

Gliwice, 1.09.2020

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Iwony Nowak

**Tytuł rozprawy:** Mechanizmy supresyjnej aktywności białka MCPIP1 w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego

**Autor rozprawy:** Iwona Nowak

**Promotor rozprawy:** prof. dr hab. Hanna Rokita

Praca doktorska mgr Iwony Nowak wpisuje się w ciąg badań nad białkiem MCPIP1, które są prowadzone od kilku lat w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Dotychczas badania te skupiały się nad określeniem roli MCPIP1 w komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma, NB); w rozprawie doktorskiej pojawił się nowy wątek - pilotażowe badania dotyczące innego nowotworu pochodzenia neuroektodermalnego, jakim jest czerniak.

Białko MCPIP1 (*monocyte chemoattractant protein-1 induced protein 1*) wykazuje aktywność RNazy oraz bierze udział w deubikwitynacji niektórych białek (m.in. białek szlaku NFκB). MCPIP1 początkowo wiązane było głównie ze schorzeniami autoimmunologicznymi (wykazano, że bierze udział w wyciszaniu odpowiedzi immunologicznej), obecnie coraz częściej znajdowane są dowody na jego związek z nowotworami.

Praca doktorska została przygotowana w formie tradycyjnej rozprawy. Jak zauważyłam przeglądając bazę PubMed, część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w postaci trzech prac oryginalnych, w których Doktorantka jest pierwszym (dwukrotnie) lub drugim autorem. Jedna praca pierwszoautorska pochodzi z 2018 roku, dwie pozostałe prace ukazały się w bieżącym roku (2020). Wszystkie trzy artykuły dotyczą badań nad nerwiakiem; wyniki dotyczące czerniaka nie zostały jeszcze opublikowane.

1. *MCPIP1 ribonuclease can bind and cleave AURKA mRNA in MYCN-amplified neuroblastoma cells.* Nowak I, Boratyn E, Student S, Bernhart SF, Fallmann J, Durbas M, Stadler PF, Rokita H. *RNA Biol.* 2020 Aug 20;1-13. doi: 10.1080/15476286.2020.1804698.
2. *MCPIP1 overexpression in human neuroblastoma cell lines causes cell-cycle arrest by G1/S checkpoint block.* Boratyn E, Nowak I, Karnas E, Ryszawy D, Wnuk D, Polus A, Durbas M, Horwacik I, Rokita H. *J Cell Biochem.* 2020 Jun;121(5-6):3406-3425. doi: 10.1002/jcb.29614. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31919874
3. *Exogenous expression of miRNA-3613-3p causes APAF1 downregulation and affects several proteins involved in apoptosis in BE(2)-C human neuroblastoma cells.* Nowak I, Boratyn E, Durbas M, Horwacik I, Rokita H. *Int J Oncol.* 2018 Oct;53(4):1787-1799. doi: 10.3892/ijo.2018.4509. Epub 2018 Jul 31.

ll



Wcześniejsze obserwacje zespołu w którym pracuje Autorka wskazywały, że w ludzkich liniach komórkowych neuroblastoma występuje obniżenie ekspresji genu kodującego białko MCPIP1, a w guzach pierwotnych od pacjentów z NB w ogóle nie wykrywa się jego ekspresji na poziomie mRNA. Wymuszenie nadekspresji białka MCPIP1 powodowało spadek proliferacji komórek NB i zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1/S oraz zmianę profilu ekspresji niektórych onkogenów, genów supresorowych i miRNA.

Doktorantka podjęła następujące zadania badawcze:

- i) próbę wyjaśnienia roli miRNA-3613-3p, który jest negatywnie regulowany przez MCPIP1 w komórkach NB oraz poszukiwanie innych miRNA regulowanych przez MCPIP1
- ii) identyfikację substratów MCPIP1 w komórkach NB
- iii) próbę wstępnego scharakteryzowania aktywności MCPIP1 w komórkach czerniaka

**Ad i)** We wcześniejszych badaniach Zespołu wykorzystano macierze miRNA firmy Exiqon do oceny zmian w profilu miRNA pod wpływem nadekspresji MCPIP1 (forma dzika i mutant delecyjny). W eksperymencie tym zaobserwowano silnie i znamienne obniżoną ekspresję miRNA-3613-3p w komórkach BE(2)-C z nadekspresją dzikiej formy MCPIP1.

W obecnej pracy Doktorantka posłużyła się techniką sekwencjonowania nowej generacji (NGS; wykonane jako usługa zlecona) do oceny zmian w profilu miRNA pod wpływem MCPIP1 (forma dzika i forma z mutacją punktową) w komórkach neuroblastoma KELLY. Wyniki wskazują, że przejściowa nadekspresja MCPIP nie wpływa znamienne na profil ekspresji miRNA w komórkach KELLY. Pewne różnice obserwowano między komórkami ekspresyjnymi dziki i zmutowany wariant MCPIP1, jednak wyniki walidacji za pomocą RT-qPCR, wykonanej w komórkach KELLY i BE(2)-C były mało konkluzywne i Doktorantka nie dyskutuje ich szerzej, a jedynie zwraca uwagę, że działanie MCPIP1 jest zależne od kontekstu.

W związku z tym, badania skupiły się na ocenie roli miRNA-3613-3p w komórkach NB. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę bioinformatyczną (zapewne we współpracy z dr hab. Sebastianem Studentem, specjalistą z Politechniki Śląskiej w Gliwicach i współautorem jednej z prac) w celu identyfikacji genów docelowych dla miRNA-3613-3p i szlaków sygnałowych, które mogą być regulowane przez te geny. Do analizy szlaków sygnałowych wykorzystano bazy danych KEGG, Gene Ontology i PANTHER; wyniki były spójne, wskazując m.in. na zaangażowanie szlaków sygnałowych Wnt, TGF $\beta$  i AKT. Jako geny, które z najwyższym prawdopodobieństwem są regulowane przez miRNA-3613-3p wskazano APAF1, DFFB, DICER, NF1, RORA, KIF3A i VHL.

W następnej kolejności Doktorantka zbadła, jak nadekspresja syntetycznego analogu miRNA-3613-3p (w pracy nazywanego „mimikiem”) wpływa na ekspresję siedmiu genów wskazanych w analizie bioinformatycznej. W pierwszej kolejności Doktorantka przeanalizowała poziom endogennej ekspresji miRNA-3613-3p w różnych liniach komórkowych NB, dzikich i z nadekspresją MCPIP1. Obserwacja, że w linii KELLY z nadekspresją dzikiej formy MCPIP1 poziom miRNA-3613-3p spada, a w linii z nadekspresją zmutowanej (pozbawionej aktywności rybonukleazowej) formy MCPIP1 pozostaje bez zmian, wskazuje, że miRNA-3613-3p jest degradowany przez MCPIP1.

Do dalszych badań wybrano linię BE(2)-C (posiadającą najniższy poziom miRNA-3613-3p). Po wywołaniu przejściowej nadekspresji miRNA-3613-3p, najsilniej obniżoną ekspresję wykazywał transkrypt genu kodującego proapoptotyczne białko APAF1, zarówno na poziomie RNA jak i białka (poziom ekspresji badanych genów był zależny od stężenia miRNA użytego do transfekcji, optymalne stężenie - 40nM).



Analiza bioinformatyczna wskazała, że w regionie 3'UTR APAF występują trzy miejsca wiązania miRNA-3613-3p, jednak test funkcjonalny z wykorzystaniem genu wskaźnikowego lucyferazy nie potwierdził bezpośrednich oddziaływań miRNA-3613-3p w tym obszarze. Zaobserwowano natomiast, że nadekspresja miRNA-3613-3p powoduje obniżenie aktywności kaspaz 7 i 9. Prawdopodobnie zatem nadekspresja miRNA-3613-3p, poprzez obniżenie poziomu APAF1 prowadzi do obniżenia poziomu aktywnej kaspazy 9. Jednak żywotność komórek BE(2)-C z nadekspresją miRNA-3613-3p (mierzona stężeniem komórkowego ATP), nie uległa obniżeniu. A zatem, pozostaje jeszcze wiele do wyjaśnienia jeżeli chodzi o mechanizm działania miRNA-3613-3p.

**Ad ii)** Uwzględniając wyniki wcześniejszych badań zespołu oraz na podstawie przeglądu literatury, jako potencjalne substraty MCPIP1 Doktorantka wyselekcjonowała geny zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, apoptozy i związane ze szlakiem AKT/mTOR.

Doktorantka wykazała eksperymentalnie, że nadekspresja MCPIP1 prowadzi do obniżenia ekspresji cyklin A2, B1, D1, D3, E1 i E2 oraz do zmniejszenia ilości fosforylowanych form CDK2 and CDK4 i RB.

Jednak metodą immunoprecypitacji RNA udało się potwierdzić bezpośrednie oddziaływania MCPIP1 z mRNA jedynie w przypadku genu *AURKA*. Dalszy eksperyment z użyciem testu lucyferazowego potwierdził, że destabilizacja transkryptu *AURKA* jest zależna od MCPIP1.

W badaniach zastosowano konstrukt (MCPIP1-D141N) kodujący białko MCPIP1 z mutacją punktową w rejonie centrum katalitycznego; substytucja asparaginy w miejsce kwasu asparaginowego w pozycji 141) znosi aktywność rybonukleolityczną, ale nie zdolność wiązania z docelowymi RNA.

W komórkach z nadekspresją dzikiej formy MCPIP1 obserwowano obniżony poziom transkryptu *AURKA*, zaś w komórkach ekspresyjnych mutantu MCPIP1-D141N, poziom mRNA był niezmienny. To wskazuje, że rybonukleolityczna aktywność MCPIP1 jest konieczna dla redukcji poziomu mRNA *AURKA*.

**Ad iii).** Aby oszacować ekspresję genów z rodziny MCPIP (MCPIP1-4) w czerniaku, Doktorantka przeanalizowała ogólnodostępne bazy danych z mikromacierzy ekspresyjnych. Na tej podstawie wysnuła wnioski, że ekspresja MCPIP1 jest obniżona w tkankach czerniaka w porównaniu do tkanek prawidłowych i niższa niż transkryptów MCPIP2-4, chociaż liczby przypadków są być może za małe, aby wyciągać definitywne wnioski. Na podstawie danych mikromacierzowych wywnioskowano, że niektóre czerniaki mają obniżoną ekspresję receptorów IL-1 $\beta$ . Po eksperymentalnej stymulacji IL-1 $\beta$  zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji mRNA MCPIP1 w komórkach przerzutowego czerniaka linii MV3 i HT-144, a wzrost ilości białka MCPIP1 tylko w MV3.

Linie MV3 wykorzystano do stworzenia modelu z nadekspresją MCPIP1 w formie dzikiej i zmutowanej. Wzrost poziomu MCPIP1 nie miał jednak wpływu na poziom apoptoz w tych komórkach ani na poziom ekspresji czy fosforylacji N-MYC. Obserwowano natomiast zależny od aktywności rybonukleazowej MCPIP1 spadek poziomu transkryptów oraz obniżenie ilości i poziomu fosforylacji niektórych białek związanych z regulacją cyklu komórkowego a także zahamowanie aktywności szlaku AKT/mTOR i zwiększoną aktywację niektórych białek regulujących apoptozę.

Sekwencjonowanie miRNA w komórkach MV3 z nadekspresją MCPIP1 wykazało znaczący, zależny od aktywności rybonukleazowej MCPIP1 spadek produkcji miRNA-193a-5p.



Zależność ta została dodatkowo potwierdzona przez znalezienie w strukturze tego miRNA sekwencji YRY, preferencyjnie rozpoznawanej przez MCPIP1.

W dyskusji, Doktorantka szeroko, choć nieco chaotycznie omawia otrzymane wyniki na tle danych literaturowych dotyczących innych nowotworów. Z całości wyłania się obraz, z którego wynika, że MCPIP1 jest białkiem plejotropowym, które pełni zróżnicowane funkcje w zależności od kontekstu. To oczywiście komplikuje badania nad jego rolą i mechanizmami działania.

Doktorantka omawia też miRNA, które wykazują obniżoną ekspresję w komórkach z wysokim poziomem MCPIP1. Wspomina także o badaniach klinicznych nad wykorzystaniem miRNA i ich blokerów w terapii nowotworów. Omawiając badanie z wykorzystaniem analogu miRNA034a nie wspomina jednak, że badanie to zostało przedwcześnie zamknięte ze względu na wystąpienie poważnych efektów ubocznych o podłożu immunologicznym. Z kolei badanie nad antagomirem miRNA-155 – MRG106 (Combomarsen) weszło już w II fazę.

### Ocena formalna pracy

W mojej subiektywnej ocenie rozprawę doktorską czyta się dość ciężko; zawiera ona pewne niezręczności językowe i błędy stylistyczne. Dużo bardziej przejrzyste opisane są wyniki zawarte w trzech opublikowanych pracach.

Podaję tylko jeden przykład tego typu niezręczności: *Na tej podstawie wybrano siedem z pierwotnie zaproponowanych przewidywanych genów docelowych miRNA-3613-3p, uwzględniając te, które były obecne we wszystkich bazach danych o wysokiej wartości prawdopodobieństwa, a także zaangażowane w rozwój neuroblastoma.*

Chyba lepiej tak: *Spośród genów, które zostały wskazane w analizie bioinformatycznej jako potencjalnie regulowane przez miRNA-3613-3p, do dalszych badań wybrano siedem, kierując się następującymi kryteriami: i) gen był wskazany jako znamieny statystycznie w analizie każdej z użytych baz danych, ii) dane literaturowe wskazywały na jego potencjalny związek z rozwojem neuroblastoma.*

Innym przykładem niedostatecznej staranności są tabele IX, X i XI, w których pojawiają się kategorie: „złośliwy czerniak”, „przerzut czerniaka”, „czerniak oczny” i „czerniak”. Analiza liczb przypadków w tabeli IX i XI wskazuje, że pozycja „czerniak” (ostatni wiersz) to prawdopodobnie wszystkie przypadki czerniaka łącznie, chociaż nie ma pewności, gdyż np. w tabeli X nie ma takiej pozycji.

Na marginesie – jest to druga praca doktorska z tej grupy badawczej, którą mam okazję recenzować i widzę teraz, że nie jest to przypadek, a prawidłowość, że konsekwentnie używane są sformułowania „sygnałowanie komórkowe” i „ścieżki sygnałowania”. Rozumiem lokalną tradycję, jednak wciąż pozostaję w przekonaniu, że prawidłowym określeniem w języku polskim jest „sygnalizacja komórkowa” i „ścieżki sygnałowe”. Drugie wyrażenie, które zdarza się w polskojęzycznej literaturze, ale jest ewidentną kalką językową z angielskiego i trochę razi, jest „mimik”. Chyba ten sam sens oddaje określenie „analog”.

Mam świadomość, że studia w zakresie biotechnologii nie przygotowują do zmagania literackich, a życie doktoranta jest pełne ciężkiej pracy, więc może się wydawać, że na takie niuanse nie ma czasu. Te uwagi formułuję, aby zwrócić uwagę Doktorantki, że warto pracować nad stylem, gdyż dobrze napisany manuskrypt czy projekt grantowy łatwiej znajdzie uznanie w oczach recenzentów.

## Podsumowanie

Abstrahując od tych drobnych uwag krytycznych, uważam, że przedstawiona mi do oceny praca jest oryginalna i nowatorska, obejmuje ogrom prac eksperymentalnych, przynosi często zaskakujące wyniki, które mogą stanowić wstęp do kolejnych, nowych projektów badawczych. Praca stanowi piękny przykład kompleksowych badań nad skomplikowaną, wielopoziomą regulacją procesów związanych z nowotworzeniem. Jest świetną ilustracją tego, jak trudne są takie badania. Rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Co zasługuje na podkreślenie, wyniki otrzymane przez Doktorantkę w dużej części zostały już opublikowane w liczących się czasopismach. Łącznie, Doktorantka jest współautorką sześciu artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej. Ponadto, jest Ona kierownikiem grantu NCN PRELUDIUM.

W moim odczuciu, tak duży dorobek stanowi gwarancję, że zdobyła Ona odpowiedni poziom wiedzy, umiejętności i dojrzałości naukowej. Dlatego, z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Iwony Nowak do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz życzę jej pomyślności w kolejnych etapach kariery naukowej.



*Dr hab. Katarzyna Lisowska*

*Prof. nadzw. w Narodowym Instytucie Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie PIB*