Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Pauliny Marony** pt. ***„Rola białka MCPIP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji nowotworowej jasnokomórkowego raka nerki"*** przygotowanej pod opieką dr hab. Katarzyny Miękus z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Przedmiotem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie roli MCPIP1, białka o potencjalnych funkcjach supresora nowotworów, mającego aktywność RNazy i regulującego m.in. odpowiedź zapalną, w rozwoju jasnokomórkowego raka nerki. Temat pracy jest w pełni oryginalny a jej wyniki mają istotne znaczenie dla poznania mechanizmów uczestniczących w procesie nowotworzenia i odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową. Mając na względzie spodziewany „wielowątkowy" wpływ białka MCPIP1 na procesy komórkowe, realizacja pracy była dla Doktorantki wyzwaniem wymagającym zastosowania wielu narzędzi badawczych i umiejętności interpretacji złożonych wyników doświadczeń. Dlatego wybór takiego tematu projektu doktorskiego należy ocenić wysoko, a (uprzedzając konkluzje recenzji) Doktorantka wywiązała się z postawionego sobie zadania w sposób bardzo dobry. Równoległym potwierdzeniem oryginalności i wysokiego poziomu naukowego projektu doktorskiego jest fakt jego realizacji w ramach szeregu grantów badawczych, w tym własnego grantu Preludium Doktorantki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typową strukturę. Praca liczy 125 numerowanych stron, zawiera 39 wielo-elementowych rycin i 5 tabeli, a jej bibliografia odnosi się do 264 poprawnie dobranych pozycji literaturowych.

Rozdział 1 pracy to rozwinięcie stosowanych skrótów, a rozdziały 2 i 3 to streszczenia w języku polskim i angielskim. Drobna uwaga do streszczenia: zastosowane tu terminy „gen von Hippel-Lindau" czy „gen c-Met" są niezgodne z obowiązującą konwencją (powinno być gen *VHL* i gen *MET*).

W rozdziale ***Wstęp*** (rozdział 4) Doktorantka w przejrzysty i uporządkowany sposób omawia zagadnienia mające związek z przedmiotem pracy (m.in. biologię jasnokomórkowego raka nerki oraz funkcje białek MCPIP1 i c-Met),. Treść wstępu stanowi racjonalne i logiczne uzasadnienie dla celów pracy sformułowanych w rozdziale 5. Tę część pracy czyta się z przyjemnością i nie mam do niej uwag krytycznych (choć być może nadmiernie rozbudowana jest część dotycząca kinazy c-Met).

Istotnym elementem pracy jest dobrze przygotowany rozdział ***Materiały i Metody*** (rozdział 6). Na podkreślenie zasługuje to, że wszystkie zastosowane metody doświadczalne były adekwatne do celu postawionego w projekcie i w pełni umożliwiały jego uzyskanie. Moja jedyna uwaga krytyczna dotyczy opisu metod stosowanych w analizie statystycznej wyników (rozdział 6.2.24). Stosowane testy (test t-Studenta i test ANOVA) to testy parametryczne mające zastosowanie w przypadku rozkładu normalnego analizowanych danych. Natomiast

Doktorantka nie wspomina nic o zweryfikowaniu tego założenia za pomocą odrębnego testu. Ponadto, testy te nie są optymalnym rozwiązaniem w przypadku tak nielicznych grup jak te analizowane w pracy (np. n=3). „Bezwarunkowy" wybór tych testów to niestety częsty błąd popełniany przez biologów.

Rozdział ***Wyniki*** (rozdział 7) składa się trzech głównych części, które dotyczyły różnych celów szczegółowych określonych w rozdziale 5.

Przedmiotem pierwszej części wyników (rozdział 7.1) jest analiza wpływu wyciszenia, nadekspresji i mutacji domeny RNazy białka MCPIP1 na fenotyp komórek jasnokomórkowego raka nerki (linie Caki-1 i Caki-2) oraz fenotyp komórek endotelialnych (HMEC-1 i HUVEC) eksponowanych na czynniki uwalniane przez komórki raka. Zaletą tej części pracy jest racjonalne wykorzystanie wielu komplementarnych technik analitycznych. Ponadto, wyniki uzyskiwane w układzie doświadczalnym *in vitro* są, tam gdzie jest to możliwe i uzasadnione, potwierdzone w doświadczeniach *in vivo*. W tej części pracy Doktorantka wykazała m.in. hamujący wpływ białka MCPIP1 (i jego aktywności RNazy) na żywotność i proliferację komórek raka *in vitro*, oraz wzrost i unaczynienie guza nowotworowego, a także zdolność do przerzutowania w modelu *in vivo*. Ponadto poziom (i aktywność) białka MCPIP1 miał wpływ na produkcję czynników proangiogennych (m.in. VEGF) przez komórki raka i „proangiogenny" fenotyp komórek endotelialnych eksponowanych na czynniki uwalniane przez komórki raka. Doktorantka wykazała również wpływ poziomu (i aktywności) białka MCPIP1 na poziom czynników c/EBPβ oraz SDF-1 i CXCR4, wskazując na możliwość regulacji przez MCPIP1 procesu angiogenezy za pośrednictwem „osi" c/EBPβ -> SDF-1/CXCR4. Ponadto, doktorantka wykazała hamujący wpływ białka MCPIP1 na ruchliwość komórek raka i nabywanie przez nie pewnych cech komórek mezenchymalnych (co wskazuje na udział MCPIP1 w regulacji EMT). Ta część wyników jest przekonująco udokumentowana, a konkluzje Doktorantki mają pełne uzasadnienie w prezentowanych danych doświadczalnych.

Uwagi krytyczne. Pewien niedosyt budzi część wyników (a raczej ich interpretacja) prezentowanych w sekcjach 7.1.7. i 7.1.8. Nie jestem entuzjastą stosowania standardowego testu *Western blot* jako metody ilościowej (moich wątpliwości co do ilościowego waloru tego testu nie zmniejszają próby „cyfryzacji" wyniku poprzez analizę densytometryczną blotów). W tym kontekście trudno zgodzić się, że wyniki przedstawione na rycinie 7.18.A i 7.20.A wskazują na wpływ białka MCPIP1 na poziom białka i fosforylację białka Src (o czym pisze Doktorantka, np. na str. 78). Podobnie, nie do końca przekonujące są konkluzje na temat wpływu białka MCPIP1 na fosforylację c-Met zilustrowane „reprezentatywnym wynikiem *Western blot*" przedstawionym na rycinie 7.19.A. O ile wiarygodny wydaje się wniosek o obniżeniu względnego poziomu ufosforylowanej formy c-Met pod wpływem nadekspresji „dzikiego" MCPIP1, o tyle trudno dostrzec wzrost względnego poziomu ufosforylowanej formy c-Met w komórkach z nadekspresją „zmutowanego" MCPIP1, do czego przekonuje wykres na rycinie 7.19.B (na „reprezentatywnym" blocie zwiększonemu poziomowi całkowitego c-Met towarzyszy brak zmian w poziomie formy ufosforylowanej).

Przedmiotem drugiej części wyników (rozdział 7.2) jest analiza poziomu białka MCPIP1 oraz korelacji poziomu MCPIP1 i c-Met w materiale tkankowym ludzkich guzów jasnokomórkowych nerki. Zaletą tej części pracy jest wykorzystanie relatywnie dużej liczby preparatów (materiał pochodzący od 60 pacjentów z różnym stadium rozwoju nowotworu), co pozwala na dość wiarygodną obserwację związków między poziomem badanych białek a stopniem rozwoju nowotworu. Doktorantka wykazała malejący poziom białka MCPIP1 oraz rosnący poziom białka c-Met (i jego formy ufosforylowanej) wraz ze wzrostem zaawansowania jasnokomórkowego raka nerki. Ponadto, Doktorantka wykazała istnienie negatywnej korelacji między poziomem białka MCPIP1 i poziomem białka c-Met (i jego formy ufosforylowanej). Dodatkowo, Doktorantka zaobserwowała korelację poziomu ekspresji szeregu innych białek (lub ich fosforylacji) związanych z procesem angiogenezy ze stopniem rozwoju nowotworu. Obserwacja ta jednak nie jest związana bezpośrednio z tematem pracy (Doktorantka nie wykazała udziału białka MCPIP1 w regulacji tych czynników) i została potraktowana jako wątek uboczny.

Uwagi krytyczne. W pracy nie jest opisana metodologia statystyczna, która została wykorzystana w analizie korelacji poziomów MCPIP1 i c-Met (wyniki przedstawione na rycinie 7.22.B). Ponadto, nie jest jasna konwencja wykorzystana do zilustrowania poziomu wybranych transkryptów na rycinie 7.21.D. Przykładowo, czy wykres należy czytać tak, że poziom transkryptów *FLT1* w I+II to 9 a w III+IV to 17?

Przedmiotem trzeciej części wyników (rozdział 7.3) jest analiza wpływu trzech substancji (sunitynib, sorafenib i SU11274) na fenotyp komórek Caki-1 i Caki-2 (domyślnie w kontekście funkcji białek MCPIP1 i c-Met). W tej części pracy Doktorantka testuje bardzo wiele wątków, co powoduje zbyt „pobieżne" zajęcie się częścią z nich. W mojej opinii najbardziej wartościowym i najlepiej udokumentowanym wynikiem jest wykazanie wpływu inhibitora kinazy c-Met na poziom białka MCPIP1 i funkcje od niego zależne takie jak wzrost guza i zdolność do przerzutowania. Ta część pracy bez wątpienia potwierdza związek między MCPIP1 a c-Met. Niestety, prezentowane dane nie rozstrzygają o charakterze związków przyczynowo-skutkowych między oboma białkami. Dane przedstawione na rycinie 7.26 wskazują, że hamowanie aktywności kinazy c-Met zwiększa poziom białka MCPIP1, a dane przedstawione na rycinie 7.19.A i 7.32.C wskazują na udział MCPIP1 w redukcji poziomu ufosforylowanej formy c-Met. Może to wskazywać na istnienie sprzężenia zwrotnego między oboma czynnikami. Być może gdyby Doktorantka zrezygnowała z analizy części „wątków pobocznych", nie mających bezpośredniego znaczenia dla głównego celu pracy, możliwa byłaby „pogłębiona" analiza związków między MCPIP1 a c-Met (choć to oczywiście uwaga „ahistoryczna", nie uwzględniająca naturalnego rozwoju projektu badawczego).

Uwagi krytyczne. Ta część pracy wzbudziła najwięcej moich zastrzeżeń i wątpliwości. Część z tych wątpliwości związana jest z niewielką w mojej opinii wartością standardowego testu Western blot jako metody ilościowej, co ogranicza wiarygodność oceny niewielkich zmian w poziomie analizowanych białek. W efekcie, obraz przedstawiony na „reprezentatywnych wynikach *western blot*" jest bardziej złożony niż wnioski przedstawione w tekście. Przykładowo, wyniki zawarte na rycinie 7.26.B nie do końca uzasadniają stwierdzenie (str. 84) o obniżonym poziomie białka MCPIP1 i podwyższonym poziomie białka c-Met

w komórkach traktowanych sunitynibem i sorafenibem (trudno się z tym zgodzić szczególnie w kontekście komórek Caki-2).

Inne uwagi do tej części pracy są następujące:

1) Mylące może być zastosowanie terminu „komórki oporne na sorafenib". Termin ten miałby uzasadnienie, gdyby do badań wykorzystywano wyodrębnioną frakcję komórek przeżywających ekspozycję na ten czynnik. Tymczasem przedstawione wyniki wskazują na brak toksyczności sorafenibu, co uniemożliwia ocenę frakcji przeżywającej/opornej.
2) Szkoda, że wyniki badań przedstawionych na rycinie 7.24.B i 7.25.C nie zostały opracowane w formie analizy ilościowej (wykorzystane tam testy mają walor ilościowy w o wiele większym stopniu niż *western blot*).
3) Wynik analizy ilościowej przedstawionej na rycinie 7.29 wskazuje na brak istotnego wpływu traktowania sunitynibem i sorafenibem na wzrost guza i przerzutowanie w stosunku do nietraktowanej kontroli. Nie daje to więc pełnego uzasadnienia do wniosków przedstawionych na stronie 87 (jeśli decydujemy się na wykorzystanie testu statystycznego, to „brak istotności statystycznej różnic" powinniśmy traktować jako „brak różnic"). Szkoda, że do analogicznego doświadczenia nie wykorzystano komórek z obniżonym/podwyższonym poziomem białka MCPIP1.
4) Wynik analizy ilościowej przedstawionej na rycinie 7.30 wskazuje na brak istotnego wpływu traktowania sunitynibem i sorafenibem na względny poziom fosforylacji c-Met i poziom białka MCPIP1 w komórkach guza *in vivo* w stosunku do nietraktowanej kontroli. Nie daje to więc pełnego uzasadnienia do wniosków przedstawionych na stronie 88 (uwaga jak w punkcie powyżej).
5) Pewne wątpliwości budzi oparcie wniosku na temat roli GSK3β w regulacji MCPIP1 jedynie na podstawie efektów obserwowanych (western blot) w komórkach traktowanych LiCl (lit, poza hamowaniem GSK3β, jest inhibitorem szeregu innych enzymów).

Być może w tej części pracy Doktorantka powinna skupić się na zbadaniu wpływu wyciszenia/nadekspresji białka MCPIP1 na fenotyp komórek raka traktowanych wybranymi inhibitorami. Byłoby to zgodne z głównym celem pracy i zapewne umożliwiłoby sformułowanie lepiej udokumentowanych wniosków (wniosek zawarty w ostatnim akapicie rozdziału 7.3.3. w mojej opinii nie znajduje w tym rozdziale pracy wystarczającego uzasadnienia).

W rozdziale ***Dyskusja*** (rozdział 8) Doktorantka podsumowuje wyniki uzyskane w doświadczalnej części pracy oraz kompetentnie dyskutuje je w kontekście dostępnych danych literaturowych. Najbardziej spekulatywnym i najsłabiej umocowanym w uzyskanych wynikach własnych jest w mojej opinii podrozdział 8.5 („Oporność na sunitynib i sorafenib jest regulowana przez białko MCPIP1"), co wynika z wcześniejszych uwag dotyczącymi tej części pracy.

Rozdział 9 zawiera 10 wniosków końcowych. Wnioski 1-6 i 8 nie budzą zastrzeżeń i są w mojej opinii przekonująco udokumentowane i uzasadnione wynikami prezentowanymi w pracy. Wniosek 7 (Stymulacja sunitynibem i sorafenibem powoduje wzrost fosforylacji c-Met i spadek białka MCPIP1) jest oparty o nie do końca jednoznaczne dane doświadczalne (patrz uwagi powyżej). Wniosek 9 (Komórki oporne na sunitynib i sorafenib tworzą więcej przerzutów niż komórki kontrolne) nie ma w mojej opinii uzasadnienia w prezentowanych wynikach (patrz uwagi do ryciny 7.29). Wniosek 10 (Spadek poziomu białka MCPIP1 po stymulacja sunitynibem lub sorafenibem może być spowodowany aktywacją GSK3β) jest w mojej opinii przedwczesny i wymaga dalszych badań mających na celu potwierdzenie roli kinazy GSK3β w regulacji MCPIP1.

Podsumowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia o dużej wartości poznawczej. Praca jest poprawna formalnie, dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana. Doktorantka wykazała się umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie oryginalnych wyników. Cała rozprawa jest napisana czytelnie poprawnym językiem (praktycznie brak uwag dotyczących strony edytorskiej pracy). Praca z cała pewnością „stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego". Niezależnie od zawartych w recenzji uwag krytycznych przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pani Pauliny Marony oceniam jednoznacznie pozytywnie. Mając na względzie wysoki poziom naukowy przedstawionej pracy proponuję jej wyróżnienia jeśli tylko spełnione są warunki formalne obowiązujące w tym względzie w Jednostce nadającej stopień doktora.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii 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 późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie pani Paulinie Maronie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

prof. dr hab. Piotr Widłak
Narodowy Instytut Onkologii, Gliwice

5 stycznia 2021