



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wrocław 09.06.2024

Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka  
Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław  
e-mail: julita.kulbacka@umw.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Soleckiej**

**pt.: „Regulacja procesów nowotworowych przez białko Regnase-2 w kontekście glejaków wielopostaciowych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Aleksandry Soleckiej została wykonana w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem i opieką merytoryczną dr hab. Anety Kasza, profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Obecnie ciągle poszukuje się nowych, skutecznych i bezpiecznych metod leczenia nowotworów i mechanizmów potęgowania działania leków, co jest jednym z wyzwań nowoczesnej farmacji i medycyny. Dysertacja mgr Aleksandry Soleckiej doskonale wpisuje się w nurt badań przeciwnowotworowych, a mianowicie przedstawia nowatorskie podejście do badania białka Regnazy-2 (Reg-2) jako potencjalnego supresora glejaka wielopostaciowego. Badania przedstawione w dysertacji zrealizowano w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS-21, poświęconego tematyce RNazy ZC3H12B w patofizjologii glejaka wielopostaciowego. Autorka w swoich badaniach skupiła się na wpływie Reg-2 na migrację, proliferację, apoptozę oraz metabolizm komórek nowotworowych, w szczególności glioblastoma multiforme.

Praca ma klasyczny układ obejmujący wstęp teoretyczny, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję oraz podsumowanie wyników. Rozprawę pani mgr Aleksandry Soleckiej rozpoczyna wykaz skrótów, ułatwiający zgłębianie zagadnień podejmowanych w dysertacji.

Kolejno Autorka we Wstępie teoretycznym wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z glejakiem wielopostaciowym oraz immunosupresyjnymi właściwościami środowiska guza. Dalej zapoznajemy się z zagadnieniami angiogenezy, migracji i inwazyjności oraz apoptozy. W tym rozdziale Autorka dość skromnie wyjaśnia czym jest apoptoza i jakie mogą być jej szlaki aktywacji. W kolejnych rozdziałach rozprawach Doktorantka opisuje mechanizmy regulacji czasu półtrwania transkryptów i opisuje białka wiążące RNA, rozpoznające drugorzędowe struktury w tym ARID5A, Roquina-1 i grupę Regnaz, na których skupia się w swoich badaniach. W następnym rozdziale wskazuje postawione sobie cele naukowe w pracy, które przedstawia w siedmiu klarownych punktach.

W dalszych etapach praca zawiera opis metodyki i materiałów wykorzystanych w doświadczeniach spis odczynników i aparatury, otwierający część eksperymentalną. Doktorantka na początku przedstawia spis wykorzystanych materiałów ze wskazaniem ich pochodzenia. W przypadku spisu linii komórkowych warto dodać numery katalogowe co ułatwi czytelnikowi odniesienie się do charakterystyk wykorzystanych komórek. Podobnie w części wykazującej odczynniki warto dodać numery katalogowe co znacznie ułatwi powtórzenie badań. Doktorantka wskazuje również, że wykorzystywała naczynia hodowlane i płytki do pomiaru luminescencji. W tym miejscu warto dodać jakie to naczynia (np. butelki hodowlane czy szalki o odpowiednim rozmiarze i powierzchni) oraz jakie płytki. Warto dodać również informację ilu-komorowe były inserty wykorzystywane do testów „zarastania rany”.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia Metody, na uwagę zasługuje bogaty warsztat badawczy i dociekliwość naukowa potwierdzona ilością doświadczeń. Procedury są dokładnie opisane, łącznie ze składem poszczególnych buforów, żeli oraz sekwencjami starterów. W kontekście sformułowań w opisie metodyki Doktorantka często używa określenia „studnia” w odniesieniu do płytek hodowlanych, w tym przypadku raczej mówimy o „dołku”, czy płytkach wielodołkowych. Nie do końca jest zrozumiałe, czy doświadczenie „Ocena proliferacji komórek” polegała na liczeniu komórek w różnych punktach czasowych. Samo liczenie komórek nie do końca odzwierciedla proliferację, tu przykładowo należałoby wyznakować komórki błękitem trypanu, żeby zweryfikować procent żywych komórek, które są zdolne do proliferacji. Jednak lepszym testem w tym przypadku byłaby metoda SRB, wykorzystywana do oceny proliferacji komórek w oparciu o pomiar zawartości białka komórkowego w komórkach żywych.

W odniesieniu do testu klonogenego zabrakło informacji czy liczba komórek w tym teście była optymalizowana wcześniej. Autorka wskazuje, że w przypadku poszczególnych linii komórkowych była to inna ilość.

W dalszej części Doktorantka prowadzi dyskusję wyników w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Słusznie zwraca uwagę, że do tej pory jest niewiele badań pokazujących udział Rengazy-2 w glejaku wielopostaciowym. Autorka wskazuje na zależności pomiędzy Reg-2 a metabolizmem komórek, wpływ na migrację i inwazyjność oraz apoptozę. Rozdział ten kończy podsumowanie wyników przedstawione w ośmiu wnioskach. Badania wykazały, że białko Reg-2 tworzy w cytoplazmie struktury przypominające granule, co odróżnia je od innych członków rodziny Regnaz, takich jak Reg-3, który rozdyfundowuje się równomiernie. Ekspresja Reg-2 nie zmienia się po aktywacji receptorów TLR1-9, co sugeruje specyficzny sposób regulacji tego białka. Reg-2 odgrywa istotną rolę w regulacji potencjału migracyjnego komórek glejaka wielopostaciowego, zmniejszając ich zdolność do migracji, co może być związane z obniżonym poziomem mRNA oraz aktywnością białka MMP2. Ponadto, Reg-2 wpływa na ilość i skład wydzielanych przez komórki glejaka chemoatraktantów. Zjawisko to zostało potwierdzone obserwacją intensywniejszej migracji mysich komórek endotelialnych w kierunku pożywki z komórek glejaka z wyciszoną ekspresją Reg-2. W odpowiedzi na stres oksydacyjny, komórki z nadekspresją Reg-2 nie tworzą granul stresowych lub ich liczba jest zredukowana, co może wynikać z obniżonego poziomu białka G3BP1, kluczowego składnika tych struktur. W czasie przebiegu badań Doktorantka stwierdziła, że transkrypt G3BP1 jest nowym substratem dla Reg-2. Jak się okazuje, Reg-2 również reguluje apoptozę i proliferację komórek, indukując wczesne markery apoptozy, zmniejszając żywotność komórek i hamując ich proliferację. Mechanizm ten może być związany z degradacją przez Reg-2 transkryptu BIRC5, który jest inhibitorem apoptozy. BIRC5 został zidentyfikowany jako nowy substrat dla Reg-2. Autorka wykazała również, że zmiany w metabolizmie komórkowym, takie jak zahamowanie glikolizy, prowadzą do fosforylacji i degradacji Reg-2 oraz zwiększenia poziomu transkryptu IL-6. Nadekspresja Reg-2 powoduje, że komórki pozyskują mniej energii przez fosforylację oksydacyjną, a samo Reg-2 nie lokalizuje z mitochondriami.

Dodatkowo, Doktorantka wprowadziła system CRISPRi, co pozwoliło na skuteczne wyciszenie ekspresji ZC3H12B w ludzkich komórkach. Jak wykazała, dwa z trzech przygotowanych konstruktów okazały się skuteczne, przy czym jeden z nich obniżył poziom mRNA Reg-2 o 90%. Wyniki te sugerują, że Reg-2 jest istotnym regulatorem procesów patofizjologicznych w komórkach glejaka wielopostaciowego, wpływając na migrację, angiogenezę, odpowiedź na stres, apoptozę oraz metabolizm. **Z całym przekonaniem stwierdzam, że badania rozszerzają wiedzę o funkcjonalności Reg-2, pokazując, że jest to białko mogące hamować rozwój glejaka wielopostaciowego.**

Uwagi i kwestie do wyjaśnienia:

(1) Doktorantka wykazała, że Reg-2 wpływa na poziom MMP2, jednak wyniki nie dowodzą bezpośredniej interakcji Reg-2 z transkryptem MMP2 co słusznie sugeruje Autorka, że efekt Reg-2 na regulację poziomu mRNA MMP2 jest pośredni. Jakie mechanizmy mogą prowadzić do tej pośredniej regulacji? Być może należałoby przeprowadzić dodatkowe eksperymenty potwierdzające bezpośrednie wiązanie mRNA MMP2 przez Reg-2.

(2) W rozprawie wskazano, że w celu potwierdzenia zależności pomiędzy poziomem Reg-2, a poziomem mRNA MMP2 przeanalizowano próbki glejaków pobranych od pacjentów. W pracy zabrakło szczegółów dotyczących pobieranych próbek oraz czy Autorka badań uzyskała zgodę odpowiedniej komisji do przeprowadzenia tych oznaczeń, w tej kwestii zwracam się do Doktorantki o wyjaśnienie.

(3) Jakie mogą być funkcje pozostałych Regnaz w komórkach glejaka, czy również mogą mieć udział w inwazyjności, śmierci komórki i metabolizmie tych komórek? Przykładowo Regnaza-1, podobnie jak Reg-2, posiada aktywność RNazową i rozpoznaje struktury pętli w obrębie 3'UTR transkryptów. Degraduje mRNA dla cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40 oraz IL-17.

(4) Wyniki dotyczące wpływu Reg-2 na tworzenie granul stresowych (GS) i poziom G3BP1 są bardzo ciekawe, ale wymagają dalszych badań, aby potwierdzić, że obserwowane efekty są uniwersalne i nie zależą od specyficznych warunków eksperymentalnych. Niektóre badania pokazują, że stres oksydacyjny jest jednym z warunków indukujących powstawanie GS, a te mogą regulować poziom redoks. Czy w tym przypadku można zaobserwować, że powstawanie GS jest regulowane przez stres oksydacyjny?

(5) W rozprawie zaprezentowano obiecujące wyniki badań, jednak brakuje szerszej analizy w odniesieniu aplikacji klinicznej, która mogłaby potwierdzić rolę Reg-2 jako supresora glejaków w próbkach od pacjentów.

Doktorantka umiejętnie analizuje otrzymane wyniki i potrafi je odnieść do aktualnego stanu wiedzy. Z obowiązku recenzenta, zwracam również uwagę na pewne niejasności, które znalazłam w tekście pracy:

- opis metodologii wymaga drobnych uzupełnień co zaznaczono w recenzji;
- zamiast zwrotu „studnia”, lepiej stosować „dołek” w odniesieniu do płytek hodowlanych;

- Autorka przeprowadziła analizę statystyczną, co widać na prezentowanych wykresach z wynikami, jednak brakuje opisu przeprowadzonych analiz, rozdział Analiza statystyczna (w spisie na str.52) na stronie 50, opisuje tylko jakiego programu użyto do tych analiz. Tu z pewnością trzeba wykazać różnice w testach w przypadku badań komórkowych czy też badań na próbkach od pacjentów.

#### Podsumowanie:

**Nowością pracy jest szczegółowa analiza wpływu Regnase-2 na różne procesy komórkowe w glejakach, co dotychczas nie było szeroko badane.** Doktorantka wykazała że Reg-2 (1) indukuje apoptozę przez degradację mRNA BIRC5, który jest inhibitorem apoptozy, (2) ogranicza migrację komórek nowotworowych przez regulację poziomu MMP2 (metaloproteinazy 2), (3) negatywnie wpływa na proliferację i odpowiedź stresową komórek, (4) reguluje metabolizm komórek poprzez wpływ na funkcjonalność mitochondriów i proces glikolizy. Doktorantka pokazuje, że w komórkach z nadekspresją Reg-2 zmniejsza się liczba granul stresowych, co może być związane z obniżonym poziomem białka G3BP1. Otrzymane wyniki wskazały, również że inhibicja glikolizy prowadzi do fosforylacji i degradacji Reg-2 oraz zwiększenia poziomu IL-6 mRNA, co wpływa na energię uzyskiwaną przez komórki nowotworowe.

Przedstawiona do oceny rozprawa wskazuje, że Kandydatka do stopnia doktora wykazuje wiedzę w zakresie reprezentowanej dyscypliny oraz posiada umiejętności samodzielnego projektowania i prowadzenia pracy naukowej, oraz analizy otrzymanych wyników. Rozprawa doktorska, jest napisana językiem naukowym i zaopatrzona w schematy ułatwiające czytającemu analizę podjętej tematyki.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Soleckiej wnosi znaczący wkład w zrozumienie roli białka Regnazy-2 w kontekście glejaków wielopostaciowych. Doktorantka wykorzystwała szeroki zakres badań do realizacji zamierzonych celów. Mimo pewnych niedociągnięć, drobnych błędów edytorskich i obszarów wymagających dalszych badań, praca ta przedstawia nowatorskie podejście i cenne wyniki, które mogą przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w leczeniu agresywnych nowotworów mózgu. Stwierdzam, że przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Warto zauważyć, że . Otrzymane wyniki posiadają elementy nowości naukowej i z pewnością znajdą wielu odbiorców nie tylko w naukach podstawowych ale również w zakresie nauk klinicznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Aleksandry Soleckiej pt.: *”Regulacja procesów nowotworowych przez białko Regnase-2 w kontekście glejaków wielopostaciowych”*, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia

20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2022 poz. 574 ze zm.).  
W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o **przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani Aleksandry Soleckiej do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.** Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, wagę badań i ich nowatorski charakter, składam formalny wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne o **przyznanie wyróżnienia** Autorce dysertacji, Pani mgr Aleksandrze Soleckiej

Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ  
kierownik  
  
dr hab./inż. Julita Kulbacka, prof. uczelni