego można zwykle zaobserwować 3, a nawet 4 prążki obejmujące DNA w formie kolistej naciętej (OC), DNA w formie liniowej (L), w formie superzwiniętej (CCC) oraz DNA w formie kolistej zrelaksowanej jednoniciowej. Forma liniowa odpowiada orientacyjnie wielkości plazmidu i migruje jak DNA plazmidowe cięte enzymem restrykcyjnym, ale przy dobrym jakościowo DNA plazmidowym to forma CCC powinna być formą dominującą. Duża ilość formy liniowej może świadczyć np. o zanieczyszczeniu preparatu nukleazami. Należy jednakże założyć, że DNA otrzymane przed Doktorantką mogło być z powodzeniem użyte do reakcji PCR, której celem było uzyskanie fragmentów DNA genów określonych czynników transkrypcyjnych. Potwierdzeniem otrzymania odpowiednich fragmentów PCR jest rozdział w żelu agarozowym zaprezentowany na Rysunku 20. Rozdział DNA plazmidowego niepoddanego cięciu restrykcyjnym zaprezentowany jest także na Rysunku 26 oraz 27, ścieżka 3. W tym ostatnim przypadku porównany jest rozdział plazmidu nieciętego oraz podanego działaniu restryktaz *NheI* oraz *MluI* (Rysunek 27, ścieżki 3 i 4). Wielkość plazmidu trawionego restryktazami odpowiada całkowitej wielkości DNA plazmidu pCW57 (8158 pz) i nie jest tożsama z wielkością plazmidu podanego rozdziałowi elektroforetycznemu w formie nieciętej (Rysunek 27, ścieżka 3), co zresztą zgodne jest z oczekiwaniami. Rozdział DNA plazmidowego nieciętego enzymami restrykcyjnymi dostarcza cennych informacji na temat jakości DNA, nie jest jednak zazwyczaj używany do określenia wielkości DNA plazmidowego. Należy jednak podkreślić, że te drobne nieścisłości techniczne nie miały wpływu na przebieg procesów przygotowania określonych konstruktyw plazmidowych. W dalszej części pracy mgr Sobolewska oznaczała ekspresję genów kodujących określone czynniki transkrypcyjne wprowadzonych w systemie Tet-One do komórek ludzkiego nienowotworowego nabłonka oskrzeli. Autorka dokładnie opisuje wyniki, tłumaczy możliwe przyczyny występowania niepożądanych, podwyższonych ilości mRNA czynników transkrypcyjnych w próbach nieindukowanych lub też w próbach transfekowanych wektorem pTetOne. W eksperymencie analizy ekspresji genu XBP1(S) warto byłoby dołączyć próbę komórek

transfekowanych wyjściowym wektorem, tak jak zrobiono to w przypadku innych analizowanych mRNA. Autorka komentuje jedynie, że bardzo wysoki poziom ekspresji genu XBP1(S) w próbie nieindukowanej może być spowodowany aktywacją UPR w odpowiedzi na transfekcję wektorem pTetOne. Brak tej kontroli nie ma jednak wpływu na dalszy przebieg prac eksperymentalnych. Autorka zwraca również uwagę na niską wydajność ekspresji XBP1(U) w próbie traktowanej doksycyliną i na brak istotnego wzrostu ilości mRNA genu ATF4. W tym ostatnim przypadku mogło to być spowodowane, jak opisano w pracy, niską przeżywalnością komórek po transfekcji. Wyniki opisanych eksperymentów nie dały zadawalających rezultatów. W podsumowaniu tej części pracy Autorka wyjaśnia, dlaczego wykorzystanie unieśmiertelnionych komórek ludzkiego nienowotworowego nabłonka oskrzeli jako modelu badawczego nie było możliwe w dalszych eksperymentach. W kolejnych etapach badań Doktorantka wykorzystwała komórki HeLa. W tej części opisu wyników badań Autorka również dokładnie komentuje otrzymane dane oraz tłumaczy, dlaczego w dalszych etapach pracy użyto jedynie konstruktów XBP1(S) oraz XBP1(U). Konstrukcja stabilnych linii komórkowych HeLa przy użyciu systemu Tet-One nie była możliwa i w tym celu wykorzystano system lentiwirusowy. Wyselekcjonowano po trzy klonów HeLa dla każdego z badanych genów i określono optymalny wariant eksperymentalny użycia klonu nr 5 z transgenem XBP1(S) oraz klonu 2 dla komórek z transgenem XBP1(U), przy zwiększeniu stężenia doksycyliny z 100 ng/ml do 400 ng/ml. Podobnie jak w poprzedniej części pracy, Autorka dokładnie przeanalizowała poszczególne wyniki i w sposób czytelny i zrozumiały wytłumaczyła decyzje wyboru poszczególnych wariantów. Eksperymenty Western blot przeprowadzone przez inną osobę pokazały, że po indukcji wybranych klonów komórek HeLa XBP1(S) oraz XBP1(U) dochodzi do około 20-krotnego wzrostu ilości XBP1(S) oraz do około 2,5-krotnego wzrostu ilości XBP1(U) względem komórek kontrolnych. Indukcja XBP1(U) nie miała wpływu na zmiany ilości XBP1(S). Całogenomowe analizy transkryptomyczne komórek HeLa XBP1(S) klon 5 oraz XBP1(U) klon 2, w których indukowano ekspresję wprowadzonych transgenów pokazały, że każdy z analizowanych klonów charakteryzował się głównie unikalnym profilem ekspresji. Otrzymane wyniki potwierdzają kluczową rolę XBP1(S) w regulacji szlaku UPR, również jego wpływ na apoptotyczną aktywność tej odpowiedzi. Należy podkreślić, że zidentyfikowano także nieznanne dotychczas szlaki regulatorowe UPR, które prawdopodobnie zależne są od czynnika XBP1(S). To są to najbardziej interesujące wyniki tej pracy, choć jak zaznacza Autorka, uzyskane profile ekspresji wymagają dalszych analiz. Analiza profilu ekspresji po indukcji transgenem XBP1(U) pokazuje jego możliwą tkankowo specyficzną rolę w np. w komórkach nerwowych, co też jest bardzo ciekawą obserwacją.

W rozdziale „Dyskusja”, Doktorantka w sposób przemyślany interpretuje wyniki swoich badań w kontekście dostępnej literatury przedmiotu. Zawraca uwagę na inne, często wykorzystywane modele badawcze UPR i dyskutuje zalety podejścia eksperymentalnego zastosowanego podczas wykonywania pracy doktorskiej. W szerszym kontekście opisuje też wybór konkretnych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w odpowiedź UPR, które były przedmiotem pracy, a także dyskutuje najistotniejsze wyniki analiz transkryptomicznych.

W kontekście prezentowanych wyników i ich dyskusji bardzo proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących zagadnień:

- w przypadku indukcji XBP1(S) ilość mRNA dla 386 transkryptów wzrosła, wśród nich zwrócona uwagę na czynniki PMAIP1 (NOXA) oraz GADD45A, związanych z apoptotyczną aktywnością UPR, a także czynnika GADD34, odpowiedzialnego za negatywną regulację szlaku PERK. To są bardzo ciekawe obserwacje. Czy zmiany w poziomie ekspresji tych genów wyróżniały się na tle innych genów, których ekspresja także wzrosła?
- doniesienia literaturowe podają, że pod kontrolą XBP1(S) znajduje się m.in. gen kodujący białko P58^{IPK}, które jest, podobnie jak GADD34, negatywnym regulatorem szlaku PERK. Czy indukcja XBP1(S) miała wpływ na wzrost ilości mRNA transkryptu DNAJC3 (P58^{IPK})? Jak można skomentować nowe odkrycie o potencjalnych zależnościach między XBP(S) a GADD34 w kontekście znanych powiązań regulatorowych P58^{IPK} i XBP1(S)? Jak te powiązania można opisać stosując model badawczy wykorzystywany w pracy doktorskiej?
- jak można skomentować powiązania XBP1(S) z NOXA i GADD45A w szerszym kontekście apoptotycznej aktywności UPR?

Oceniając stronę edytorską, należy zaznaczyć, że rozprawa została przygotowana bardzo starannie. Zawiera czytelne rysunki, dokładne mapy wektorów, tabele podsumowujące wyniki eksperymentalne. Opisy zawierają informacje konieczne do interpretacji przedstawionych danych. W pracy występują bardzo nieliczne błędy literowe czy interpunkcyjne. Przy długiej formie opracowania wymagało to dużej uwagi ze strony Doktorantki. Drobne nieścisłości, które pojawiły się przy opisie wyników, nie mają wpływu na wysoką ocenę pracy:

- str. 66, Rysunek 21 panel B i C przedstawia analizę restrykcyjną otrzymanych klonów pCW57 XBP1(U) oraz XBP1(S), wielkość wektora po wycięciu wstawki to 8158pz, a nie 8101pz (zgodnie z tym co podane jest na Rysunku 27, ścieżka 4),

- str. 70, przy opisie Rysunku 26 w tekście powinno być określenie analiza elektroforetyczna, a nie analiza restrykcyjna. Poprawny zwrot znajduje się przy opisie umieszczonym bezpośrednio pod rysunkiem (str.71),
- str. 91, w tekście podano 130-krotny wzrost indukcji ekspresji XBP1(S) dla klonów 2 i 5, podczas gdy wykres i tabela (Rysunek 38) pokazują odpowiednio około 15-krotny i 13-krotny wzrost. Prawidłowa wartość indukcji XBP1(S) klonu 5 została podana na stronie 95.

Praca została napisana bardzo dobrym językiem naukowym. Drobne uwagi dotyczą określenia „przyswoity poziom ekspresji mRNA” (str. 94), nawet jeśli słowo przyswoity zostało wzięte w cudzysłów to należałoby tutaj użyć innego określenia oraz „wzrost ekspresji białka” (str. 97), gdzie w przypadku ekspresji powinno się mówić o ekspresji genów kodujących określone białka. W tej części tekstu, w przypadku interpretacji wyników Western blot mogłoby być użyte określenie odnoszące się do podwyższonej ilości białka w badanych komórkach.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr Aleksandra Sobolewska zrealizowała zakres badań będący celem dysertacji. Ogólna koncepcja pracy doktorskiej jest starannie przemyślana. Problem badawczy został poprawnie sformułowany. Należy zwrócić uwagę na duży nakład pracy, jaki Doktorantka włożyła w realizację pierwotnego, bardzo ambitnego celu pracy dotyczącego uzyskania stabilnych linii ludzkiego nienowotworowego nabłonka oskrzeli, które byłyby zdolne do indukowanej ekspresji określonych czynników UPR. Mimo niepowodzenia tych eksperymentów, można stwierdzić, że praca zawiera oryginalne i wartościowe wyniki. Uzyskane stabilne linie komórkowe HeLa XBP1(S) i XBP1(U) mogą być wykorzystane do zrozumienia szerszej roli XBP1 w procesach związanych ze stresem ER i regulacją odpowiedzi UPR. Eksperymenty zostały przeprowadzone rzetelnie i będą niewątpliwie stanowić podstawę dalszych badań. **Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r. poz. 882 i 1311). Wnoszę zatem do wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Aleksandry Sobolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Monika Skamińska-Wojewódzka