



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Instytut Pediatrii

Klinika Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych

ul. Szpitalna 27/33
60-572 Poznań

tel.: 61 8547643
fax: 61 8547663
e-mail: alszczep@ump.edu.pl

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Szczepankiewicz
Kierownik Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 09.04.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Sobolewskiej

pt. „Rola czynnika XBP1 w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego”

Promotorzy: Prof. dr hab. Rafał Bartoszewski, dr hab. Jarosław Króliczewski

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej pod kierunkiem promotorów: prof. Rafała Bartoszewskiego i dr hab. Jarosława Króliczewskiego w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki Opus nr 2017/B/NZ3/01485. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 09.02.2021r.

Zaburzenia przebiegu odpowiedzi na niezwinęte białka i związanej z nią apoptozy indukowane stresem retikulum endoplazmatycznego są przyczyną wielu chorób człowieka m.in. nowotworów, chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona) lub zapalnych. Nieprawidłowy przebieg odpowiedzi na niezwinęte białka (UPR) może być też przyczyną zmian patologicznych w obrębie nabłonka dróg oddechowych np. w mukowiscydozie czy astmie oskrzelowej. Mimo wielu badań dotyczących próby zrozumienia regulacji odpowiedzi na niezwinęte białka pod wpływem zaburzenia homeostazy retikulum

endoplazmatycznego (ER) określanej stresem ER, nadal nie ustalono, jakie decyzje zapadają na poziomie molekularnym i kiedy komórka rozpoznaje, że przywrócenie homeostazy ER nie jest możliwe i daje sygnał do apoptozy. Określenie tych mechanizmów utrudnia złożoność regulacji UPR, która aktywuje jednocześnie trzy główne szlaki stresu ER (ATF6, IRE1 α , PERK). Dlatego uzyskanie stabilnych linii komórkowych, umożliwiających kontrolowaną ukierunkowaną ekspresję transgenów wybranych czynników transkrypcyjnych (XBP1, CHOP, ATF4) istotnych dla przebiegu UPR jest celem niezwykle ambitnym.

W piśmiennictwie światowym większość prac skupia się na wykorzystaniu modeli farmakologicznych, w których dochodzi do gwałtownej aktywacji UPR i wszystkich jego składowych, nie obserwowanej w warunkach *in vivo*. Tym większa jest w tym względzie wartość poznawcza rozprawy doktorskiej, która uzupełnia lukę badawczą i stwarza możliwości zastosowania stabilnej linii komórkowej do badania wpływu regulowanej ekspresji poszczególnych czynników transkrypcyjnych na decyzje o losie komórki w warunkach odizolowanych od aktywacji wszystkich składowych UPR w odpowiedzi na stres ER.

Dokonując oceny przedstawionej rozprawy doktorskiej należy przede wszystkim wskazać na trafność wyboru jej tematu. Biorąc pod uwagę, że procesy zaburzające działanie UPR i związanej z nim apoptozy leżą u podłoża wielu chorób, w tym również chorób nowotworowych, opracowanie stabilnej linii komórkowej umożliwiającej regulowaną ekspresję wybranych genów czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w UPR i identyfikacja czynników wpływających na UPR, jest istotne nie tylko w aspekcie poznawczym, ale i klinicznym, stwarzając nowe możliwości opracowania terapii chorób, u podłoża których leżą zaburzenia regulacji szlaku UPR.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ, jest obszerna, liczy łącznie z piśmiennictwem 140 stron, z tego 27 stron stanowi „Wstęp”, 1 strona „Cele pracy” „Materiały” – 10 stron, „Metody – 22 strony, „Wyniki” – 26 stron, „Dyskusja” – 16 stron, zamieszczono też streszczenie w języku polskim i angielskim i bibliografię liczącą 183 pozycje literaturowe. Została zachowana właściwa proporcja między poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej, a dobór piśmiennictwa nie budzi zastrzeżeń. Na uznanie zasługuje jasny i przejrzysty styl pracy, a zilustrowanie opisywanych mechanizmów wieloma rycinami ułatwia zrozumienie głównych założeń i wyników. Praca jest napisana poprawną polszczyzną, bez większych uchybień edytorskich.

Rozprawę doktorską rozpoczyna dobrze napisany i wyczerpujący Wstęp, który wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy. Na początku Doktorantka opisuje budowę i najważniejsze funkcje retikulum endoplazmatycznego, a następnie szczegółowo omawia

procesy zwijania i modyfikacji białek zachodzące w retikulum endoplazmatycznym, przy czym, biorąc pod uwagę cel rozprawy, rozdział ten jest nazbyt szczegółowy. W dalszych podrozdziałach wstępu Doktorantka przedstawia zagadnienia związane z zaburzeniem homeostazy w ER oraz przebieg odpowiedzi na niezwinięte białka (UPR). Szczegółowo opisano także mechanizmy UPR i odpowiedzi adaptacyjnej do warunków stresu oraz rolę czynnika transkrypcyjnego XBP1 dla przebiegu UPR, regulacji ekspresji genów oraz znaczenia szlaku IRE1-XBP1 w stanach patologicznych. Na zakończenie Doktorantka opisuje, jak przewlekły stres w ER wpływa na aktywację mechanizmów prowadzących do apoptozy oraz przykłady chorób człowieka, u podłoża których leży stres ER i zaburzenia odpowiedzi UPR. Dane z piśmiennictwa zawarte we Wstępie wskazują na bardzo dobrą znajomość zagadnienia i merytoryczne przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań eksperymentalnych, a piśmiennictwo zostało poprawnie wybrane i właściwie zacytowane.

Celem pracy było uzyskanie modelu *in vitro* umożliwiającego kontrolowaną stabilną ekspresję transgenów wybranych czynników transkrypcyjnych (XBP1, CHOP, ATF4) zaangażowanych w przebieg UPR. Cele szczegółowe obejmowały uzyskanie wektorów umożliwiających wprowadzenie transgenów do komórek i selekcję stabilnych linii klonalnych, jak również analizę konsekwencji kontrolowanych zmian ekspresji transgenów XBP1(S) i XBP1(U) na profil transkryptomiczny komórek metodą sekwencjonowania nowej generacji. Postawione cele Doktorantka realizowała z wykorzystaniem technik biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej w szeregu dobrze zaplanowanych eksperymentów. Założone cele zostały osiągnięte w pracy.

Kolejne rozdziały stanowią opis materiału badawczego oraz stosowanych metod. Opis tej części rozprawy został zaprezentowany w sposób przejrzysty, ze szczegółowym opisem wykonywanych procedur, co pozwala na ocenę poprawnego doboru metod oraz wskazuje na olbrzymią pracę Doktorantki w realizację części eksperymentalnej rozprawy. W mojej opinii, zbyt rozbudowaną część stanowi opis teoretyczny podstawowych metod stosowanych w badaniach molekularnych np. analiza ilościowa DNA metodą spektrofotometryczną czy opis analizy ekspresji genów metodą ilościowego PCR (qPCR). Biorąc pod uwagę, że są to metody znane i powszechnie stosowane, wydaje się, że aż tak szczegółowy opis podstaw teoretycznych (zasada pomiaru stężenia DNA, opis założeń metody ilościowego PCR czy zasadę działania sond typu TaqMan) w rozprawie doktorskiej nie był konieczny.

Rozdział „Wyniki” charakteryzuje uporządkowany opis wyników przeprowadzonych badań dodatkowo zilustrowanych licznymi rycinami. Obszerność tego rozdziału, bogactwo wykorzystanych technik, a także opis eksperymentów wstępnych, służących optymalizacji

wybranych metod są dowodem na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę, mimo trudności metodologicznych, z którymi przyszło się jej zmierzyć w toku realizacji prac badawczych. Do najważniejszych wyników rozprawy należy zaliczyć uzyskanie stabilnej linii klonalnej niosącej transgen XBP1(U) i XBP1(S) oraz analizę wpływu na transkryptom transfekowanych komórek po indukcji ekspresji tych transgenów. Doktorantka wykazała, że wzrost ekspresji XBP1(S) modyfikował ekspresję genów związanych regulacją UPR, ale również apoptozy, odpowiedzi na stres czy przebieg modyfikacji potranslacyjnych białek, co potwierdza jego rolę w regulacji przebiegu UPR. Lektura tej części rozprawy skłoniła mnie do zadania pytania, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na wybór metody RNA-seq do całogenomowej analizy transkryptomicznej. Proszę o uzasadnienie w trakcie obrony, jakie są zalety/wyższość tej metody w porównaniu do innych wysokoprzepustowych metod stosowanych do analizy transkryptomu. Co według Doktorantki stanowi największe ograniczenie RNA-seq?

W rozdziale „Dyskusja” przeanalizowano znaczenie uzyskania stabilnej linii klonalnej niosącej transgen czynnika transkrypcyjnego XBP1 istotnego dla regulacji odpowiedzi na niezwinięte białka. Znaczną część tego rozdziału stanowi podsumowanie wyników eksperymentów, jakie wykonała Doktorantka, aby ostatecznie uzyskać zamierzony cel czyli wyprowadzenie stabilnej linii klonalnej komórek niosących transgen XBP1(S) i XBP1(U). Ten fragment Dyskusji stanowi raczej podsumowanie poszczególnych etapów eksperymentu, niż próbę odniesienia się do istniejącego piśmiennictwa. Za szczególnie wartościowy fragment Dyskusji należy uznać próbę wyjaśnienia przez Doktorantkę przyczyny problemów związanych z uzyskaniem stabilnej linii w pierwszym modelu badawczym czyli komórkach nabłonka oskrzeli (linia 16HBE14o-), a następnie z nieefektywną transfekcją opartą o lipidowe systemy dostarczania plazmidów do komórek w alternatywnym modelu badawczym (komórki HeLa). Dyskusja przeprowadzona jest w sposób systematyczny wraz z krytyczną oceną własnych wyników i świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia i dojrzałości naukowej Autorki.

Zakończenie rozprawy pozostawia pewien niedosyt z uwagi na brak wniosków podsumowujących znaczenie wyników uzyskanych w pracy. Mimo, że Doktorantka zawarła krótkie podsumowanie wyników w ostatnim fragmencie Dyskusji, warto byłoby zwięźliwie rozprawę najważniejszym wnioskiem.

Tekst rozprawy został przygotowany poprawnie merytorycznie i logicznie. Jednak Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów i pewnych nieścisłości, które wymagają wyjaśnienia lub komentarza:

1. W treści rozdziału „Metody” w części opisującej ilościową reakcję PCR Doktorantka nie zaznaczyła, w ilu powtórzeniach wykonywano reakcje dla każdej badanej próbki. Nie opisano również uzasadnienia dla wyboru genu referencyjnego (*TBP*) – czy był to gen wybrany w oparciu o dane eksperymentalne dla badanych próbek (stały poziom ekspresji we wszystkich badanych wariantach doświadczenia) oraz jaki algorytm statystyczny zastosowano do normalizacji analizy ekspresji metodą qPCR.
2. W treści rozdziału „Wyniki” opisującego wyniki dotyczące analizy Western blot proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego do określenia ilości badanego białka wybrała normalizację do całkowitej ilości białka zamiast innych metod np. standaryzacji opartej o określenie ilości badanego białka względem białka referencyjnego. Pewne trudności interpretacyjne tej części wyników stwarza niedostateczny opis rycin, na których nie zaznaczono wielkości fragmentów ani dla badanych próbek ani dla wzorca masy białka (rysunek 41-B i 42-B).
3. Wyniki dotyczące analizy RNA-seq są przedstawione dość ogólnikowo, nie zamieszczono danych np. o liczbie odczytów na próbkę, odsetku zmapowanych transkryptów dla próbki, sposobie normalizacji poziomu ekspresji itp. Częściowo ogólnikowy opis tej części wyników może tłumaczyć fakt, że analizy te zostały wykonane jako usługa zlecona, bez bezpośredniego udziału Doktorantki. Wydaje się jednak, że uzupełnienie tych danych pozwoliłoby na weryfikację wyników i uzupełniłoby informacje o jakości, zarówno próbek wysłanych do analiz, jak i przeprowadzonej analizy sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej.
4. W Dyskusji (s. 118) Doktorantka błędnie pisze, że linia 16HBE14o- to nabłonek płucny. Są to komórki nabłonka oskrzeli.
5. RNA to kwas zatem rodzaj męski, stąd poprawny zapis to „całkowity RNA” nie „całkowite RNA”, czy „izolowane RNA” itd.
6. Zwracam również uwagę na zapożyczenia z języka angielskiego, które z dbałości o język ojczysty wymagają poprawy: „przewlekły stres” zamiast „chroniczny stres” (s. 12), „mRNA ulegające translacji” zamiast „translatowane mRNA” (s. 21); „negatywny regulator ilości aktywnego ATF6” zamiast „ujemny regulator ilości aktywnego ATF6” (s. 21), „w komórkach nie zachodziła ekspresja transkryptu” zamiast „komórki nie ekspresymowały transkryptu” (s. 75) itp.

Pomimo uwag natury porządkującej, pragnę podkreślić, że nie zmniejszają one wartości merytorycznej zarówno przeprowadzonych badań jak i wnioskania. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że badania tego typu są złożone i trudne metodologicznie. Pomimo trudności i

konieczności zmiany modelu eksperymentalnego i metody wprowadzenia transgenów do komórek, Doktorantka przeprowadziła je z sukcesem, osiągając założony cel. Praca jest nowatorska i wskazuje, jak istotne jest uzyskanie właściwego modelu badawczego do badań mechanizmów związanych ze stresem retikulum endoplazmatycznego i odpowiedzią na niezwinięte białka.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Sobolewskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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 tym przedkładam Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Sobolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksandra Szczepankiewicz

Prof. dr hab. Aleksandra Szczepankiewicz