



Gliwice, 18.10.2017

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Elżbiety Boratyn

Tytuł rozprawy: Rola białka indukowanego przez monocytarne białko chemotaktyczne (MCPIP1) w ludzkich komórkach neuroblastoma

Autor rozprawy: Elżbieta Boratyn

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Hanna Rokita

Promotor pomocniczy: dr Irena Horwacik

Cel i zakres rozprawy

Przedmiotem pracy doktorskiej było białko MCPIP1 (białko indukowane przez monocytarne białko chemotaktyczne, *monocyte chemoattractant protein-1 induced protein 1*) i jego rola w komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma, NB). Zespół w którym pracuje Autorka zaobserwował, 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. Zaobserwowano też odwrotną korelację pomiędzy poziomem amplifikacji MYCN a poziomem ekspresji genu kodującego MCPIP1 w liniach komórkowych NB. Z kolei wymuszenie nadekspresji białka MCPIP1 powodowało spadek żywotności komórek NB.

Aby lepiej scharakteryzować rolę białka MCPIP1 w nerwiaku, Doktorantka podjęła dwa kierunki badań. Pierwszym było zbadanie profilu ekspresji mRNA i miRNA w komórkach NB z nadekspresją białka MCPIP1 i bez jego ekspresji, oraz w komórkach z wymuszoną nadekspresją zmutowanego białka MCPIP1, pozbawionego domeny rybonukleazowej. W tym celu wykorzystano technikę mikromacierzy (macierze ekspresyjne Illumina oraz macierze miRNA firmy Exiqon). Wyniki tych analiz były następnie walidowane za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR oraz techniki western blotting, a także w testach funkcjonalnych.

Drugie zadanie dotyczyło zbadania wpływu ekspresji/wyciszenia MCPIP1 na regulację aktywności onkogenu MYCN, który pełni kluczową rolę w rozwoju i progresji neuroblastoma. W zadaniu tym wykorzystano techniki RT-PCR oraz ilościowej RT-PCR i western blotting do oceny poziomu ekspresji i fosforylacji MYCN i białek oddziałujących z nim bezpośrednio oraz pośrednio, poprzez komórkowe szlaki sygnalizacyjne. Wykorzystano także technikę mikromacierzy białkowych do oceny szlaków związanych z indukcją apoptozy.

Ocena formalna pracy

Podstawą pracy doktorskiej są dwa monotematyczne artykuły opublikowane w *Journal of Cellular Biochemistry* (IF 3,196); w obu przypadkach Doktorantka jest głównym (pierwszym) autorem. W skład rozprawy wchodzi również streszczenie oraz omówienie obydwu opublikowanych prac, zajmujące 26 stron i składające się z wprowadzenia, celu pracy, omówienia publikacji i podsumowania. Rozprawa zawiera także spis bibliografii (114 pozycji), spis dorobku publikacyjnego Doktorantki oraz załączniki, czyli kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów publikacji. Tu nasuwa się uwaga, że przedstawiono oświadczenia pięciu współautorów, brak natomiast oświadczeń sześciu innych współautorów.

O ile mi wiadomo, nie ma zatwierdzonego standardowego wzoru dla rozpraw przygotowywanych w formie zbioru publikacji. Niezależnie od tego, należy uznać, że forma, w której rozprawa została przygotowana jest właściwa i wystarczająca.

Mam natomiast trochę uwag odnośnie redakcji części opisowej, w której znajduję trochę niezręczności językowych i stylistycznych. Najbardziej uderza mnie używane konsekwentnie w całym tekście sformułowanie „sygnałowanie komórkowe”, czy „ścieżki sygnałowania”. Wydaje się, że przyjętym określeniem w języku polskim jest „sygnalizacja komórkowa” i „ścieżki sygnałowe”. Podobnie, określenie „motyw pojedynczego palca cynkowego” powinno raczej brzmieć: „pojedynczy motyw palca cynkowego”. Sformułowanie „wirusowe RNA” sugeruje, że RNA – kwas rybonukleinowy, jest rodzaju nijakiego, a nie męskiego – powinno być zastąpione sformułowaniem „wirusowy RNA”. Zamiast pisać o N-koncu zręczniejsz byłoby użyć sformułowania „koniec aminowy”, zwłaszcza w opisie Ryciny 1, gdzie wyjaśnieniem symbolu „N” jest opis: „N-koniec białka”, a symbolu „C” – „C-koniec białka”. Podobnie, sformułowanie: „użyto dobrze znanych metod biologii molekularnej” brzmi niezręcznie i zawiera (zupełnie zbędny) element deprecjacji rangi badań; zręczniejsz byłoby użyć określenia „standardowych metod”.

Podsumowując, wstępna część rozprawy zyskałaby w odbiorze, gdyby była lepiej dopracowana pod względem redakcyjnym, natomiast cały wywód, mimo tych niedociągnięć, pozostaje logiczny i jasny. Spis cytowanej literatury jest aktualny i wyczerpujący.

W Podsumowaniu znajduje się opis aktualnie prowadzonych badań nad rolą białka MCPIP1 w regulacji cyklu komórkowego, a zatem wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej stały się inspiracją do dalszych dociekań.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Nowatorski charakter badań wiąże się z tym, że białko MCPIP1 zostało stosunkowo niedawno poznane i jest wciąż słabo scharakteryzowane. Dotychczasowe dane wskazują, że ma ono plejotropowe działanie i pełni ważną rolę w stanach fizjologicznych i patologicznych, będąc zaangażowanym m.in. w regulację stanu zapalnego, apoptozy i różnicowania. Rola MCPIP1 w procesie nowotworowym jest słabo zbadana, duży wkład w ten nurt badań ma zespół w którym pracuje Doktorantka. Oryginalnym osiągnięciem Doktorantki i całej grupy

badawczej, jest wykonanie badań, które pozwalają postulować, że białko MCPIP1 pełni rolę supresora procesu nowotworowego w komórkach nerwiaka.

Badania będące podstawą pracy doktorskiej wykazały, że nadprodukcja MCPIP1 powoduje obniżenie ekspresji onkogenu MYCN na poziomie mRNA i nawet w większym stopniu, na poziomie białka, w liniach komórkowych neuroblastoma. Wykazano także zahamowanie ścieżki Akt/mTOR, która moduluje stabilność MYCN. Amplifikacja MYCN i podwyższona aktywność tego białka jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w neuroblastoma, wiążąc się z niezróżnicowanym fenotypem guza i z krótszym czasem przeżycia pacjentów. Zatem MCPIP1 może wpływać na modulowanie agresywnego fenotypu komórek nerwiaka.

Tutaj narzuca się wniosek, aby powrócić do badań na materiale klinicznym i potwierdzić te obserwacje *in vivo*. Tym bardziej, że w pracy Skalniak i wsp., z 2014 r., na której oparto się formułując cele niniejszej pracy doktorskiej, analizowano jedynie 29 guzów pierwotnych NB i jedną próbkę z guza przerzutowego. Co ciekawe, w guzach pierwotnych nie obserwowano ekspresji mRNA MCPIP1, ale w materiale z jedyne analizowanego przerzutu gen kodujący MCPIP1 ulegał ekspresji, czego Autorzy nie dyskutują i co nie zostało potwierdzone na szerszej grupie przypadków.

Aby rzucić światło na molekularne mechanizmy działania białka MCPIP1 w komórkach neuroblastoma Doktorantka zbadała profil ekspresji mRNA i miRNA w komórkach z nadekspresją i z brakiem ekspresji MCPIP1 oraz w komórkach z nadekspresją mutanta MCPIP1, pozbawionego domeny rybonukleazowej. Intryguje mnie, dlaczego mając dane o ekspresji genów i o ekspresji miRNA, w pierwszej kolejności nie skonfrontowano tych wyników ze sobą? A przynajmniej nie jest to omówione. Mając bowiem wybrane klasy miRNA różnicujące komórki z nadekspresją MCPIP1 i mutanta MCPIP1 oraz komórki bez ekspresji MCPIP1 - można było przeanalizować ekspresję docelowych genów potencjalnie regulowanych przez te miRNA w danych z mikromacierzy ekspresyjnych. Zamiast tego, zbadano ekspresję wybranych potencjalnych genów docelowych za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR i techniką western blotting. Te analizy pozwoliły ustalić, że spośród ośmiu potencjalnych celów, dwa – DFFB i APAF1, mogą rzeczywiście być regulowane przez miR-3613-3p. Dane eksperymentalne sugerują także, że miR-3613-3p może podlegać regulacji przez MCPIP1 (trawienie prekursora przez domenę rybonukleazową). Ta hipoteza jest przedmiotem dalszych badań zespołu i Doktorantki.

Kolejnym interesującym wynikiem jest stwierdzenie, że nadekspresja MCPIP1 powoduje obniżenie ekspresji transportera choliny SLC44A1. Ta obserwacja otrzymana w analizie danych z mikromacierzy ekspresyjnych została potwierdzona innymi technikami, zarówno na poziomie RNA i białka, a test funkcjonalny z wykorzystaniem znakowanej choliny wykazał upośledzenie pobierania tego związku przez komórki z nadekspresją MCPIP1. W komórkach z nadekspresją mutanta MCPIP1 transport choliny był jeszcze bardziej upośledzony. Tutaj nasuwa się refleksja, że spośród teoretycznie możliwych mechanizmów wpływających na obniżenie poziomu białka MYCN w komórkach NB z nadekspresją MCPIP1 można zapewne wykreślić metylację genu MYCN, gdyż cholina jest ważnym donorem grup metylowych.

W drugiej części pracy, w bogatej serii niezwykle eleganckich eksperymentów, Doktorantka przeanalizowała mechanizmy, które stoją za upośledzeniem funkcji MYCN w komórkach NB

z nadekspresją MCPIP1. Po pierwsze, w komórkach tych występuje obniżony poziom mRNA MYCN, ale nie obserwuje się skrócenia okresu jego półtrwania. To wskazuje, że mRNA MYCN nie jest bezpośrednim celem działania domeny rybonukleazowej MCPIP1. Po drugie, występuje zmieniona ekspresja i fosforylacja białek takich jak Aurora A, CDC2, GSK3 β , które są partnerami białka MYCN i wpływają na jego aktywność i stabilność. Konsekwentnie, w komórkach z nadekspresją MCPIP1 wykazano fosforylację MYCN w pozycji treoniny 58, co jest czynnikiem wpływającym na destabilizację tego białka. Na uznanie zasługuje zwłaszcza mistrzowska dyskusja tych zagadnień w pracy Boratyn i wsp., 2017; Autorzy zaproponowali ponadto schemat pokazujący, w jaki sposób zahamowanie ścieżki Akt/mTOR oraz zmiana wzoru fosforylacji białkowych partnerów MYCN powoduje jego destabilizację.

Odnosnie wpływu MCPIP1 na komórkowe ścieżki sygnałowe, nasuwa się jeszcze jeden komentarz. Różnice w transkryptomie pomiędzy komórkami dzikimi i z nadekspresją MCPIP1 w formie wyjściowej i zmutowanej nie były zbyt silne: 127 genów spełniających przyjęte kryterium znamienności statystycznej (false discovery rate < 5%). W tym, zaledwie 12 transkryptów wykazywało zmianę ekspresji większą niż 30% (fold change > 1,3). Nie jest to zjawisko niecodzienne, a raczej często obserwowane w podobnych układach modelowych (porównanie linii komórkowej z nadekspresją pojedynczego genu do linii wyjściowej). W takiej sytuacji, gdy otrzymujemy mało genów o zmienionej ekspresji, lub zmiany są znamienne, ale niewielkie, dane genomowe można wykorzystać do analizy zmian w regulacji komórkowych ścieżek sygnałowych (np. metodą Gene Set Enrichment Analysis, GSEA), czego autorzy nie zrobili, a przynajmniej nie opublikowali. Do takiej analizy warto powrócić. Ciekawe, czy wyniki takiej analizy będą spójne z obserwacjami z analiz na poziomie białka? Mogą też wskazać kolejne ścieżki sygnałowe warte dalszej pogłębionej analizy.

Podsumowanie

Po wnikliwym zapoznaniu się z przedstawioną mi do oceny rozprawą stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Należy uznać, że Doktorantka, będąc pierwszym autorem obydwu publikacji, stanowiących podstawę rozprawy, i wykonawcą większości opisanych w nich eksperymentów, oraz współautorką dalszych sześciu publikacji o łącznym IF ponad 16, wykazuje odpowiedni poziom wiedzy oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dlatego, z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie rozprawy mgr Elżbiety Boratyn do publicznej obrony.



Dr hab. Katarzyna Lisowska

Prof. nadzw. w Centrum Onkologii – Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie w Gliwicach