

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 28.09.2015
L.dz. nr 37/2015

Kraków, 23.09.2015



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA

**Pracy doktorskiej mgr Anny Kosteckiej,
doktorantki w Zakładzie Biotechnologii
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Tytuł pracy: "Nowy mechanizm aktywacji białka TAp73 przez inhibitor proteasomu
pochodzenia roślinnego w komórkach nowotworowych"**

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

Nasilona produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) często wywołuje w komórkach aktywację proteasomów, co prowadzi do usuwania utlenionych białek, chroniąc komórki przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego. Również w komórkach nowotworowych, w których produkcja ROS jest często zwiększona w porównaniu do zdrowych tkanek, dochodzi do nasilenia aktywności szlaku związanego z ubiquitynacją białek i ich degradacją w proteasomach. Niektóre białka, w tym tak istotne jak białko p53 mogą ulegać degradacji proteosomalnej bez uprzedniej ubiquitynacji, a mechanizm ich rozpoznawania i proteolizy nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Wydaje się przy tym, że w degradacji białka p53 szczególnie istotną rolę odgrywa prawidłowe funkcjonowanie proteasomu 20S, którego aktywność jest modulowana przez stres oksydacyjny.

Hamowanie aktywności proteasomów uważa się za jedną z możliwych strategii terapeutycznych w leczeniu nowotworów, najbardziej zaawansowaną w przypadku bortezomibu stosowanego w leczeniu szpiczaka mnogiego. Podobną aktywność do bortezomibu wykazuje lakton steroidowy – witaferyna A – uzyskiwany z witanii ospałej (*Withania somnifera*), który hamuje katalityczną podjednostkę β proteasomu 20S. Związek ten działa plejotropowo, hamując również funkcjonowanie czynnika NF κ B i wykazując aktywność antyangiogenną. Może także prowadzić do stabilizacji białka p53. Dokładny mechanizm przeciwnowotworowego działania witaferyny A nie jest jednak poznany.

Zagadnienie to stało się tematem rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kosteckiej. Doktorantka skupiła się na wskazaniu szlaków modyfikowanych przez witaferynę A w komórkach nowotworowych. Prace prowadzone były na komórkach, w których białko p53 nie jest aktywne, czyli w układzie charakterystycznym dla wielu

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621
fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

typów nowotworów. Głównym celem podjętych badań było określenie wpływu witaferyny A oraz witanonu na białko p73, funkcjonalny analog białka p53, który jednak zachowuje aktywność w zdecydowanej większości komórek nowotworowych. Temat był więc nie tylko ciekawy poznawczo, ale dotyczy zagadnienia o możliwym znaczeniu aplikacyjnym, gdyż badany szlak może stać się potencjalnie wartościowym celem terapeutycznym. Doktorantka postawiła sobie za zadanie wskazanie mechanizmu poprzez który laktony pozyskiwane z witanii ospałej wpływają na aktywność białka p73.

Analiza wybranych przez Doktorantkę zagadnień wymagała zastosowania technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej. Były to przede wszystkim analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu (wykonane metodą qRT-PCR) i białka (wykonane metodą western-blot), testy tworzenia kolonii, kolorymetryczne i fluorymetryczne testy żywotności komórek, analizy fluorymetryczne poziomu ROS (z detekcją wykorzystującą cytometrię przepływową), pomiary aktywności kaspaz, czy analiza oddziaływań międzybiałkowych z wykorzystaniem ko-immunoprecypitacji. Metodyka była więc różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań.

Badania przeprowadzone zostały przez Doktorantkę z wykorzystaniem kilku linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy z delecją genu *TP53* oraz linii niedrobnokomórkowego nowotworu płuca. Linie o stabilnie wyciszonej ekspresji TAp73 były liniami transdukowanymi sekwencjami shRNA, wprowadzonymi za pomocą wektorów lentiwirusowych.

Najważniejsze wyniki uzyskane przez Doktorantkę to: i) wykazanie indukcji apoptozy w komórkach z nieaktywnym białkiem p53 hodowanych w obecności witaferyny A.; ii) wykazanie indukcji stresu oksydacyjnego przez witaferynę jako istotnego czynnika prowadzącego do stabilizacji białka TAp73.; iii) wykazanie uwrażliwiającego wpływu TAp73 na efektywność działania cytotoksycznego witaferyny A.; iv) wykazanie znaczenia aktywacji kinazy JNK i białka NQO1 w zwiększaniu stabilności białka TAp73 przez witaferynę A; v) wykazanie wpływu witaferyny A na oddziaływanie TAp73 z ligazą MDM2.; vi) wykazanie odmienności szlaków molekularnych regulowanych przez witaferynę A i witanon.

Rozprawa doktorska mgr Anny Kosteckiej jest zwięzła – liczy 84 strony maszynopisu, w tym 33 rysunki i fotografie oraz 1 tabelę. Cytowane piśmiennictwo to 124 pozycje. Praca zbudowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: Streszczenie, Wstęp z wyodrębnionymi w osobny podrozdział Celami Pracy, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Skrótów, a zakończona Wnioskami oraz spisem cytowanej Literatury. Zarówno kompozycja pracy



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa, a spis treści jest dobrze przygotowany i ułatwia lekturę pracy. Spis skrótów jest natomiast dość ascetyczny, nie obejmuje wszystkich skrótów użytych w pracy (PARP, COX, czy NOXA), ale jest wystarczający dla czytelnika. Wkradł się w nim jedynie błąd dotyczący tłumaczenia skrótu Nrf2 – z reguły tłumaczy się go nie jako "nuclear factor-2" lecz jako "nuclear factor erythroid 2-related factor 2".

Streszczenie jest napisane poprawnie. Oprócz rozbudowanego wstępu dostarcza informacji o najważniejszych uzyskanych wynikach i podsumowuje wysnute na ich podstawie wnioski. Mam jedynie wątpliwość co do zamieszczania w podsumowaniu streszczenia informacji o wiązaniu witaferyny A do podjednostki 20S β proteasomu, gdyż informacja ta nie jest efektem wykonanych badań, lecz wcześniejszych prac – jest więc elementem dyskusji, a nie podsumowania wyników. To jednak uwaga o charakterze stylistycznym, a nie błąd merytoryczny.

Liczący 24 strony Wstęp jest prawidłowo skomponowany, napisany ciekawie i dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Wstęp rozpoczyna się od krótkiego scharakteryzowania białka p53 oraz znacznie bardziej szczegółowego omówienia izoform białka p73 i wzajemnego oddziaływania, regulacji poziomu ekspresji genu oraz znanych mechanizmów stabilizacji i degradacji białka p73. Doktorantka omawia również funkcje białka p73 oraz możliwe wykorzystanie jego aktywnych izoform jako celu molekularnego w terapiach przeciwnowotworowych. Końcowa część wstępu zawiera krótką charakterystykę laktonów izolowanych z witanii ospałej, z podkreśleniem ich potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych.

Doktorantka posługuje się poprawnym językiem i stylem, dzięki czemu opisy szlaków transdukcji sygnału są czytelne i zrozumiałe. Dobry i jasny jest zwłaszcza opis struktury i funkcji białka p73. Bardzo pomocne jest również zamieszczenie schematów (choć opis schematu na przedstawionego na rycinie 5 nie jest dla mnie w pełni jasny – dobrze byłoby opisać stosowane symbole – przekreślone kółko mogłoby sugerować brak wpływu, ale nie jest to spójne z opisem w legendzie). Poza krótkimi fragmentami Autorce udaje się unikać stylu "leksykalnego" polegającego na wymienieniu kolejnych czynników i ich krótkiej, niepowiązanej z resztą tekstu charakterystyce. Cały wstęp tworzy logiczną całość i uzasadnia celowość podjętych prac.

Niektóre sformułowania budzą wątpliwości, głównie natury stylistycznej, np.:
- str. 8: informacja o pochodzeniu genu TP53 od zduplikowanego genu hybrydowego P63/P73 jest ciekawa, ale stwierdzenie że gen ten jest/był obecny "u przodków dzisiejszych przedstawicieli wiciowców i ukwiałów" jest bardzo nieprecyzyjne.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Cytowana publikacja (Belyi et al. 2010) omawia ewolucję genu p53, wskazując na pojedynczy gen p63/p73-like wykrywany już u ukwiałów oraz precyzując, że do duplikacji genu doszło u ryb chrzęstnoszkieletowych. Począwszy od ryb kostnoszkieletowych obecne są w genomie wszystkie trzy geny: p53, p63 i p73 (dzięki powtarznej duplikacji). Ich funkcje dywersyfikują się w trakcie ewolucji.

- str. 13: informacja o hamowaniu przez białko ZEB ekspresji izoform TAp73 "w komórkach niezróżnicowanych" jest mało precyzyjna. Lepiej byłoby podać o jakie komórki chodzi.

- str. 19: korzystne byłoby nieco dokładniejsze wyjaśnienie lub próba interpretacji informacji o braku wpływu utraty dwóch alleli p73 na predyspozycję do rozwoju nowotworów przy jednoczesnym zwiększeniu takiej predyspozycji u zwierząt z aktywnym jednym allelem. Czy wynikało to z krótszego czasu życia/maskujących wad rozwojowych zwierząt p73-/- czy też z mechanizmów kompensacyjnych?

- Byłoby również ciekawe dokładniejsze skomentowanie informacji o akumulacji komórek traktowanych witaferyną A w fazie G2/M [str. 26], w świetle wcześniej omawianej pracy, wskazującej na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/S w wyniku akumulacji białka p73 [str. 14]. Warto byłoby to przedyskutować biorąc pod uwagę opisaną przez Autorkę zależność między witaferyną A, a stabilizacją białka p73.

- str. 23: określenie "kietkowanie naczyń śródbłonka" choć malownicze nie odpowiada jednak rzeczywistości, gdyż to śródbłonek jest naczyniowy, a nie naczynia śródbłonkowe. To jednak po prostu błąd stylistyczny, bez wpływu na meritum.

Takich drobnych niezręczności stylistycznych jest nieco więcej (np. "idąc tym tropem, reaktywacja białka p53 [...] może skutkować..."), mam też wątpliwości co do poprawności gramatycznej niektórych zwrotów – są to jednak uwagi o znaczeniu marginalnym i w znacznej mierze subiektywne. W sumie Wstęp napisany ciekawie i prawidłowo, a dobór treści i sposób omawiania zagadnień potwierdzają dobrą orientację Doktorantki w tematyce badań.

Cel pracy określony jest jednym zdaniem, bez dodatkowych uzasadnień, ale jednoznacznie i wystarczająco.

Doktorantka na 8 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są prawidłowe i w zasadzie wystarczające do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Mam jedynie wątpliwości co do opisu analizy statystycznej. W pracy, w części pokazywanych doświadczeń badana jest dawkozależność, czyli porównywanych jest kilka grup doświadczalnych. W takim przypadku powinna zostać zastosowana ANOVA, a nie test t studenta.

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wyniki (zajmujące 26 stron) stanowią najdłuższy rozdział pracy. Są one logicznie ułożone, jasno opisane i zilustrowane wykresami oraz zdjęciami. Legendy rycin są moim zdaniem wystarczająco dokładne, dobrym pomysłem jest podawanie informacji o liczbie przeprowadzonych doświadczeń. Co istotne, praca jest nastawiona na badanie mechanizmów molekularnych obserwowanych efektów, badania prowadzone są konsekwentnie, a konkluzje mają podbudowę doświadczalną. Niedociągnięciem w tej części pracy jest brak precyzji w opisie parametrów mierzonych przez poszczególne testy w badaniach *in vitro* oraz brak niektórych kontroli. Dobrze opisane są natomiast badania nad stabilizacją białka p73 oraz rolą kinaz i NQO. Generalnie, praca byłaby jednak znacznie pełniejsza, gdyby porównywała wyniki uzyskane na liniach z nieaktywnym oraz aktywnym białkiem p53, a przede wszystkim na liniach nowotworowych i nienowotworowych. Opis wyników nasuwa mi kilka pytań i sugestii:

- Str. 40, Ryc. 6 i str. 41, Ryc. 7: Opis testu jest moim zdaniem nieprecyzyjny. Doktorantka wymiennie używa nazwy "przeżywalność" i "proliferaacja" – to odmienne parametry. Test WST-1 (wbrew opisowi producenta) nie jest testem mierzącym proliferację. Jest raczej miarą liczebności żywych komórek – może być pośrednim wskaźnikiem proliferacji, ale w rzeczywistości jest wypadkową proliferacji i żywotności. Lepiej byłoby stosować bardziej precyzyjny opis lub wykorzystać bardziej precyzyjne testy.
- Ryc. 8, Ryc. 11: Barwienie komórek fioletem krystalicznym również nie jest testem specyficznym mierzącym proliferację. Sądzę także, że lepiej byłoby oprócz reprezentatywnych zdjęć zaprezentować dane ilościowe. Przy ryc. 11: czy "hamowanie proliferacji w sposób zależny od aktywności kaspaz" nie jest raczej indukcją apoptozy? Barwienie fioletem krystalicznym w tym układzie nie rozróżni tych dwóch zjawisk, gdyż da jedynie informację o liczbie komórek.
- Ryc. 6, Ryc. 7, Ryc. 10, Ryc. 12, Ryc. 15: Na rysunkach brakuje oznaczeń istotności statystycznej. Wartości średniej i odchyłeń sugerują, że różnice są istotne – powinny więc być oznaczone. Jeśli różnice nie były istotne lub nie wykazywały przynajmniej tendencji ($p < 0.1$), to wyniki powinny być interpretowane jako nie wykazujące wpływu badanych czynników.
- Ryc. 10: Na wykresie powinny być również pokazane wartości uzyskane dla komórek kontrolnych, hodowanych bez stymulacji witaferyną A. Czyba, że wykres pokazuje indukcję kaspaz w stosunku do komórek kontrolnych?
- Str. 45 i Ryc. 13: Autorka pisze, że analiza western-blot pozwoliła zaobserwować, że witaferyna A stabilizuje białko PUMA. W jaki sposób rozróżniana była stabilizacja

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

białka od wzrostu ekspresji? Oba procesy mogą prowadzić do wzrostu poziomu białka obserwowanego na western-blocie.

- Str. 51, Ryc. 17. Różnica między wpływem witaferyny A na komórki z p73 oraz z wyciszonym p73, choć statycznie istotna – jest niewielka. Znacząca jest natomiast w przypadku komórek traktowanych cisplatiną. Czy świadczy to o roli p73 głównie w działaniu cisplatyny i w znacznie mniejszym stopniu w działaniu witaferyny A? Jak Autorka interpretuje te dane?

- Str. 52, Ryc. 18: Jakie barwienie przedstawiają zdjęcia? Informacja powinna być w legendzie. Lepszym rozwiązaniem byłby również wzbogacenie zdjęć w dane ilościowe. Efekt wyciszenia p73 na wrażliwość na witaferynę A wydaje się znacznie silniejszy niż wynikałoby z Ryc. 17 (zwłaszcza dla stężenia 0.5 μ M). Jak Autorka może skomentować te dane?

- Str. 54, Ryc. 21: Skoro badania odnoszą się głównie do indukcji apoptozy, jakie było uzasadnienie do wykonywania barwień jodkiem propydydy? Czy nie lepsze byłoby np. barwienie aneksyną-V lub wykonanie testu TUNEL? W jaki sposób wykonywana była normalizacja do kontroli? Czy nie lepiej było przedstawić jaki procent komórek był wybarwiony w komórkach kontrolnych i komórkach traktowanych witaferyną A?

- Str. 41: Autorka wspomina o doniesieniach potwierdzających działanie witaferyny na wzrost guzów w modelach *in vivo*. Zdanie to (stylistyczne nieco niezręczne) powinno być zakończone cytowaniem odpowiedniej publikacji. Podobnie cytowana powinna być praca źródłowa na str. 44 po zdaniu informującym o doniesieniach na temat indukcji PUMA i NOXA w odpowiedzi na stres i obecności p53-RE w ich promotorach.

Dyskusja, obejmuje jedynie 6 stron, jest więc napisana oszczędnie i skupia się przede wszystkim na podsumowaniu uzyskanych wyników i krótkim omówieniu roli stresu oksydacyjnego i enzymów antyoksydacyjnych w promowaniu rozwoju nowotworów. Wnioski wysuwane są ostrożnie, w każdym razie Doktorantka pisze o sugestiach i wskazówkach a nie o dowodach wynikających z przeprowadzonych badań. Świadczy to o rzetelności badawczej i zasługuje na uznanie. Dyskusja nasunęła mi kilka uwag i sugestii:

- Warto byłoby dokładniej przedyskutować selektywność działania witaferyny na komórki nowotworowe. Szkoda, że Doktorantka nie zdecydowała się zamieścić wyników badań z linii nienowotworowych – choćby z fibroblastów – w prezentowanej pracy. Porównanie wpływu na kolejne etapy działania witaferyny A pomogłoby zrozumieć rzeczywiste podstawy różnic.

- Warto byłoby również nieco bliżej odnieść się do udziału kinaz p38 w obserwowanych zjawiskach. W zastosowanym układzie badawczym Doktorantka



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbrn>

używała inhibitora SB203580. Inhibitor ten hamuje izoformę p38 α i p38 β , ale nie wpływa na aktywność pozostałych izoform.

- Interesująca byłaby próba przedyskutowania różnic/przyczyn ich występowania w sposobie działania witaferyny A i witanonu.

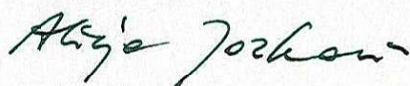
- Akapit na str. 67 poświęcony roli Nrf2 w karcinogenezie jest niejasny – pierwsze jego zdanie dotyczy myszy Nrf2 KO, bez informacji jakie konkretnie wyniki na nich uzyskano, kolejne zdanie wspomina o wynikach, ale odnosi się do zwierząt z aktywnym genem kodującym Nrf2. Temat moim zdaniem zasługuje na dokładniejsze omówienie, gdyż w obecnej wersji ten fragment tekstu może być mylący.

Wnioski wyodrębnione w osobny podrozdział stanowią listę najważniejszych obserwacji poczynionych w trakcie realizacji pracy. Są one jasno sformułowane i mają potwierdzenie w wynikach doświadczeń.

Praca pod względem edytorskim przygotowana jest starannie, błędy literowe czy edytorskie są nieliczne. Niezręczności stylistyczne i błędy gramatyczne są niewielkie (np. używanie nazw oksygenazy hemowej-1 w trzech wersjach jako oksygenazy hemowej, oksydazy hemowej, lub oksygenazy hemu 1 – jest najprawdopodobniej błędem edytorskim a nie merytorycznych – choć oksygenazy i oksydazy to odmienne grupy enzymów). Drobne niedociągnięcia edytorskie nie wpływają na jakość merytoryczną pracy.

Podsumowując, badania wykonane przez Doktorantkę dotyczą ciekawego tematu, a wykonane zostały z wykorzystaniem prawidłowo dobranych metod, choć opis parametrów mierzonych w poszczególnych testach nie zawsze jest precyzyjny. Badania dostarczają nowych informacji dotyczących wpływu witaferyny A na białko p73 i rolę tego oddziaływania w potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej laktonu. Uważam, że Pani mgr Anna Kostecka zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi rozprawy doktorskiej. W związku z tym proszę wysoką Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Anny Kosteckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>