



**UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**  
**Zakład Patofizjologii Starzenia i Chorób Cywilizacyjnych**

Adres:  
ul. Długa 1/2  
61-848 POZNAŃ

prof. zw. dr hab. Krzysztof Książek  
tel.: 61 854 92 99  
fax: 61 854 90 86  
e-mail: [kksiazek@ump.edu.pl](mailto:kksiazek@ump.edu.pl)

Poznań, 18.07.2022

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Gebert, pt.: „Rola niekodujących RNA w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego”**

Jednym z najdynamiczniej rozwijających się wątków współczesnej biologii molekularnej są badania RNA, a wśród nich badania cząstek o właściwościach regulatorowych. Spektrum zjawisk biomedycznych, będących pod wpływem cząstek regulatorowego RNA jest bardzo szerokie i aktualnie trudno wyobrazić sobie obszar funkcjonowania organizmu człowieka, dla którego niekodujące cząsteczki RNA nie miałyby określonego znaczenia. Można by tę obserwację sprowadzić, do stwierdzenia rozwijającego klasyczny paradygmat biologii molekularnej, tj., że to co reguluje (w domyśle ekspresję genów) jest – wg współczesnej wiedzy - równie ważne jak to, co koduje. Popularność badań niekodujących cząstek RNA, będąca pochodną ich bezsprzecznego wpływu na ekspresję genów zaangażowanych w liczne zjawiska fizjologiczne oraz patogenezę chorób jest także czynnikiem, który w pewnym stopniu może nastrożać trudności w zdefiniowaniu nowego, oryginalnego obszaru naukowego, w którym badania tych cząstek będą umotywowane poznawczo lub aplikacyjnie. To zadanie powiodło się jednak Autorce rozprawy, która połączyła w swej pracy kilka interesujących, nadal dość niszowych wątków, jakimi są proteostaza, stres retikulum endoplazmatycznego i szlak odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR), spinając je klamrą w postaci niejasnego jak dotąd wpływu niekodujących RNA. Sformułowany w rozprawie cel obejmuje określenie znaczenia niekodujących RNA z grupy piRNA i miRNA dla przebiegu odpowiedzi na niepofałdowane białka, uruchomionej w warunkach stresu. Aby zrealizować ten cel Doktorantka podjęła się próby identyfikacji cząstek niekodującego RNA, których profil ekspresji uległ zmianie w warunkach stresu retikulum endoplazmatycznego, mających przełożenie czynnościowe na los komórki. Ponieważ Doktorantka wywodzi się z Zespołu prof. Rafała Bartoszewskiego, mającego ogromne doświadczenie w analizie molekularnej niekodującego RNA, do lektury powierzanej mi do oceny rozprawy doktorskiej przystąpiłem z nieskrywaną ciekawością.

Rozprawa doktorska Pani mgr Gebert skonstruowana jest w sposób klasyczny. Składają się na nią: Wstęp, Cel pracy, Część doświadczalna podzielona na Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Ponadto, rozprawa zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel, wykaz skrótów oraz spis piśmiennictwa.

W liczącym 16 stron Wstępie, Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienie stresu retikulum endoplazmatycznego oraz inicjowany w odpowiedzi na niego proces adaptacyjnej

odpowiedzi na niezwinęte białka (UPR). W tym kontekście bardzo starannie omówiony jest mechanizm obu zjawisk, w tym szlaki sygnałowe zaangażowane w kolejne fazy procesu UPR. W dalszej części, znajdujemy omówienie biosyntezy i znaczenia dla komórki małych RNA o właściwościach regulatorowych, szczególnie z grupy miRNA oraz piRNA. Autorka przybliży także kwestię znaczenia niekodujących RNA przebiegu reakcji na niezwinęte białka, wskazując na konkretne przykłady tych cząstek o zmienionej ekspresji, mogące determinować m.in. wystąpienie apoptotycznej śmierci komórki. Szczegółowa i dobrze poprowadzona oś narracyjna w tej części rozprawy jest wzbogacona w kilka czytelnych schematów.

Najbardziej rozbudowaną częścią rozprawy są Wyniki, liczące aż 68 stron. Należy jednak już na wstępie zaznaczyć, że w przypadku tej pracy ilość wyników idzie w parze z ich jakością i jest pochodną wspomnianego wyżej kompleksowego i pozbawionego luk podejścia do protokołu eksperymentalnego i dążeniem Doktorantki do pełnej odpowiedzi na postawione w rozprawie pytania. W toku swych badań, Pani mgr Gebert wykorzystywała farmakologiczne induktory UPR, których skutkiem działania jest zaburzenie czynności retikulum endoplazmatycznego. W oparciu o taki model, wykorzystując technologię sekwencjonowania genów nowej generacji określiła profile ekspresji mRNA w wytypowanych uprzednio punktach czasowych, odpowiadających etapom adaptacji, decyzji i śmierci komórki w przebiegu UPR. Jako czynnik potencjalnie decydujący o apoptozie komórek poddanych stresowi retikulum endoplazmatycznego w toku UPR wytypowano GADD45A. Dokonano także obserwacji, że ekspozycja komórek na stres wiąże się ze znaczącym wzrostem ilości regulatorowego RNA z grupy cząstek piRNA oraz obniżeniem ilości cząstek miRNA. Nagromadzenie się piRNA związane było ze stymulującym działaniem szlaku UPR na biogenezę tych cząstek zależną od białka PIWIL, a konsekwencją tego zjawiska było nasilenie częstości apoptozy. Odnośnie obniżenia puli miRNA zjawisko to powiązано z działaniem IRE-1, będącego sensorem aktywującym UPR oraz zależnego od jego aktywności endonukleazowego procesu RIDD. Kolejne badania oparte o sekwencjonowanie nowej generacji, w tym w obecności inhibitora IRE-1 pozwoliły na wyselekcjonowanie spośród cząstek miRNA o obniżonej ekspresji substratu dla tej cząstki, posiadające motyw konsensusowi. Ostatecznie badania zawężono do trzech zależnych od IRE-1 miRNA, tj. hsa-miR-106b, hsa-miR-301a i hsa-miR-17, a badania z użyciem inhibitora szlaku ATF6 pozwoliły na potwierdzenie jego udziału, obok IRE-1 w obniżeniu ilości hsa-miR-106b i hsa-miR-301a. Analizując biologiczne znaczenie degradacji wyselekcjonowanych miRNA zidentyfikowano ich docelowe transkrypty. Tą drogą powiązано hsa-miR-301a z GADD45A, który ulega kumulacji w warunkach stresu retikulum endoplazmatycznego czemu zapobiega wprowadzenie do komórek pre-miRNA dla hsa-miR-301a oraz hsa-miR-106b. Badania przeżywalności komórek z użyciem analizatora komórek w czasie rzeczywistym oraz holomikroskopii dowiodły, że badane miRNA wykazują działanie antyapoptotyczne, związane w warunkach stresu retikulum z obniżeniem ekspresji ich transkryptu docelowego, którym jest proapoptotyczny czynnik GADD45A.

Największym atutem zaprezentowanych w rozprawie badań jest kompleksowość i nowoczesność wykorzystanej metodologii. Doktorantka wywodzi swoje badania z eksperymentów na hodowlach komórkowych, opartych o interwencje molekularne zmieniające w obu kierunkach poziom ekspresji mRNA, egzogenne inhibitory, a nawet techniki interwencyjne z wykorzystaniem specyficznych *target protectorów*, pozwalających na zgłębienie interakcji między microRNA a transkryptem docelowym. Część analityczna oparta jest o reakcje ilościowego PCR, sekwencjonowanie nowej generacji, uwieńczone analizą baz danych i własną analizą bioinformatyczną. Można pokusić się o stwierdzenie, że przedstawiony przez Doktorantkę workflow identyfikacji i analizy cząstek regulatorowego RNA jest kompletny.

Na bardzo duże docenienie zasługuje warsztat metodologiczny, którym posługiwała się Doktorantka. Jednym z przykładów wartych przytoczenia jest bardzo wysoka efektywność wyciszania ekspresji genów za pomocą siRNA, którą uzyskiwano na poziomie 80-90% przy jednoczesnym nienaruszeniu żywotności komórek nietraktowanych stresorami. To wartość imponująca, gwarantująca rzetelność i wysoką wiarygodność prowadzonych badań. Innym aspektem uwiarygadniającym uzyskiwane wyniki i wyciągane z nich wnioski jest potwierdzenie obserwacji na poszerzonym panelu zróżnicowanych linii komórkowych, wliczając w to komórki prawidłowe (śródbłonek naczyń, komórki Schwanna) oraz nowotworowe (HeLa). To walor godny podkreślenia gdyż znamionuje uniwersalność dokonanych odkryć, co odróżnia omawiane badania od wielu innych, w których fenomen biologiczny opracowywany jest w sposób redukcjonistyczny tylko na jednym modelu komórkowym.

Czytelność bardzo rozbudowanej części wynikowej rozprawy jest wsparta starannie przygotowaną szatą graficzną, na którą składa się 60 rycin oraz 3 tabele (2 kolejne uzupełniają metodologię badań).

W liczącej 7 stron Dyskusji, Doktorantka dokonuje oszczędnego w słowach – co oceniam bardzo pozytywnie – podsumowania przeprowadzonych badań, czemu towarzyszy komentarz dotyczący wykorzystanego modelu badawczego oraz technik eksperymentalnych, a także wyciągnięcie szeregu konkluzji wpisanych w szerszy kontekst wyników prac innych zespołów. Czytelnik jest w tej części rozprawy prowadzony po analizowanym problemie naukowym w sposób uporządkowany i logiczny, a zastosowana narracja dowodzi biegłego poruszania się Doktorantki w niełatwym obszarze badań RNA. Uzyskane w rozprawie wyniki Doktorantka konkluduje w formie 8. trafnych wniosków. Po tej części rozprawy następuje zebranie wykorzystanego piśmiennictwa w liczbie 124. pozycji. Literatura jest dobrana poprawnie a Doktorantce udało się zachować właściwy balans między pozycjami najnowszymi, a tymi, opublikowanymi nieco dawniej.

Po omówieniu struktury i treści rozprawy chciałbym stwierdzić, że powierzona mi do oceny praca doktorska jest najlepszą, jaką miałem do tej pory przyjemność recenzować. Jest to dzieło naukowe przygotowane na poziomie światowym, którego nie powstydziliby się żaden wiodący ośrodek. Szczerze gratuluję Promotorowi w tym przewodzie, Panu Profesorowi Rafałowi Bartoszewskiemu tak rozwiniętego warsztatu metodologicznego badań RNA i przekazania swojej wiedzy, umiejętności i pasji naukowej Doktorantce. Po tych słowach, mogę z czystym sumieniem wskazać kilka aspektów rozprawy, które w delikatny sposób odstają od bardzo wyśrubowanego poziomu, jaki reprezentuje cała praca. Nie są to jednak kwestie wpływające w jakikolwiek sposób na odbiór rozprawy pod względem formalnym, czy też umniejszające merytoryczną rangę przedstawionych odkryć. Są to bardziej wskazówki, które Doktorantka mogłaby wziąć pod rozwagę w przyszłości, czy to kontynuując rozpoczęte badania, czy też rozwijając dalej swoje kompetencje naukowe. Dla przejrzystości, przedstawię te uwagi i komentarze w porządku chronologicznym.

- We wprowadzeniu, na stronie 12, Doktorantka podaje pewną nieścisłość pisząc, że fizjologicznie w retikulum następuje biosynteza białek błonowych (w domyśle – tylko błonowych). De facto, część białek syntetyzowana w siateczce trafia do innych kompartmentów komórki, np. lizosomów, a ogromna ich część jest wydzielana poza komórkę. Oceniający zdaje sobie sprawę, że Doktorantka zapewne użyła w tym miejscu pewnego upraszczającego skrótu myślowego, jednak część merytoryczna rozprawy, przede wszystkim przez wzgląd na jej czytelników (głównie młodych adeptów nauki) winna być pozbawiona jakichkolwiek nieścisłości.

- We Wstępie Doktorantka dokonała ciekawego stwierdzenia, że mimo negatywnego kojarzenia się pojęcia stresu ze śmiercią komórki, właściwa reakcja na stres zapewnia utrzymanie fizjologicznej harmonii. W tym kontekście, a od razu należy zaznaczyć, że w pełni zgadzam się z przywołanym stwierdzeniem, rodzi się pytanie czy istnienie stresu siateczki śródplazmatycznej mogłoby być traktowane jako przykład zjawiska hormezy w naszym ustroju? Bardzo chciałbym poznać opinię Doktorantki na ten temat.
- Doktorantka podkreśla w swej rozprawie, że efektorowym mechanizmem śmierci komórki w warunkach długotrwałego stresu retikulum endoplazmatycznego jest apoptoza. Brakuje mi w tych rozważaniach choćby krótkiego odniesienia się do możliwej indukcji autofagii, która jako proces altruistycznego umierania w warunkach stresu i w obecności niepoprawnie sfałdowanych białek jest scenariuszem znanym i często opisywanym. Ponieważ takiego odniesienia nie znalazłem w rozprawie, byłbym wdzięczny gdyby Doktorantka mogła odnieść się do tej kwestii podczas publicznej obrony pracy.
- Rozprawa zyskałaby, gdyby Doktorantka podzieliła Wprowadzenie na nieco ostrzej odgraniczone sekcje tematyczne. Obecnie, poszczególne zagadnienia są bardzo często rozdzielone jedną linią wolną, co rzutuje na czytelność tej części rozprawy. Dla przykładu, po szczegółowym omówieniu kwestii stresu retikulum endoplazmatycznego i funkcjonowania mechanizmu UPR, tylko jedna linia, bez dodatkowego nagłówka dzieli nas od rozważań nad biologicznym znaczeniem niekodujących RNA. O pewnym nieładzie w tym zakresie świadczy też numeracja istniejących podrozdziałów. Przykładowo, podrozdział 1.2. o nazwie „Retikulum endoplazmatyczne i UPR” zawiera w sobie także szczegółowy opis biosyntezy i funkcjonowania cząstek niekodującego RNA, w tym cząstek miRNA, po czym następuje podrozdział 1.3 poświęcony znaczeniu niekodujących RNA podczas UPR. Opis cząstek niekodujących powinien znaleźć się właśnie w tym drugim podrozdziale, jako jego pierwsza sekcja. Piszący te słowa zdaje sobie jednocześnie sprawę, że ten komentarz bardziej pasowałby do uwag Komisji, oceniającej dopuszczenie rozprawy do recenzji. Z tego względu proszę, aby Doktorantka traktowała ten wywód jako wskazówkę do ewentualnego zastosowania podczas przygotowywania przez Nią innych dzieł naukowych.
- W sekcji poświęconej analizie statystycznej znajdujemy informację, że wartości średnie porównywano testem t-Studenta (Doktorantka nie podaje jednak czy był to test dla zmiennych powiązanych czy niepowiązanych, co związane jest z kolei z rozkładem prób – można tylko zakładać, że jest to rozkład nie-gaussowski). Abstrahując od tego, analiza t-Studenta nie posiada szczególnie wysokiej siły statystycznej. Chciałbym w tym kontekście dowiedzieć się, czy uzyskane różnice były też analizowane testami o większej sile (odpowiednio testem Wilcozona lub Mann-Whitneya), a jeśli tak, to jakie były wyniki tych analiz?
- Kolejny komentarz także dotyczy analizy statystycznej. Otóż w podrozdziale 1.5.15 Doktorantka podaje, że wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej (SEM). Natomiast w legendach do rycin podaje, że wyniki wyrażone są jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Czy to pomyłka czy faktycznie dwa odmienne sposoby wyrażenia wyników? A jeśli pomyłka, to faktycznie w jaki sposób wyrażono odchylenia między próbami?
- Mając na uwadze, że rozprawa doktorska jest monografią przygotowaną w języku polskim, anglojęzyczne nazwy na rycinach (np. „control siRNA”, „no stress”) nieco rażą, choć rzecz jasna nie wpływają na merytoryczną treść rycin.
- Na części rycin, Doktorantka pokazuje dwa poziomy istotności statystycznej oznaczone, odpowiednio, jedną lub dwoma gwiazdkami. W legendzie znajdujemy

jednak tylko wyjaśnienie znaczenia pojedynczej gwiazdki czyli wartość współczynnika  $P < 0,05$ . Dla klarowności przekazu brakuje wyjaśnienia wartości  $P$  oznaczonej dwoma gwiazdkami (dotyczy to np. ryciny 21 – wszystkie panele lub 22, panel C).

**Wniosek końcowy:** na podstawie wnikliwej lektury przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Gebert stwierdzam, że praca ta jest dziełem o bardzo wysokiej wartości naukowo-poznawczej, przygotowanym w oparciu o warsztat badawczy na światowym poziomie. Z całą pewnością, przedstawione mi do oceny dzieło spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13. Ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki, w związku z czym wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Magdaleny Gebert do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

  
Krzysztof Książek

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Krzysztof Książek

Imię i nazwisko recenzenta

prof. zw. dr hab.

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 Pani mgr Gebert jest dziełem na poziomie światowym. Odnosi się do ryboflawiny (witamin B2) i do zastosowanej metodologii. Jest ona nowoczesna i kompletna. Model badawczy jest pełen. Badania są odpowiednio ewaluowane. Wyniki uzyskane w rozprawie są ważne i oryginalne, mają potencjał aplikacyjny. Praca jest napisana w sposób bardzo przejrzysty. To najlepsza rozprawa doktorska jaką miałem okazję recenzować.

KIEROWNIK  
Zakładu Patofizjologii Starzenia i Chorób Cywilizacyjnych

prof. dr hab. Krzysztof Książek

podpis i pieczętka recenzenta