

dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Wrocław, 31.08.2022

## OCENA

### Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Gebert

#### pt. „Rola niekodujących RNA w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego”

Praca doktorska mgr Magdaleny Gebert pt. „**Rola niekodujących RNA w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego**” wykonana została pod opieką promotora prof. dr hab. Rafała Bartoszewskiego w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Część wyników zawartych w rozprawie uzyskanych zostało przy wsparciu finansowym dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki.

Rozprawa przedstawia wyniki badań, których celem była identyfikacja zmian w profilach niekodujących RNA (piRNA oraz miRNA), które mogłyby być związane ze stresem retikulum endoplazmatycznego (ER), modulować przebieg odpowiedzi komórkowej na nieprawidłowo sfałdowane białka (w skrócie z j. ang. UPR – Unfolded Protein Response) i tym samym determinować los komórki podczas tego stresu. W rozprawie podjęto też próbę określenia molekularnych mechanizmów, dzięki którym zmiany ilości określonych miRNA wpływają na los komórek poddanych stresowi ER.

Zaburzenia odpowiedzi na UPR pojawiają się w przebiegu takich chorób jak np. cukrzyca, choroba Parkinsona, Alzheimer, astma czy mukowiscydoza. Zatem podjęty temat nie jest „czysto akademicką” próbą poszerzenia istniejącej wiedzy, a uzyskane wyniki mogą w przyszłości przyczynić się do znalezienia nowych metod leczenia (czy choćby łagodzenia objawów) tych przypadłości.

Rozprawę tę można by zrecenzować za pomocą jednego stwierdzenia: to naprawdę świetna praca – dobrze przemyślana i wykonana. Pozostała część niniejszej recenzji to w zasadzie tylko wymagane ustawowo dodatki.





Rozprawa składa się z siedmiu numerowanych rozdziałów (*Wstęp, Cel pracy, Część doświadczalna, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura*), poprzedzonych spisem rycin i tabel, wykazem skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Ponadto do rozprawy dołączono – na cyfrowym nośniku danych – załączniki (cytowane w tekście rozprawy) ze szczegółowymi wynikami NGS, filmy wykonane przy użyciu holomikroskopu oraz publikacje wchodzące w skład dorobku naukowego Pani mgr Magdaleny Gebert. Jest ona pierwszą autorką w dwóch i drugą autorką w jednej publikacji w wysoko impaktowanych czasopismach naukowych. Wynika z tego jasno, że inni uczeni również wysoko ocenili wyniki badań prezentowane w recenzowanej rozprawie.

Przechodząc do szczegółów oceny, rozdział *Wstęp* jest odpowiednio obszerny i płynnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie. Cele stawiane sobie przez Autorkę przedstawione jasno i zwięźle. Ponieważ zostały one wspomniane przeze mnie już wcześniej, nie będę ich tu ponownie wymieniać. Rozdział *Część doświadczalna* jest na tyle szczegółowy, by umożliwić każdemu badaczowi powtórzenie opisanych eksperymentów. Prezentuje on też szeroki wachlarz nowoczesnych technik eksperymentalnych.

W rozdziale *Wyniki* Autorka rozprawy w sposób logiczny i jasny prowadzi czytelnika poprzez efekty swojej pracy laboratoryjnej i bogato ilustruje je rycinami.

Za najważniejsze z tych efektów uważam wykazanie, że:

- w komórkach nabłonka oddechowego stres ER prowadzi do globalnych zmian ilości niekodujących RNA: do wzrostu ekspresji piRNA oraz spadku miRNA;
- podczas UPR ilość hsa-miR-106b oraz hsa-miR-301a istotnie spada, a dzieje się to dzięki aktywności endorybonukleazowej białka IRE-1 (Inositol-requiring enzyme-1);
- oba wymienione miRNA zapobiegają śmierci komórek ekspozowanych na stres ER, regulując w sposób bezpośredni (hsa-miR-301a) lub pośredni (hsa-miR-106b) ekspresję czynnika proapoptotycznego GADD45A, który akumulowany jest podczas UPR.

Rozdział *Dyskusja* pozwala docenić wiedzę ekspercką Doktorantki, która umiejętnie przedstawia uzyskane wyniki w kontekście wiedzy zdobytej przez innych badaczy. Pracę podsumowuje syntetyczny rozdział zawierający wnioski wyciągnięte przez Autorkę, po którym



następuje rozdział *Literatura*, ze 194 pracami naukowymi z zakresu opisywanych w rozprawie zagadnień.

Zadaniem recenzenta jest jednak nie tylko utwierdzenie Doktorantki w przekonaniu, że praca jest świetna, lecz także wskazywanie uchybień i błędów. O ile nie mam wątpliwości, że przedstawione w rozprawie wyniki są bardzo wartościowe, to mam też kilka uwag krytycznych. Są to jednak głównie uwagi natury edytorskiej.

1) W trakcie pisania każdego obszernego dzieła dość trudno jest uniknąć literówek, podwójnych/brakujących spacji, niekonsekwentnej pisowni wyrazów złożonych (z myślnikiem/bez myślnika) i można je znaleźć także w recenzowanej rozprawie. Tak drobnych pomyłek nie ma jednak sensu wymieniać. Od strony edytorskiej dziwi nieco sposób cytowania literatury – za pomocą numeracji w indeksie górnym (co jest zwyczajną praktyką) lecz ze spacją poprzedzającą ową numerację, a czasem także i po niej, a przed kropką kończącą zdanie. Prowadzi to do sytuacji, w której w pustym wierszu znajduje się tylko liczba w indeksie górnym i kropka (np. na str. 11). Jednak dzieje się tak jedynie w wersji elektronicznej rozprawy, co może sugerować, że jest to niezamierzona zmiana powstała podczas konwersji pliku word na pdf. O ile nie jestem zwolennikiem spolszczania na siłę wszelkich sformułowań pochodzących z j. angielskiego, o tyle sformułowania „predykcja” czy „procesowanie”, którymi posługuje się Autorka rozprawy brzmią dość niezgrabnie.

2) Doktorantka kilkakrotnie (np. str. 34, 94) używa słowa „reprezentacyjny” (czyli wg Wielkiego Słownika Języka Polskiego „taki, który swoim wyglądem sprawia lub ma sprawiać bardzo dobre wrażenie”), zamiast reprezentatywny („mający cechy charakterystyczne dla jakiejś zbiorowości”).

3) Na str. 15 niedokładnie wyjaśniony został skrót RIDD, czyli Regulated Ire1-dependent Decay – zabrakło słowa „regulated”, natomiast na stronie 111 w dwóch kolejnych zdaniach insulina nazywana jest raz peptydem (poprawnie), a raz białkiem (błędnie).

4) Na str. 108 można przeczytać: „Przykładowo opisany w literaturze miR-17, degradowany przez IRE-1 podczas UPR, wpływa na poziom kaspazy 2, wzmagając tym samym apoptozę komórek.” Zdanie to zostało niepoprawnie skonstruowane, sugeruje bowiem, że

miR-17 wzmacnia apoptozę, gdy tymczasem hamuje on ten proces, hamując translację mRNA kaspazy 2 (PMID 23042294).

Mam też kilka poważniejszych uwag dotyczących głównie rozdziału *Wyniki* oraz prezentowanych tam rycin.

1) Tapsygargina (thapsigargin) w spisie skrótów widnieje jako TG (str. 6). Skrót taki obecny jest jednak na kilku zaledwie stronach (np. 31 i 78). Natomiast w przeważającej części pracy – także na rycinach – począwszy od *Wyników*, używany jest skrót THP (nie objaśniony w spisie skrótów). Ponieważ tapsygargina jest jednym z kluczowych i wzmiankowanych na wielu stronach rozprawy związkiem, błąd ten uważam za istotny.

2) Tytuł podrozdziału 4.3 brzmi: „Analiza danych NGS w celu wyodrębnienia czynników o kluczowym znaczeniu dla przebiegu UPR oraz weryfikacja ich roli dostępnymi w laboratorium metodami”. Wybierając metody badawcze należy kierować się tym, czy są właściwe do uzyskania odpowiedzi na stawiane pytanie, a nie tym, czy są „pod ręką” – co Autorka rozprawy niechcący zasugerowała.

3) Na stronach 51-52 brakuje jakiegokolwiek odniesienia w tekście do wyników przedstawionych na ryc. 24 dotyczących traktowania komórek czynnikiem ALLN. Proszę zatem Autorkę rozprawy o komentarz.

4) W treści *Wyników* brak odnośnika do Tabeli 3 (str. 60) w miejscu, gdzie została wstawiona, tekst wspomina o niej dopiero 2 strony dalej. Dlatego czytelnik musi się domyślać, że wzmiankowane „wyselekcjonowane 7 miRNA” to właśnie te z Tabeli 3. Część informacji z podpisu do tej tabeli przynależy raczej do rozdziału opisującego metody. Podobną uwagę mam do podpisów do niektórych rycin, które niepotrzebnie zawierają np. numery katalogowe odczynników.

5) Na str. 64 dwukrotnie w jednym zdaniu wymienione jest hsa-miR-301a, natomiast brakuje hsa-miR-301b. Może zresztą nie powinno go tam być, bo nie widnieje też na rycinie przedstawiającej wyniki odpowiedniego eksperymentu. Wówczas jednak brakuje wyjaśnienia, dlaczego zrezygnowano z oznaczenia ekspresji tego miRNA. Proszę Autorkę rozprawy o wyjaśnienie.



6) Na stronie 67 Autorka rozprawy pisze: „Detekcja dojrzałych miRNA w jądrze komórkowym prawdopodobnie wynikała z niecałkowitego rozdzielania siateczki endoplazmatycznej od jądra (błony ER i kariolemma są ciągłe).” Czy jednak wyniki – a dokładniej obecność we frakcji jądrowej mitochondrialnego genu kodującego cytochrom B – nie wskazują po prostu na „ogólne” zanieczyszczenie frakcją cytoplazmatyczną?

7) Zdanie ze str. 94 informuje: „Każdemu warunkowi eksperymentalnemu przypisano pięć punktów reprezentacyjnych, jednak podczas późniejszych analiz monitorowano zmiany tego samego obszaru w danym czasie aby uniknąć fałszywej interpretacji wyników”. Przyznaję, że nie jestem pewna, czy rozumiem zawartą w nim myśl. Zwłaszcza, że z rycin prezentujących wyniki eksperymentu (ryciny 51-54) trudno jest wywnioskować czy odpowiednie zdjęcia przedstawiają faktycznie ten sam obszar w różnym czasie. Może byłoby to łatwiejsze, gdyby wszystkie zdjęcia umieścić w dużym panelu na jednej stronie, zamiast na 4 kolejnych. Zwłaszcza, że zajmująca miejsce, a umieszczona obok każdego zdjęcia skala kolorystyczna jest całkowicie nieczytelna, wobec czego zbędna. Również podpis do tychże rycin: „Morfologia komórek linii 16HBE14o- ...” nie jest najszcześniejszy, jako że na zdjęciach morfologii komórek – „nieregularności” żywych czy „kulistości” martwych, o których pisze Autorka rozprawy – nie da się ocenić. Można jedynie próbować oszacować ilość komórek zabarwionych na czerwono, czyli komórek martwych wg opisu w tekście (informacji takiej zabrakło jednak w podpisach do rycin). Jednak przyznaję, że zmiany morfologii widoczne są lepiej na załączonych do rozprawy filmach.

8) Rycina 60 oraz odnoszący się do niej tekst rozprawy: jak można wyjaśnić obserwację, że o ile po potraktowaniu stresorem, wg słów samej Autorki „spektakularnie” zwiększa się ilość komórek określonych jako umierające, to nie rośnie ilość komórek martwych? Czy Autorka bierze pod uwagę, że komórki martwe odrywają się od podłoża i są wypłukiwane/rozpadają się podczas procedury eksperymentalnej? Jeśli tak, to nie wspomina o tym, zatem znów proszę o komentarz.

9) Na prezentowanych rycinach nagminnie pojawia się oznaczenie istotności statystycznej w postaci \*\* jednak nigdzie nie zostało wyjaśnione, jaką wartość p oznaczają.

Można się domyślać, że  $p < 0,005$ , ale czytelnik nie powinien być zmuszany do domysłów.

10) Wg opisu pewne eksperymenty prowadzone były przez 24 h. Jednak na niektórych rycinach (np. 24 czy 49) osie X wykresów „urywają się” na 18 h. Natomiast na ryc. 50 na osi X zaznaczono 24 h, jednak linie wykresu do tego punktu nie docierają.

11) Nieco razi pomieszanie polsko- i anglojęzycznych opisów na wykresach – opisy osi są zwykle po polsku, lecz opisy w legendach już niekoniecznie (np. „no stress”, „control”). Na niektórych wykresach opis osi Y jest po polsku, natomiast X już po angielsku (np. „no stress”, „control”). Rozumiem, że wykresy pochodzą z publikacji, ale w takim przypadku należało albo nie zmieniać języka opisu w ogóle, albo zrobić to wszędzie.

Nie mam zasadniczych uwag krytycznych do doboru metod, sposobu przeprowadzania eksperymentów czy interpretacji wyników. Dokonania badawcze Pani mgr Magdaleny Gebert oceniam wysoko, zarówno jako badania wnoszące istotny wkład do naszej wiedzy dotyczącej roli niekodujących RNA w regulacji odpowiedzi komórkowej na stres retikulum endoplazmatycznego, a także jako otwierające nowe pola badawcze i potencjalnie przyczyniające się do stworzenia nowych metod terapeutycznych. Wymienione w recenzji niedociągnięcia, dotyczące głównie strony edytorskiej, nie obniżają mojej wysokiej oceny całości rozprawy.

Stwierdzam zatem, że recenzowana Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630), stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Gebert do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,



Dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

**AGNIESZKA GIZAK**

Imię i nazwisko recenzenta

odr. hab., prof. UWr

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: **mgr farm. Magdalena Gebert**

Tytuł pracy doktorskiej: **Rola niekodujących RNA w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego**

### WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Rozprawa doktorska mgr farm. Magdaleny Gebert jest pracą o wysokim poziomie merytorycznym i potencjalnie praktycznym - uzyskane wyniki mogą przyczynić się do powstania nowych metod modulacji przebiegu odpowiedzi komórki na nieprawidłowo sterowane brania, która leży u podstaw wielu schorzeń. Wyniki rozprawy opublikowano w 3 wysoko i upatowanych czasopismach naukowych: Scientific Report (IF 4,996), Cellular and Molecular Life Sciences (IF 3,207) oraz FEBS Journal (IF 5,542).  
A wśród pierwszych pracach mgr farm. Magdaleny Gebert jest pierwszym autorem, w kolejnej - drugim. Jest to wielkie osiągnięcie, kandydujące na wyróżnienie.



podpis i pieczętka recenzenta