

Przedstawione w recenzji uwagi krytyczne nie wpływają na moją wysoce pozytywną i takąż ocenę pracy magister Aleksandry Poterała-Hejmo. Przedstawione do oceny opracowanie spełnia, moim zdaniem, wymagania ustawy o tytule i stopniach naukowych, stawiane rozprawom doktorskim i dlatego mam zaszczyt i przyjemność, wnioskować do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, o dopuszczenie pani magister Aleksandry Poterała-Hejmo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Doceniając różnorodność dobrze zaplanowanych i wykonanych badań naukowych oraz ich wysoce nowatorski charakter wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie Kandydatki.

Z wyrazami szacunku,

KIEROWNIK
Katedry Biologii Molekularnej i Genetyki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Aleksander L. Sieroń

Prof. dr hab. n. med.
Aleksander L. Sieron, Prof. zw. SUM
Śląski Uniwersytet Medyczny
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
Tel.: 32-2088394
e-mail: alsieron@sum.edu.pl

Katowice, Styczeń 27, 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
magister Aleksandry Poterała-Hejmo
na temat:

”Rola białka P53 w regulacji stanu oksydoredukcyjnego w komórkach nowotworowych”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu medycznego, jakim jest terapia i prewencja nowotworów. Mimo licznych badań z zakresu biologii molekularnej nowotworów nadal pozostają do rozwiązania liczne problemy, których rozpoznanie pomoże skuteczniej je leczyć. Badania, podjęte przez doktorantkę, pod kierunkiem wybitnej badaczki biologii nowotworów pani prof. Joanny Rzeszowskiej, nad rolą białka P53 w mechanizmach regulacji produkcji reaktywnych form tlenu oraz odpowiedź na pytanie, jak reguluje ono aktywność antyoksydacyjną w komórkach nowotworowych jelita grubego, zasługują z pewnością na miano nowatorskich i jak najbardziej aktualnych.

Oceniana rozprawa doktorska jest wydrukiem komputerowym na 110 stronach. Składa się ona z typowych rozdziałów z wydzieleniem niezbędnych podrozdziałów. Spis treści jest ich kompletnym wykazem. Opracowanie rozpoczyna się streszczeniami napisanymi poprawnie po polsku i angielsku. Następnie kandydatka przedstawiła uzasadnienie celu podjętych badań, którym było znalezienie alternatywnego mechanizmu regulacji stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworu jelita grubego. Dotychczasowe doniesienia, w fachowym piśmiennictwie, o roli produktów genów *NRF2* i *TFAM* nie są wystarczające dla wyjaśnienia udziału P53 w mechanizmach antyoksydacyjnych w tych komórkach.

Jako model badawczy mgr Aleksandra Poterała-Hejmo wybrała dwie linie komórek nowotworów jelita grubego, a mianowicie HCT116 i RKO oraz ich modyfikacje genetyczne pozbawiające je funkcjonalnego P53. Na podstawie opisanego we wstępie stanu wiedzy sformułowała ona hipotezę, która zakłada że w warunkach bezstresowych, obecność P53 jest ważna dla regulacji stężenia reaktywnych form tlenu i równowagi oksydacyjnej w tych

komórkach, poprzez jeden lub więcej nieznanych dotychczas mechanizmów, które zaburzają równowagę oksydoredukcyjną w komórkach z obniżoną ilością białka P53.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań rozpoznawczych Kandydatka sformułowała dodatkowe 4 hipotezy: (1) obniżenie ilości P53 w komórkach HCT116 i RKO wzmacnia uszkodzenia oksydacyjne, co prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego; (2) antyoksydacyjna rola P53 w komórkach HCT116 i RKO wiąże się z regulacją ekspresji genu kodującego białko FOXO1, która odbywa się pośrednio przez mechanizm zależny od mikro RNA; (3) P53 wpływa na produkcję anionorodnika nadtlenkowego w mitochondriach poprzez regulację metabolizmu komórek HCT116 i RKO, obniżając fosforylację oksydacyjną i (4) status P53 jest kluczowy dla funkcjonowania mitochondriów i łańcucha oddechowego.

Do weryfikacji sformułowanych hipotez mgr Aleksandra Poterała-Hejmo wyznaczyła 10 celów pomocniczych, które uzasadniają i porządkują kolejność realizowanych badań.

Szczegółowe wprowadzenie zajmuje 21 stron i zwięźle wprowadza czytelnika w obecny stan wiedzy i badań w zakresie: (1) czynników oksydoredukcyjnych i powiązanych z nimi mechanizmów komórkowych; (2) endogennej produkcji reaktywnych form tlenu oraz (3) stresu oksydacyjnego i jego wpływu na makrocząsteczki. Kandydatka przedstawiła także znaczenie reaktywnych form tlenu w sygnalizacji komórkowej i stan wiedzy o systemach antyoksydacyjnych, które szczegółowo zostały omówione w podrozdziale 3.2.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka zapoznaje czytelnika z aktualnym stanem wiedzy o białku P53 i jego funkcjonowaniu zależnie od panujących w komórce warunków oksydoredukcyjnych, a także jego roli w regulacjach komórkowych zależnie od tych warunków. Kandydatka posiłkowała się również czytelnymi schematami i wzorami reakcji chemicznych, rodzajów uszkodzeń oksydacyjnych, a także zebrała w formie tabel dotychczas poznane: mechanizmy produkcji reaktywnych form tlenu, ich lokalizację komórkową, oraz wykaz uszkodzeń oksydacyjnych aminokwasów, które są wykorzystywane jako wskaźniki stresu oksydacyjnego. Podsumowując, Wstęp jest czytelny i wskazuje na rzetelną wiedzę magister Aleksandry Poterała-Hejmo w przedmiotowej problematyce.

Materiały i metody zostały przedstawione w sposób przystępny z wystarczającą szczegółowością opisu metod mało rozpowszechnionych i bez zbędnych szczegółów w opisach metod rozpowszechnionych. Jedynie metodę ilościowego oznaczania białek po western blot należało przedstawić szczegółowo, gdyż jest ona mało dokładna i jako taka dostarcza mało wiarygodnych wyników ilościowych. Generalnie, metody są dobrze dobrane

do realizacji wyznaczonych zadań badawczych. W tym miejscu zwracam uwagę na często powtarzające się użycie słowa *poziom*, którego wykorzystanie jest moim zdaniem nieodpowiednie przy badaniach i opisach ilościowych i powinno być zastąpione słowem *stężenie* lub *ilość*. Podobnie słowo *analiza* w rozdziale odnoszącym się do opisu metodyki lepiej zastąpić słowami, *badanie* lub *wykrywanie*, a już na pewno w odniesieniu do *potencjału błony mitochondrialnej* nie powinno się pisać *analiza* lecz *pomiar* lub *wykrywanie*. Słowa *analiza* i *ocena* odnoszą się do opracowania wyników badań.

W części powiązań czynników odpowiedzi na zmianę warunków oksydacyjnych, Kandydatka badała natężenie ekspresji 14 genów kodujących białka, a także wyizolowała małowcząsteczkowe RNA celem wykrywania obecności mikro RNA. Wykonała także badania ilościowe DNA mitochondrialnego oraz wykrywała dwie formy białka P53. Z tabeli do której odsyła autorka nie wynika jednak, na czym polegała różnica tych dwóch form. Dopiero w opisie ryciny 11 znajduje się wyjaśnienie tego, co autorka rozumie przez formy P53. Jednakże nadal nie wiadomo, którą formę P53 identyfikowano przeciwciałami sc-136023. Kandydatka wykrywała również obecność białka FOXO1. Badania te wykonała metodą western blot po elektroforezie białek w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu sodowego dodecyłu (SDS). W tym miejscu należało przedstawić opis metody pomiaru ilości wykrytych białek i krzywych wzorcowych dla nich, gdyż odwołanie się jedynie do nazwy wykorzystanego oprogramowania G:Box Chemi-XT4 GeneSys firmy Syngene, bez uzasadnienia tego wyboru jest zdaniem recenzenta nie wystarczające do oceny dokładności metody pomiaru ilościowego białek wykrytych przez WB.

Proszę również odpowiedzieć na pytanie, dlaczego w opisie metod nie umieszczono opisu badań mapowania ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy, których wyniki są przedstawione na stronach 50 do 55 oraz analizy mapowania obecności mikro RNA przy pomocy macierzy miRNA, których wyniki badania opisano na stronach 58 do 63.

Na zakończenie opisu metodyki Kandydatka uzasadniła wybór metod i testów statystycznych wskazując na konieczność ewentualnych dodatkowych powtórzeń niektórych doświadczeń, gdyż założona wcześniej liczba powtórzeń $n=3$ czasem okazywała się nie wystarczająca do oceny statystycznej.

Omówienie wyników rozpoczyna się dosyć nietypowo, bo od przedstawienia wyników wykrywania białka P53, którego metodę przedstawiono pod koniec rozdziału Metody. Opis tych wyników na wstępie rozdziału jest jednak logiczny, gdyż badania dotyczą roli P53 w odpowiedzi na stres oksydacyjny, dlatego należało najpierw zweryfikować, czy

rzeczywiście wybrane typy komórek różnią się obecnością tego białka, tak jak to założono, co potwierdziły wyniki badania metodą western blot.

Następnie zbadano związek między obecnością P53 i przebiegiem cyklu komórkowego i nie wykazano w nim zmian dla komórek HCT116 z i bez obecności P53, natomiast dla komórek RKO bez P53 wykryto przyspieszenie wejścia komórek do fazy S i wzrost ich liczby w fazach G2/M. Jednakże autorka nie znalazła znamienności statystycznej tych różnic w porównaniu do komórek zawierających P53.

Badania zależności ilości reaktywnych form tlenu korelowały dodatnio z brakiem obecności P53 w obu typach komórek, a te różnice ilościowe były znamienne statystycznie. Odwrotną zależność od obecności P53 wykryto dla ilości anionorodnika nadadtlenkowego, która była znamienna statystycznie dla obydwu typów komórek. Natomiast dla tlenu azotu nie wykazano znamiennych statystycznie różnic ilościowych zależnych od obecności P53. Kandydatka interpretuje te wyniki na korzyść mechanizmów nie powiązanych ze wzrostem ilości RFT takich jak anionorodnik nadadtlenkowy, tlenek azotu i na przykład nadtlenek wodoru. Ilościowy wzrost RFT w komórkach bez P53 autorka powiązała ze wzrostem ilości 8-deoksyguanozyny będącym wynikiem zwiększenia utleniania guaniny przez RFT.

Wyniki mapowania ekspresji genów ujawniły obecność 3348 transkryptów różniących badane typy komórek, bez rozróżnienia na brak lub obecność w nich P53, z których 3241 było swoistych dla komórek HCT116, 351 dla RKO, a 107 wspólnych w obydwu typach komórek. Analiza ze względu na brak lub obecność P53 w komórkach wykazała wzrost ekspresji 1602 genów i spadek ekspresji 1754 genów w komórkach HCT116 bez P53 oraz wzrost ekspresji 155 genów i spadek ekspresji 303 genów w komórkach RKO bez P53. Dalsza analiza wyników mapowania ekspresji ujawniła korelację ekspresji P53 z ekspresją *FOXO1*, *CAV1*, *CDH1* i *CD44*. Porównania różnic w ekspresji genów pozwoliły również na identyfikację 18 ontologii genowych w odniesieniu do komórek bez P53, w tym deregulację ścieżki sygnałowej z udziałem FOXO, ze słabszą ekspresją *FOXO1*, co następnie autorka zweryfikowała na poziomie mRNA i białka w odniesieniu do komórek RKO bez P53. Podobna tendencja wystąpiła dla komórek HCT116 bez P53 ale wykryty spadek nie różnił się znamienne. Mniejsza ilość FOXO1 mogła być przyczyną słabszej ekspresji wybranych przez Kandydatkę genów regulowanych przez ten czynnik, spośród których 3 cechował spadek znamienny statystycznie.

Badania macierzy miRNA ujawniły niższe stężenie 42, a wyższe 58 miRów w komórkach HCT116 bez P53 w porównaniu do komórek z P53. Badanie to miało na celu

zidentyfikowanie innego mechanizmu regulacji ekspresji *FOXO1* niż przez P53, dla którego nie wykazano miejsc wiązania w genie *FOXO1*, na przykład przez miRNA. Z badań tych magister Aleksandra Poterała-Hejmo wybrała 3, których stężenie było statystycznie wyższe w komórkach bez P53 i jako syntetyczne RNA wprowadziła do obydwu typów komórek z obecnym P53. Badanie tych komórek na obecność FOXO1 ujawniło, obniżenie jego ilości, z czego Autorka wysnuła wniosek o istnieniu ścieżki P53-mir-135b-3p/mir 222-3p-FOXO1 i jej znaczeniu dla regulacji ilości reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych otrzymanych z jelita grubego.

Brak P53 miał również związek ze statystycznie znaczącym zmniejszeniem aktywności dysmutaz ponadtlenukowych 1 i 2; spadkiem ilości anionorodnika, z jednoczesnym spadkiem ekspresji i aktywności enzymów odpowiedzialnych za jego neutralizację.

Badania metodami mikroskopii elektronowej mitochondriów w badanych typach komórek ujawniły występowanie 3 ich rodzajów, z tym że w komórkach bez P53 zawsze było mniej mitochondriów prawidłowych i więcej mitochondriów pośrednich, tak jak i stosunek powierzchni kropli lipidowych do powierzchni komórki był statystycznie wyższy w komórkach bez P53.

W zakresie pomiaru aktywności oddechowej pani magister Aleksandra Poterała-Hejmo wykazała, że komórki bez P53 cechowało obniżenie tej aktywności, zarówno w zakresie zdolności podstawowej, jak i rezerwowej, wyrażonej jako różnica między maksymalnym zużyciem tlenu i respiracją podstawową. Kandydatka wykazała, że komórki bez P53 produkowały mniej ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej i cechował je zmniejszony transport protonów do macierzy mitochondrialnej, niezależny od syntazy ATP. Ocena ilościowa mitochondrialnego DNA i zawartości kardiolipiny, również wykazała statystycznie znaczący spadek ilości obu związków w komórkach bez P53. Pomiar potencjału błonowego mitochondriów wykazały jego statystycznie obniżenie w komórkach bez P53. Na przedstawieniu tego wyniku mgr Aleksandra Poterała-Hejmo zakończyła rozdział zatytułowany Wyniki, zajmujący 33 strony.

Dyskusja została napisana w sposób wyważony, ze szczegółowym, w niektórych miejscach nawet nadmiernie rozbudowanym, przedstawieniem aktualnego stanu wiedzy powiązanej z zagadnieniem poruszonym w rozprawie doktorskiej. Główny bohater tych badań, białko P53 jest przedmiotem ogromnej liczby doniesień naukowych, rzędu -nastu tysięcy, a potencjalne jego interakcje wynikające z tych badań, według bazy BIOGRID3.5, sięgają na dzień przygotowania tej opinii 3567 powiązań.

Pani mgr Aleksandra Poterała-Hejmo, na tle wiedzy o P53 i stresie oksydoredukcyjnym, bardzo krytycznie przedstawiła wyniki swoich badań, wskazując ostrożnie na potencjalne implikacje kliniczne uzyskanej wiedzy, co świadczy o dobrej znajomości ograniczeń zastosowanych przez nią metod badawczych.

W rozdziale wnioski Pani magister zaproponowała uproszczony schemat oddziaływań z udziałem P53, regulujących ilość reaktywnych form tlenu i anionorodnika ponadtlenkowego w zastosowanym modelu badawczym. W opisie schematu przydałoby się jednak wyjaśnienie, czy groty strzałek wskazują na wzrost ilości/aktywności, a kreski na ich hamowanie, czy odwrotnie. W opisie dedykowanym temu schematowi pojawia się bowiem niezgodność. Przy braku P53 następuje bowiem spadek ekspresji *FOXO1*, co wpływa na słabszą ekspresję, lub wręcz zahamowanie ekspresji genów kodujących białka związane odpowiedzią na stres, podczas gdy odpowiedni wskaźnik na schemacie jest zakończony strzałką. Użyte w schemacie symbole odbiegają więc od kanonu przyjętego w tego rodzaju opracowaniach i bez odpowiednich objaśnień, trudno poprawnie zinterpretować ten schemat.

O ile ograniczenia zrealizowanych badań zostały wypunktowane, to wnioski wpływające z analizy wyników nie odnoszą się wprost do sformułowanych na wstępie hipotez; głównej i 3 pomocniczych. Utrudnia to określenie, czy wszystkie hipotezy zostały zaadresowane i zweryfikowane; pozytywnie lub negatywnie. Autorka wyznaczyła na wstępie 10 celów pomocniczych, do których również nie odniosła bezpośrednio swoich wniosków. W obydwu przypadkach wnioski są przedstawione w postaci zwięzłego opisu co nie ułatwia ich oceny.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 322 pozycje, z których większość pochodzi z ostatnich 10 lat, a 15% wręcz z ostatnich 5 lat. Wskazuje to na bieżące śledzenie i znajomość prac z przedmiotu rozprawy doktorskiej ale także prac pionierskich opublikowanych w ubiegłym wieku. Dysertacja jest zakończona wykazem znaczenia skrótów używanych w rozprawie.

Podsumowując dysertację magister Aleksandry Poterała-Hejmo, pod względem edytorskim, została ona przygotowana starannie i przejrzyście, a Autorka popełniła jedynie nieliczne pomyłki redakcyjne. Mankamentem językowym jest używanie słów i określeń żargonu laboratoryjnego, które zostały już wcześniej wskazane. Ogólnie uważam, że praca jest napisana poprawną polszczyzną.