



**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Weroniki Sowińskiej
pod tytułem
„Rola Regnazy-2 w przebiegu stanu zapalnego mózgu
oraz patofizjologii glejaka wielopostaciowego”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Weroniki Sowińskiej została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Anety Kaszy w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii. Badania prezentowane w rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów badawczych OPUS8 (nr projektu: 2014/15/B/NZ2/03379) oraz OPUS21 (nr projektu: 2021/41/B/NZ4/02444).

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy charakterystyki molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację stanu zapalnego w mózgu i w patogenezie glejaka wielopostaciowego przez białka wiążące RNA należące do rodziny ZC3H12/MCPIP/Regnaz. Tematyka pracy tym samym integruje i poszerza wiedzę z zakresu mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy ośrodkowego układu nerwowego oraz występowanie chronicznego stanu zapalnego towarzyszącemu złośliwym nowotworom ośrodkowego układu nerwowego. W szczególności Doktorantka w swojej dysertacji skupiła się na roli Regnazy-2 w modulacji szlaków sygnałowych stanu zapalnego oraz jego roli w patofizjologii glejaka wielopostaciowego. Należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się ambitnego i trudnego zadania ze względu na skąpe dostępne informacje dotyczące Reg-2 w procesach nowotworzenia. Zasługuje to na podkreślenie ponieważ, z jednej strony Doktorantka musiała zmierzyć się z wieloma trudnościami już na etapie planowania koncepcji badań w szczególności pracy laboratoryjnej ze względu na ubogość dostępnych informacji, z drugiej strony dzięki podjęciu się temu wyzwaniu wykonaną pracę odznacza wysoki stopień innowacyjności, a otrzymane wyniki mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne.

Zgodnie z powyższym należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna, interesująca oraz mająca uzasadnienie w odniesieniu do wcześniejszych publikacji naukowych.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską Pani mgr Weroniki Sowińskiej stanowi zbiór 3 artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych zagranicznych czasopismach w latach 2019-2024. Wszystkie publikacje prezentują oryginalne wyniki eksperymentalne i są to następujące prace:

1. **W. Sowińska**, M. Wawro, A. Solecka, A. Kasza, "Potential Limitations of the Sleeping Beauty transposon use in gene expression studies", *Acta Biochim Pol.*, vol. 66, no. 3, pp. 263-268, 2019, doi: https://doi.org/10.18388/abp.2019_283
2. **W. Sowinska**, M. Wawro, D.D. Biswas, J. Kochan, K. Pustelny, A. Solecka, A.S. Gupta, K. Mockenhaupt, J. Polak, B. Kwinta, T. Kordula, A. Kasza, „The homeostatic function of Regnase-2 restricts neuroinflammation”, *FASEB J.* vol. 37, no. 3, p. e22798, 2023, doi: <https://doi.org/10.1096/FJ.202201978R>.
3. **W. Sowinska**, M. Wawro, J. Kochan, A. Solecka, J. Polak, B. Kwinta, A. Kasza, Regnase-2 inhibits glioblastoma cell proliferation, *Scientific Reports*, doi: 10.1038/s41598-024-51809-x (Zaakceptowano do publikacji 09.01.2024).

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona wykazem najważniejszych skrótów, streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, wprowadzeniem do tematyki pracy doktorskiej, przedstawianiem formy rozprawy, opisem celów pracy doktorskiej, krytyczną dyskusją wyników, podsumowaniem najważniejszych wyników z zaznaczeniem udziału poszczególnych współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy, przedstawieniem szczegółowego opisu udziału Doktorantki w tworzeniu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykazem rycin i tabel, wykazem wszystkich publikacji nie wchodzących w cykl oraz bibliografią.

Do ocenianej dysertacji dołączono jako załączniki pełne teksty publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora oraz wyniki dodatkowe będące uzupełnieniem do publikacji: *W. Sowinska, M. Wawro, D.D. Biswas, J. Kochan, K. Pustelny, A. Solecka, A.S. Gupta, K. Mockenhaupt, J. Polak, B. Kwinta, T. Kordula, A. Kasza*, „*The homeostatic function of Regnase-2 restricts neuroinflammation*”, *FASEB J.* vol. 37, no. 3, p. e22798, 2023, a także podpisane oświadczenia z opisem charakteru udziału poszczególnych współautorów w/w publikacji.



Przeprowadzona analiza załączonych oświadczeń Doktorantki, współautorów oraz informacji zawartych w publikacjach w sekcji „*Author contributions*” wskazuje jednoznacznie na wiodący udział Doktorantki w powstaniu wszystkich prac włączonych do rozprawy doktorskiej.

Na podkreślenie zasługuje bardzo precyzyjne wskazanie wykonanych samodzielnie eksperymentów oraz wyników w odniesieniu do każdej z prac wraz z podaniem odniesienia do rycin w poszczególnych publikacjach. Udział Doktorantki polegał nie tylko na wykonywaniu pracy doświadczalnej, ale również uczestnictwie w planowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, analizie baz danych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu rycin, analizie statystycznej uzyskanych wyników, uczestnictwie w tworzeniu i redagowaniu manuskryptu (w tym częściowemu opracowaniu opisu materiałów i metod, opisu wyników, opisu rycin, udział w opracowaniu wstępu i dyskusji – adekwatnie do prac i wyników, które Doktorantka wykonywała samodzielnie).

W zakresie powyższego, treść oświadczeń współautorów jest spójna z opisem przedstawionym przez Doktorantkę. W zakresie oświadczeń współautorów pewnym nieporozumieniem jest natomiast wskazywanie przez nich swojego % udziału w powstawaniu prac stanowiący cykl publikacji prezentowanych w doktoracie. Należy jednak zaznaczyć, że prace eksperymentalne wchodzące w skład cyklu są bardzo obszerne i bogate w liczne dane eksperymentalne. Dlatego w ocenie Recenzenta szacowanie udziału % współautorów może być trudne i jest zbyteczne, tym bardziej, że współautorzy w oświadczeniach podali opis swojego udziału. Dla przykładu w jaki sposób oszacowano udział współautora na 1 lub 4%? Jakże z kolei były kryteria szacowania udziału współautorstwa na poziomie 5%? Jest to pytanie, na które oczywiście Recenzent nie oczekuje odpowiedzi, ponieważ udziały wszystkich współautorów zostały jednoznacznie merytorycznie opisane.

Ocena spójności tematycznej zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

Prace doktorską, jak już zaznaczono powyżej, stanowi cykl trzech opublikowanych artykułów naukowych. Pierwsza z cyklu praca opublikowana w *Acta Biochim Pol* opisuje opracowanie narzędzi pozwalających na badanie funkcji i regulacji aktywności Reg-2. W drugiej wchodzącej w cykl publikacji opublikowanej w czasopiśmie *FASEB J* w oparciu o opracowane wcześniej narzędzia i procedury Doktorantka opisała rolę Reg-2 w regulacji stanu

zapalnego mózgu oraz zaproponowała mechanizm odpowiedzialny za jej poziom, a także wykorzystując linię komórkową U251-MG z indukowaną doksycykliną syntezą Reg-2 z dodaną metką FLAG zaproponowała znaczenie Reg-2 w patogenezie glejaka wielopostaciowego. Z kolei w trzeciej z cyklu publikacji opublikowanej w *Scientific Reports* Doktorantka opisała znaczenie Reg-2 w regulacji proliferacji komórek linii ludzkiego glejaka wielopostaciowego.

Recenzent stwierdza, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, tym samym warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska, w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wprowadzenie teoretyczne do tematyki pracy doktorskiej zostało opracowane kompleksowo i zawiera syntetyczne podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy o znaczeniu stanu zapalnego jako procesu biologicznego, w tym charakterystyce jego przebiegu w mózgu. We wprowadzeniu opisano również rolę mikrogleju i astrocytów w procesie zapalnym. W dalszej części wprowadzenia Doktorantka podsumowała dotychczasowe dostępne informacje o glejakach, udziale w regulacji stanu zapalnego przez białka wiążące RNA, charakterystyce rodziny białek ZC3H12/MCPIP/Regnaz oraz ich roli w modulacji stanu zapalnego, w tym z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych. Ostatni podrozdział Doktorantka poświęciła natomiast regulacji ekspresji i aktywności Regnaz oraz roli Regnaz w chorobach nowotworowych. Wprowadzenie wzbogacone zostało w jedną rycinę przedstawiającą budowę białek z rodziny ZC3H12/MCPIP/Regnaz z zaznaczeniem lokalizacji poszczególnych domen oraz ich wielkości. We wprowadzeniu zamieszczono również tabelę z transkryptami regulowanymi przez poszczególne Regnazy.

Rozdział wprowadzenie został opracowany poprawnie w aspekcie uzasadnienia podjęcia badań przez Doktorantkę. Całość wprowadzenia zawiera także wszystkie niezbędne informacje potrzebne dla zrozumienia omawianych w dalszej części doktoratu treści.

Pewien niedosyt jednak budzi brak wyraźnej wyodrębnionej w dysertacji hipotezy badawczej, którą Doktorantka planowała zweryfikować. Określenie/zdefiniowanie oraz graficzne przedstawienie hipotezy badawczej mogłoby być także doskonałym podsumowaniem wprowadzenia. Pozwoliłoby także na płynniejsze przejście między rozdziałem zatytułowanym „Wprowadzenie” a rozdziałem „Cele pracy”.

Cel pracy został określony w sposób jednoznaczny zgodnie z tematem rozprawy i znajduje uzasadnienie w dotychczasowym stanie wiedzy. Doktorantka sprecyzowała również sześć celów szczegółowych, które miały posłużyć Jej w charakterystyce roli biologicznej Reg-2 oraz zbadaniu regulacji Reg-2 poziomu w przebiegu stanu zapalnego mózgu i w patogenezie glejaka wielopostaciowego.

Podsumowując powyższe stwierdzam, że opisany w dysertacji Pani mgr Weroniki Sowińskiej cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ realizacja tego celu istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Recenzent ocenia także wysoko wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że w/w artykuły podlegały rygorystycznym procedurom specjalistycznej recenzji zewnętrznej oraz przez członków rad redakcyjnych, w których zostały opublikowane. Opis wykorzystanych układów eksperymentalnych oraz zastosowanych technik w artykułach prezentujących oryginalne wyniki został dokonany z należytą starannością lub z właściwymi odnośnikami literaturowymi i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Zastosowane metody zostały dobrane i użyte odpowiednio dla weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów pracy doktorskiej. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz ilość użytych metod, zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki. Forma prezentacji wyników oraz ich opis w artykułach naukowych została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w artykułach oraz pracy doktorskiej cele.

W pierwszej z cyklu prac zatytułowanej „*Potential Limitations of the Sleeping Beauty transposon use in gene expression studies*” Doktorantka wykorzystując technikę CRISPR/Cas9 z powodzeniem otrzymała linię komórkową ludzkiego glejaka wielopostaciowego U251-MG, z wyłączonym genem kodującym Reg-2 (U251-MG-M2-KO), którą następnie wykorzystano do wyprowadzenia linii komórkowych z indukowalną nadekspresją Reg-2 (U251-MG-M2-SB) i linię kontrolną, z indukowalną nadekspresją lucyferazy (U251-MG-LUC). W tym celu w badanych komórkach zastosowano system Tet-On oparty na transpozonie o nazwie *Sleeping Beauty*. W pracy Doktorantka dokonała jednocześnie krytycznej analizy wykorzystanych

systemów w aspekcie ich zastosowania do badania funkcji białka Reg-2. Doktorantka stwierdziła również, że modyfikacja komórek przy pomocy systemu *Sleeping Beauty* może modulować profil transkryptów np. promować wzrost poziomu mRNA *IL-6* i *VEGFA* w porównaniu do komórek niemodyfikowanych przy pomocy wektorów *Sleeping Beauty*. Wynik ten uważam, za bardzo istotny dla interpretacji późniejszych wyników prezentowanych w dwóch pozostałych publikacjach. Wynik ten ma także duże znaczenie dla innych badaczy wykorzystujących narzędzia inżynierii genetycznej do generowania linii komórkowych wykorzystywanych w badaniach funkcjonalnych.

W publikacji zatytułowanej „*The homeostatic function of Regnase-2 restricts neuroinflammation*” Doktorantka przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych modeli komórkowych oraz komórek izolowanych z mózgow myszy opisała szereg interesujących obserwacji. Obserwacje te dotyczyły m.in., różnic w poziomie transkryptów Reg-1 oraz Reg-2 w zdrowym mózgu oraz w glejaku u myszy, wykazanie że poziom mRNA Reg-2 jest obniżony w próbkach glejaków o wysokim stopniu złośliwości, w porównaniu do guzów o niskim stopniu złośliwości oraz, że towarzyszy temu podniesiony poziom transkryptów Reg-1, IL-6 i TTP. Doktorantka wykazała także, że niski poziom Reg-2 oraz wysoki poziom Reg-1 korelują ze złymi prognozami przeżywalności dla pacjentów. W zakresie charakterystyki molekularnych mechanizmów kontroli poziomu i funkcji Reg-2 wykazała, że białko to pod wpływem IL-1 β ulega fosforylacji, ubikwitynacji i degradacji proteasomalnej na ścieżce zależnej od kompleksu kinazy I κ B. Doktorantka dowiodła również, że seryny obecne w konserwatywnym motywie DSISDS nie są odpowiedzialne za obserwowaną pod wpływem stymulacji IL-1 β modyfikację i degradację Reg-2. Z kolei z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych stwierdziła, że potencjalnie fosforylowane treoniny na N-końcu Reg-2 nie są zaangażowane w zależną od IL-1 β modyfikację Reg-2. Eksperymentalnie potwierdziła, że Reg-2 reguluje poziom transkryptów Reg-1 i IL-6 w mysiej linii glejaka KMWT1 oraz w ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego U251-MG w sposób zależny od aktywności RNazy. W omawianej pracy wykazała również fakt zdolności hamowania proliferacji komórek linii mysiego glejaka KMWT1 oraz ludzkich linii glejaka wielopostaciowego U251-MG przez Reg-2.

W ostatniej z cyklu prac zatytułowanej „*Regnase-2 inhibits glioblastoma cell proliferation*” Doktorantka dokonała szczegółowej analizy udziału Reg-2 w kontroli proliferacji komórek glejaka wielopostaciowego. W tym zakresie Doktorantka wykazała, że po indukcji syntezy Reg-2 w komórkach U87-Reg-2 (linia komórkowa zmodyfikowana przy



pomocy systemu *Sleeping Beauty* z indukowaną doksycykliną syntezą Reg-2 typu dzikiego) następuje silne zahamowanie podziałów komórek. Doktorantka wskazała, że Reg-2 powoduje również zatrzymanie komórek U87-MG w fazie G1 cyklu komórkowego, a fakt ten wiąże się z destabilizacją transkryptów kodujących białka zaangażowane w proliferację i cykl komórkowy takich jak: CCND1, CCNE1, CCNE2, CCNB1, CCNB2, CCNA2, PLK1 i AURKA. Doktorantka stwierdziła również, że zmiany poziomu białek tychże genów. Bardzo ważnym aspektem tej publikacji jest także dokonanie analizy pokazującej jak poziom zidentyfikowanych transkryptów, modulowanych przez zmiany w ekspresji genu Reg-2 ulega zmianie u glejaków o wysokim i niskim stopniu złośliwości.

Opisane powyżej wyniki zostały podane szczegółowej dyskusji w oparciu o adekwatną do problematyki literaturę w wyodrębnionym rozdziale dysertacji. Należy jednocześnie zaznaczyć, że polemika Doktorantki z wcześniejszymi danymi została przeprowadzona w sposób dojrzały, wskazując na bardzo dobrą znajomość tematyki. Opis wskazuje również, że cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte.

Jak zaznaczono już w recenzji jakość wyników oraz ich znaczenie dla rozwoju dyscypliny nauk biologicznych nie budzą zastrzeżeń i zasługują na uznanie.

Po przeczytaniu i analizie wyników Recenzent ma jednak kilka pytań i uwag związanych z wynikami zaprezentowanymi w ocenianej dysertacji.

- 1) Doktoranta w publikacji opublikowanej w *Acta Biochim Pol* wskazuje na niedoskonałości związane ze stosowaniem systemów do generowania modyfikowanych genetycznie linii komórkowych. Na stronie 32 dysertacji formułuje także wniosek „*Istotną obserwacją wynikającą z przeprowadzonych badań jest wzrost poziomu mRNA IL-6 i VEGFA w komórkach kontrolnych U251-MG-LUC w porównaniu do komórek niemodyfikowanych przy pomocy wektorów SB (U251-MG-M2-KO). Sugeruje to, że sama modyfikacja komórek przy pomocy SB może indukować zmiany poziomu niektórych transkryptów (ABP, Fig. 4). Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że w doświadczeniach z wykorzystaniem tej metody edycji genomu komórki niemodyfikowane nie są odpowiednią kontrolą. Jako kontrolę należy stosować komórki zmodyfikowane przy pomocy wektora SB*”. Powstaje zatem pytanie w jaki sposób Doktorantka nabyła pewności, że wprowadzona modyfikacja nie powoduje innych zmian poza tymi opisanymi? Czy Doktorantka sprawdziła aktywację innych szlaków komórkowych, które mogą być aktywowane/hamowane na skutek obecności

egzogennych kwasów nukleinowych wykorzystanych w procedurze generowania modyfikowanych linii komórkowych? Co wiadomo o stabilności genetycznej otrzymanych według opisanych procedur linii komórkowych? Czy Doktorantka kontrolowała linie z wykorzystaniem metod cytogenetycznych lub aCGH? Czy wiadomo jak długo otrzymane modyfikowane linie komórkowe mogą być przetrzymywane i pasażowane bez ryzyka nastąpienia zmian w genomie?

- 2) Na stronie 45 Doktorantka zamieściła stwierdzenie „*Reg-2 ulega wysokiej ekspresji w zdrowym mózgu, podczas gdy poziom Reg-1 w tym organie jest niski*” podczas gdy wyniki zamieszczone na rycinie 1A w pracy opublikowanej w *FASEB J* nie wskazują na poprawność tego twierdzenia. Proszę o wyjaśnienie jakie dokładnie wyniki miała Doktorantka na myśli formułując to stwierdzenie.
- 3) Ponieważ jednym z istotnych osiągnięć Doktorantki jest „*zidentyfikowanie nowych substratów Reg-2*” proszę o doprecyzowanie etapów immunoprecypitacji RNA, które doprowadziły do tych odkryć opisanych w publikacji opublikowanej w *Scientific Reports*. Proszę również o doprecyzowanie w jaki sposób Doktorantka odniosła otrzymane w tej procedurze wyniki do identyfikacji zmian transkryptów obserwowanych w liniach komórkowych glejaka? Dlaczego zrezygnowano z wykorzystania dedykowanego przeciwciała do Reg-2 dla walidacji otrzymanych wyników przez Doktorantkę?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską mgr Weroniki Sowińskiej oraz stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Doktorantka udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska wnosi nowe informacje do dyscypliny nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Sowińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową otrzymanych przez Doktorantkę wyników dotyczących charakterystyki mechanizmów kontroli oraz aktywności biologicznej Regnazy-2

w szczególności w patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 04/03/2024


Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR