



dr hab. Anna Żaczek, prof. uczelni
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 11.01.2021

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Pauliny Marona pt. **„Rola białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji nowotworowej jasnokomórkowego raka nerki”** wykonanej w Zakładzie Biochemii Ogólnej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Miękus

Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania były współfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektu Preludium 13: „Rola białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji nowotworowej jasnokomórkowego raka nerki” – UMO-2017/25/N/NZ5/03014 przyznanego Doktorantce oraz projektów: Sonata 5: „Analiza molekularna progresji jasnokomórkowego raka nerki w aspekcie poszukiwania czynników predykcyjnych przed planowanym leczeniem” – UMO-2013/09/D/NZ5/00249 i Opus 10: „Rola białka MCPIP1 w procesach wzrostu, progresji i unaczynienia jasnokomórkowego raka nerki” – UMO-2015/19/B/NZ5/01405 przyznanych dr hab. Katarzynie Miękus. Rozprawa stanowi kontynuację prowadzonych z powodzeniem od kilku lat badań nad lepszym rozumieniem rozwoju i progresji nowotworów, a zwłaszcza roli białka MCPIP1 w tych procesach. Co warto podkreślić Autorka rozprawy doktorskiej jest laureatką prestiżowych stypendiów takich jak: stypendium START 2018 przyznane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej czy stypendium L’Oreal- UNESCO, Dla Kobiet i Nauki 2019.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy analizy roli białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji jasnokomórkowego raka nerki. Rak nerki znajduje się w pierwszej dziesiątce najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych, a rak jasnokomórkowy stanowi około 85% wszystkich nowotworów nerki. Rak nerki ze względu na bezobjawowy przebieg we wczesnych stadiach, niestety diagnozowany jest zbyt późno. Rokowania w przypadku zaawansowanego stadium choroby pozostają niepomyślne. Nadzieję na poprawę

wyników leczenia w tej grupie chorych daje zastosowanie terapii ukierunkowanej na cele molekularne oraz nowoczesnej immunoterapii. Niestety, nawet terapie ukierunkowane molekularnie wydłużają czas przeżycia chorych jedynie o kilka miesięcy. Co więcej, nowotwór bardzo szybko wykształca oporność na stosowane leki. Biorąc pod uwagę powyższe informacje stwierdzić należy, że zagadnienia realizowane w pracy doktorskiej mgr Pauliny Marona nakierowane na lepsze zrozumienie roli białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji jasnokomórkowego raka nerki są aktualne i istotne z punktu widzenia poznawczego. Poznanie funkcji białek biorących udział w procesach zachodzących w obrębie guza jest niezbędne do opracowania nowych terapii, badania posiadają więc też potencjalny wymiar aplikacyjny, zwłaszcza w kontekście nowych strategii terapeutycznych i przełamania oporności na inhibitory kinaz tyrozynowych.

Rozprawę stanowi przygotowane w języku polskim opracowanie liczące 125 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych. Posiada następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Skrótów. Bibliografia obejmuje 264 pozycje, przedstawione w kolejności cytowania. Zarówno kompozycja pracy, jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa, a spis treści dobrze przygotowany. Praca napisana jest przejrzysto i zwięźle, co uważam za jej duży atut. Z technicznego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest bardzo starannie; tekst jest napisany poprawną polszczyzną, błędów i literówek znalazłam stosunkowo niewiele. Praca posiada czytelną oprawę graficzną i dobrze opracowane ryciny. Na szczególną uwagę zasługują bardzo starannie przygotowane schematy sygnalizacji komórkowej. Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń, co dowodzi umiejętności Doktorantki do właściwego przedstawienia problemu naukowego i sposobu jego rozwiązania. Taka staranność dodatkowo utwierdza czytelnika w przekonaniu, iż same badania i analizy laboratoryjne przeprowadzone były w sposób zachowujący najwyższe standardy.

Liczący 27 stron **Wstęp** jest napisany ciekawie i dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Autorka przedstawia kolejno ogólną charakterystykę jasnokomórkowego raka nerki, rolę angiogenezy w procesie rozwoju nowotworu, a następnie rolę receptora c-Met w progresji badanego nowotworu i będące przedmiotem rozprawy białko MCPIP1 jako regulator procesów zapalnych i nowotworzenia. Całość jest zilustrowana starannie przygotowanymi, czytelnymi schematami. Uważam, że pomocne dla czytelnika byłoby umieszczenie pod nimi krótkiej legendy, ułatwiającej ich analizę. Rozdział ten świadczy o tym, że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematu i jest zorientowana w bieżącym piśmiennictwie naukowym. Jedyne czego mi zabrakło to odwołania się do najnowszych zaleceń ESMO dotyczących leczenia raka nerki, a mianowicie stosowania podwójnej immunoterapii (niwolumab + ipilimumab) w pierwszej linii postępowania terapeutycznego.

Cel pracy określony jest jednoznacznie i wystarczająco. Głównym zamierzeniem badawczym było wyjaśnienie roli białka MCPIP1 w progresji i rozwoju jasnokomórkowego raka nerki oraz jego wpływu na rozwój przez komórki nowotworowe oporności na inhibitory kinaz

tyrozynowych: sunitinib i sorafenib. Cel pracy został podzielony na 4 zadania badawcze dotyczące kolejno:

1. Zbadania związku między poziomem bądź aktywnością białka MCPIP1 a proliferacją komórek nowotworowych *in vitro* oraz *in vivo*;
2. Wyjaśnienia wpływu białka MCPIP1 na angiogenezę (zbadanie poziomu wydzielanych czynników proangiogennych, zachowania komórek śródbłonka i procesu angiogenezy *in vivo*);
3. Analizy materiału klinicznego od chorych na jasnokomórkowego raka nerki pod kątem zmian w poziomie białka MCPIP1 i jego korelacji z poziomem receptora c-Met;
4. Zbadania mechanizmu odpowiedzialnego za nabywanie oporności na stosowane w terapii jasnokomórkowego raka nerki leki: sunitinib i sorafenib oraz oceny roli białka MCPIP1 w tym procesie.

Rozdział **Materiały i Metody** został przygotowany starannie i szczegółowo, choć w moim odczuciu w pewnych miejscach zabrakło szczegółów technicznych. Badania zostały przeprowadzone na bardzo różnorodnym materiale, z wykorzystaniem ustalonych ludzkich linii komórkowych jasnokomórkowego raka nerki, materiału klinicznego od pacjentów oraz mysich modeli *in vivo*. W tym miejscu chciałam się zapytać, jakie były kryteria doboru linii komórkowych. Zabrakło mi również danych dotyczących kryteriów włączenia i wyłączenia chorych do/z badania. Na jakiej zasadzie ustalono liczebność grupy? Jaka była charakterystyka grupy badanej, z uwzględnieniem takich cech jak wiek, płeć, klasyfikacja TNM? Czy znany była status mutacji VHL? Czy badana grupa była reprezentatywna dla ogółu chorych na jasnokomórkowego raka nerki? Czy w pobranym materiale klinicznym wykorzystywanym do analizy western blot został określony odsetek komórek nowotworowych?

Analiza wybranych zagadnień wymagała zastosowania szerokiego zakresu technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej. Stosowane metody obejmowały metody hodowli komórkowej, przejściowej i stabilnej modyfikacji komórek, analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu (wykonanej metodami RT-qPCR oraz mikromacierzy) i białka (wykonanej metodami Western blot, ELISA, barwienia immunofluorescencyjnego i immunohistochemicznego, macierzy białkowych) oraz szereg testów funkcjonalnych takich jak: test proliferacji, migracji, tworzenia rozgałęzień w hodowli komórek śródbłonka czy test fibrynowy. Dodatkowo w modelach mysich badano wzrost guzów, rozwój przerzutów odległych czy liczbę krążących komórek nowotworowych przy pomocy cytometrii przepływowej.

Nawiązując do opisu tej części pracy, chciałam zapytać się na jakiej podstawie dokonano wyboru genu referencyjnego do analizy qPCR. Według wytycznych dotyczących opracowywania metody qPCR (np. *Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 55:611-22; <http://miqe.gene-quantification.info/>) zaleca się użycie minimum 2 genów referencyjnych do analizy poziomu transkryptów i starannej walidacji ich stabilności w analizowanym*

materiale. Poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tych wytycznych w świetle zastosowanego układu doświadczalnego. Czy jeden gen referencyjny był wystarczający? Jaka była stabilność wybranego genu referencyjnego – E2F? Czy porównywano go z innymi kandydatami? Jaka była wydajność amplifikacji dla poszczególnych par starterów i czy rzeczywiście umożliwiała użycie metody delta delta CT zakładającej praktycznie 100% wydajność reakcji?

Kolejną kwestią o którą chciałam się dopytać, jest sposób oceny barwienia immunohistochemicznego preparatów tkankowych (pkt 6.2.23). Czy określano % komórek CD31-pozytywnych? Czy uwzględniano intensywność barwienia? Co stanowiło kontrolę negatywną i pozytywną, przy optymalizacji samej procedury barwienia? Myślę, że warto by pokazać przykładowe barwienia w lepszej rozdzielczości niż zaprezentowane na rycinie 7.8.

Pewien niedosyt pozostawia opis części dotyczącej analizy statystycznej. Nie wszystkie stosowne w pracy testy zostały tu wymienione. Chciałam się zapytać, na jakiej podstawie stosowano testy parametryczne takie jak test t-Studenta. Czy rozkład analizowanych danych był rzeczywiście normalny?

Podsumowując tą część pracy, metodyka była różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań. Opis metod został w większości został przygotowany starannie, pozwala zrozumieć i powtórzyć wykonane eksperymenty. Szerokie spektrum stosowanych metod badawczych potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

Wyniki pracy Doktorantka przedstawia na 31 stronach w 3 punktach dotyczących kolejno: 1) roli białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji nowotworowej jasnokomórkowego raka nerki; 2) poziomu białka MCPIP1 w próbkach klinicznych oraz 3) wpływu białka MCPIP1 na oporność na terapie celowane w jasnokomórkowym raku nerki. Wydaje mi się, że bardziej przejrzyste byłoby zaprezentowanie zadań badawczych korespondujących z przedstawianymi potem wynikami lub wyników w sposób odpowiadający zaprezentowanym wcześniej zadaniom badawczym. Obecnie przedstawiono 4 zadania badawcze a 3 sekcje dotyczące wyników, niemniej to szczegół nie umniejszający wartości samych wyników.

Bardzo wysoko oceniam część wyników dotyczącą roli białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji nowotworowej, która przedstawia szereg nowych, bardzo interesujących danych. Wykazano, że niski poziom białka MCPIP1 (lub zahamowanie jego aktywności RNazy) prowadzi do zwiększenia potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych *in vitro* oraz przyspieszenia wzrostu guzów *in vivo*, jak również zwiększonej angiogenezy. Dodatkowo, obniżony poziom białka MCPIP1 wiązał się z aktywacją procesu EMT, większą liczbą CTC w krwiobiegu oraz większą liczbą przerzutów do płuc w modelu mysim.

Najślabszą według mnie częścią pracy jest część dotyczącą oceny wartości klinicznej MCPIP1. Przeanalizowano 60 tkanek nowotworowych od pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki.

Wykazano, że poziom MCPIP1 spada wraz z progresją jasnokomórkowego raka nerki wyrażoną skalą Furmana i negatywnie koreluje z poziomem całkowitego i fosforylowanego receptora c-Met. Szczególnie interesowałoby mnie, czy poziom białka MCPIP1 korelował z jakimkolwiek innymi cechami klinicznymi poza klasyfikacją histologiczną, gdzie ocenie poddawane są jądra komórkowe, np. klasyfikacją TNM? Czy możliwym byłoby wykonanie analiz korelacji poziomu MCPIP1 z przeżyciem chorych, jeśli nie na materiale klinicznym włączonym do pracy, to może chociaż na danych zawartych w bazie TCGA? W tym miejscu chciałabym się spytać Doktorantkę, czemu wybrano metodę western blot do oceny poziomu białka w materiale klinicznym zamiast klasycznie stosowanej w takich przypadkach immunohistochemii? Według mnie ograniczenia związane z tym podejściem należałoby przedyskutować w pracy. W tej części zabrakło mi również informacji, jaki test statystyczny stosowano w przypadku zależności liniowych pomiędzy poziomem białka MCPIP1 a cMet (Ryc. 7.22.B część B rycyny) i jakie były wartości p. Czemu nie wykonano analizy statystycznej danych w przypadku Ryc 7.22.D?

Szczególnie interesująca jest część trzecia pracy dotycząca badania wpływu białka MCPIP1 na oporność na terapie celowane stosowane w jasnokomórkowym raku nerki. Uzyskane wyniki dostarczają ważnych danych na temat mechanizmu nabywania oporności na sorafenib i sunitinib przez komórki ccRCC. Nowością, według mojej wiedzy, było wykazanie spadku poziomu MCPIP1 w komórkach opornych *in vitro*, jak i *in vivo*. Szczególnie obiecująca w kontekście przełamania oporności, wydaje mi się strategia łączenia wspomnianych inhibitorów z inhibitorem cMet, SU11274. Te badania na pewno warto kontynuować.

Na koniec w **Dyskusji** Autorka w sposób dojrzały i krytyczny dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Tę część pracy czyta się bardzo dobrze. Pokazuje ona dobrą znajomość i płynne poruszanie się przez Doktorantki w tematyce związanej z prowadzonymi badaniami. Na stronie 108 Dyskusji Autorka stwierdza: „Większa ilość przerzutów oraz łączenie się komórek w grupy sugeruje, że komórki odporne na sunitinib migrują kolektywnie w klastrach posiadających wysoki poziom e-kadheryny i fosforylację receptora c-Met, który zwiększa inwazyjność grupy.” W tym miejscu chciałabym się dopytać, czy w pracy wykazano obecność klastrów? Bardzo interesujące byłoby przeanalizowanie fenotypów krążących komórek nowotworowych. Czy takie analizy były podejmowane? Jeśli nie prosiłabym Doktorantkę o przedstawienie możliwego planu takich doświadczeń.

Polemizowałabym ze stwierdzeniem, że „Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej sugerują, że białko MCPIP1 może stanowić potencjalny czynnik prognostyczny jasnokomórkowego raka nerki”. Nie znalazłam w pracy wyników, które by potwierdzały znaczenie prognostyczne MCPIP1 u chorych na raka nerki. Poprosiłabym Doktorantkę o komentarz w tej sprawie.

Pracę kończą dobrze napisane **Wnioski końcowe** oraz podsumowanie graficzne pracy w postaci bardzo przejrzystego schematu. Krótka legenda pod schematem, opisująca co jest na obrazku sprawiłaby, że mógłby on stanowić samodzielne, niezależne bardzo trafne podsumowanie całości pracy.

Oceniając stronę redakcyjną pracy, mam kilka drobnych uwag. Praca ogólnie napisana jest bardzo starannie, pojawiają się nieliczne błędy interpunkcyjne. Chciałabym natomiast zwrócić uwagę na pewnego rodzaju niezręczność językową, może na miejscu przy popularyzacji wyników badań naukowych, jednak w doktoracie nie znajdującą uzasadnienia. Chodzi mi o sposób prowadzenia narracji w stylu „Komórki odporne na sorafenib także niechętnie się łączyły preferując indywidualną migrację”. Wydaje mi się, że na podstawie przeprowadzonych doświadczeń trudno wnioskować na temat chęci łączenia się czy preferencji migracyjnych komórek nowotworowych i warto by przedstawiać dane, stosując bardziej naukowe, typowe dla tego typu prac podejście.

Przystawione wyżej uchybienia nie obniżają wartości naukowej pracy. Cele pracy zostały z powodzeniem zrealizowane. Należy podkreślić, że tematyka badań podjęta w pracy doktorskiej jest jak najbardziej istotna i aktualna, a uzyskane wyniki w sposób znaczący poszerzyły wiedzę o roli białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji jasnokomórkowego raka nerki, wskazując na jego rolę supresorową. Przedstawione i przedyskutowane przez Doktorantkę wyniki uważam za bardzo interesujące. Są już podstawą bardzo dobrych publikacji. Zabrakło mi tylko wskazania w pracy doktorskiej, które z wyników znalazły się w którejś z opublikowanych prac Doktorantki. Wartość merytoryczną pracy i uzyskanych wyników oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując, stwierdzam, że uzyskane wyniki stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała postawiony problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazała się wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biologii komórki i biologii molekularnej oraz umiejętnością prezentacji i interpretacji wyników.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Dlatego też wnoszę do **Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego** o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Marona do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej pracy.

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-GUMed
ZAKŁAD ONKOLOGII TRANSLACYJNEJ


dr hab. Anna Żaczek