



Warszawa, 2015-10-18

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kosteckiej p.t. „Nowy mechanizm aktywacji białka Tap73 przez inhibitor proteasomu pochodzenia roślinnego w komórkach nowotworowych”

Celem przedstawionej mi do oceny pracy było zbadanie mechanizmu aktywacji białka TAp53 przez witaferynę A, związek pochodzenia roślinnego o wielokierunkowym działaniu na komórki. Modelem badawczym wybranym przez doktorantkę były dwie linie komórkowe nie wytwarzające białka p53 – HCT116^{TP53-/-} oraz H1299. Komórki te inkubowane były z badanymi związkami, a analiza fenotypu oceniana była przy użyciu standardowych metod biologii molekularnej i komórkowej.

We wstępie Doktorantka szczegółowo opisała budowę i funkcje białek należących do rodziny p53, regulację ekspresji genów kodujących te białka oraz zarys terapii przeciwnowotworowych polegających na modulowaniu aktywności TAp73. W końcowej części wstępu opisane zostały witanolidy wykorzystane w pracy. Warto podkreślić, że witaferyna A, która była głównym witanolidem badanym w pracy, jest związkiem o szerokim spektrum aktywności biologicznych, a co za tym idzie - niewielkiej selektywności. Oddziałuje między innymi z tak różnorodnymi białkami komórkowymi, jak wimentyna, białka mitochondrialnego kompleksu III, kinaza JAK2, czynnik transkrypcyjny STAT3, NF-κB, receptor androgenowy Par-4, proteasom, peroksyredoksyny i wiele innych.

Doktorantka przeprowadziła bardzo dużą liczbę doświadczeń, których rezultatem jest przedstawiony mechanizm działania witaferyny A, polegający na indukcji stresu oksydacyjnego, prowadzącego do aktywacji kinazy JNK, a następnie fosforylacji i aktywacji białka TAp73. Ponadto, w wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do gromadzenia się w komórce białek NQO1, które tworząc kompleks z TAp73, chronią ten kompleks przed degradacją w proteasomach. Większość doświadczeń przeprowadzonych zostało prawidłowo i wyciągnięto z nich prawidłowe wnioski. Niemniej niektóre doświadczenia zostały zinterpretowane niepoprawnie (lub nie przedstawiono w rozprawie wystarczającego opisu warunków tych doświadczeń) i wśród wniosków z pracy znajdują się takie, które nie znajdują potwierdzenia w rozprawie doktorskiej.

Doktorantka niespójnie i nieprawidłowo opisuje zjawiska mierzone testem WTS-1. Test ten służy do względnego pomiaru liczby komórek, na przykład w hodowli. Liczba komórek jest wypadkową ich proliferacji i śmierci. Na wynik wpływ ma również aktywność metaboliczna komórek. Doktorantka niespójnie opisuje oszczędność na rys. 7 jako przeżywalność komórek, ale w tekście i w opisie rysunku pisze, że wykres przedstawia proliferację. Nie są to zjawiska tożsame. W rzeczywistości test WTS-1 jest najczęściej miarą działania cytostatycznego/cytotoksycznego i tak powinien być przedstawiany w rozprawie.

Na rys. 10, oszczędność opisana jest jako „% aktywności kaspaz”. Nie wiadomo co to oznacza. Ponieważ na wykresie nie pokazano kontroli, to można zakładać, że stanowi ona 100%. Jeśli tak jest, to Doktorantka wyciąga błędne wnioski. Domyślać się jedynie mogę, że wykres przedstawia odsetek komórek, które wybarwiły się FAM-VAD-FMK. Niemniej nadal brakuje kontroli.

Na str. 45 Doktorantka opisuje, że witaferyna A stabilizuje białko PUMA. Nie bardzo wiadomo, co ma na myśli. Stabilizacja jest zazwyczaj zjawiskiem związanym z zahamowaniem degradacji. Degradacja białka PUMA nie była badana w pracy, więc wniosek jest nieprawidłowy. Być może jest to stabilizacja, ale jeszcze bardziej prawdopodobne wydaje się, że jest to nasilenie ekspresji genu kodującego białko PUMA.

W opisie do rys. 14 (oraz w wielu innych miejscach w rozprawie) Doktorantka stwierdza, że witaferyna A „promuje stres oksydacyjny”. Wykres przedstawia jednak barwienie DCFDA, który umożliwia pomiar względnego stężenia reaktywnych form tlenu w komórce i nie jest miarą stresu oksydacyjnego. Mimo wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu, w komórce nadal może nie



dochodzić do stresu oksydacyjnego ze względu na obecność i aktywność mechanizmów cytoprotekcyjnych. Innymi słowy wzrost stężenia np. H_2O_2 (użytego jako kontrola pozytywna barwienia) nie oznacza stresu oksydacyjnego.

Na str. 49 Doktorantka stwierdza, że „Zastosowanie NAC powoduje neutralizację wolnych rodników [...] zapobiega zahamowaniu wzrostu komórek przez WA”. Niestety nie można wyciągnąć takiego wniosku, bowiem w pracy nie badany był wzrost (ani działanie cytostatyczne/cytotoksyczne) witaferyny w obecności NAC.

Mój niepokój budzą doświadczenia, w których wyciszano ekspresję TAp73 przy użyciu shRNA. Na rys. 17 Doktorantka przedstawia wyniki doświadczeń przeprowadzonych przy użyciu komórek z ‘wyciszoną’ ekspresją TAp73, które otrzymała dzięki uprzejmości dr M. Wilhelm. W rozprawie nie pokazano jednak, czy po zastosowaniu shRNA rzeczywiście dochodzi do zmniejszenia ilości tego białka w komórkach. Próbowalem odnaleźć taką informację w publikacji w Cell Death and Disease, w której znajdują się wyniki Doktorantki, ale w publikacji tej wyniki są niestety dość niepokojące - Rycina 3e przedstawia wyniki ‘wyciszenia’ TAp53 przy użyciu shRNA, ale nieoczekiwanie w komórkach tych jest więcej TAp73 niż w komórkach kontrolnych (pusty wektor). Jak zatem interpretować wyniki na rys. 17? Wniosek jest odwrotny do przedstawionego w rozprawie.

W dyskusji, na str. 69 Doktorantka stwierdza, że inhibitor kinazy JNK zapobiega zahamowaniu proliferacji komórek przez witaferynę A. W rozprawie nie pokazano jednak żadnych wyników doświadczeń, w których badany byłby wpływ inhibitora kinazy JNK na to zjawisko.

Dyskusja pisana jest w kontekście terapii celowanych. Za takową trudno uznać stosowanie witaferyny A, która, jak już napisałem, jest bardzo nieselektywnym inhibitorem licznych białek strukturalnych komórki, receptorów, enzymów, kinaz i czynników transkrypcyjnych.

Spośród 11 wniosków przedstawionych na końcu rozprawy, dwóch Doktorantka nie ma podstaw do sformułowania na podstawie zawartych w dysertacji wyników:

Wniosek 7 – „WA blokuje aktywność proteasomów, co przyczynia się do stabilizacji białka TAp73” – w pracy nie badana była aktywność proteasomów, więc wniosek ten jest nieuprawniony. Badane było jedynie gromadzenie ubikwitynowanych białek, co może ale nie musi wynikać z zahamowania proteasomów

Wniosek 11 – „Witaferyna A stabilizuje białko TAp73 przez aktywację stresu oksydacyjnego oraz zahamowanie proteolizy” – wniosek nieprawidłowy, a uzasadnienie już przedstawiłem w niniejszej ocenie.

Inne uwagi:

Praca w wielu miejscach jest napisana żargonem. Doktorantka używa nie tylko spolszczonych wyrazów pochodzących z języka angielskiego, ale również popełnia liczne błędy językowe, wynikające najprawdopodobniej z próby bezpośredniego tłumaczenia tekstu z tego języka.

Przykłady:

- „komórki umierają na drodze apoptozy” – komórki umierają w procesie apoptozy
- „sygnalizacja śmierci komórki”
- „spadek poziomu transkryptu genu” – szkoda, że nie podano z jakiej wysokości
- „przyjrano się poziomom ekspresji”
- „traktowanie komórek [np. witaferyną]” – komórki inkubowane są ze związkiem
- komórki są rzeczownikiem policzalnym, więc opisując je mówimy o liczbie wysianych komórek, a nie o ilości
- „owocuje śmiercią na drodze apoptozy”
- na str. 41 niezrozumiałe jest zdanie – „działanie WA na wzrost komórek w linii komórek nowotworowych”



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

- na str. 52 Doktorantka stwierdza, iż „Observacje mikroskopowe obrazują, że zastosowanie WA prowadzi do znacznego zahamowania proliferacji”. Z przykrością stwierdzam, że taka obserwacja nie jest możliwa przy wykorzystaniu zastosowanej techniki badawczej.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa, mimo wymienionych powyżej uwag, jest dość dobra. Doktorantka przeprowadziła i opisała w rozprawie bardzo dużą liczbę doświadczeń i wykorzystywała różnorodne metody badawcze. Wyniki większości doświadczeń są spójne i przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów działania witaferyny A. Większość wniosków jest prawidłowych. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w Ustawie z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym. Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje artykuły opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, co uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Wnoszę niniejszym do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani mgr Anny Kosteckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Immunologii C.B.
prof. dr hab. med. Jakub Gołąb