

Poznań, 12.06.2022



**INSTITUTE
OF HUMAN GENETICS**
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Strzeszyńska 32
60-479 Poznań, Poland

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

dr hab. Natalia Rozwadowska, prof. IGC PAN
Kierownik Zakładu Patologii Molekularnej

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna białek transbłonowych 72 i 207 oraz ich deregulacja w raku jasnokomórkowym nerki” autorstwa Pani mgr inż. Natalii Pstrąg

Praca doktorska autorstwa Pani mgr Natalii Pstrąg została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Wesoty oraz prof. dr hab. Valentyny Boeva. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim i jest afiliowana do Laboratorium Technologii Wysokoprzepustowych Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Rak nerkowokomórkowy (RCC) stanowi 2–3% nowotworów złośliwych, a jego największą częstość występowania odnotowuje się w krajach wysokorozwiniętych. Według Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) co roku w Polsce diagnozowanych jest ponad 3 tys. nowych przypadków RCC, przy czym rokowania pacjentów są ściśle powiązane ze stopniem zaawansowania nowotworu (klasy I–IV), co przekłada się na 5 letnie ich przeżycie i waha się od 80% w stadium I do poniżej 10% w stadium IV. Terapia nowotworów nerki jest oparta na radykalnej nefrektomii lub zabiegu oszczędzającym, włączając również metody endoskopowe. Wprowadzenie leków terapii celowanej pozwoliło na zastosowanie w RCC inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych, inhibitorów kinazy serynowo-treoninowej mTOR oraz przeciwciała monoklonalnego anty-VEGF, co zwiększyło sukces terapeutyczny. W terapii zaawansowanych RCC stosowane są także inhibitory tzw. *immune-check points* – przeciwciała anty PD-1 i anty PD-L1, które reaktywują uśpiony przez działanie nowotworu układ odpornościowy pacjenta. Podstawowym problemem pozostaje niska wykrywalność RCC w początkowych stadiach choroby, ponieważ bardzo często obecność nowotworu nerki jest bezobjawowa, a diagnoza przypadkowa przy okazji badań obrazowych zleconych z innych wskazań. Tzw. triada (krwiomocz, ból i wyczuwalny guz) jest charakterystyczna

tylko dla 7-15% pacjentów w zaawansowanym stadium choroby. Zatem zrozumienie podstaw molekularnych rozwoju tego nowotworu, a także znalezienie nowych biomarkerów związanych z nowotworzeniem i progresją choroby jest kluczowym elementem niezbędnym dla pacjentów.

Punktem wyjścia do eksperymentów przeprowadzonych w pracy doktorskiej były badania prowadzone przez promotorkę pracy prof. dr hab. Joannę Wesotę dotyczące poszukiwań metodami wysokoprzepustowymi (mikromacierze ekspresyjne) ścieżek i czynników zaangażowanych w patologię RCC wraz z ich walidacją i predykcją (E.Zodro et al. 2014 oraz Wrzesinski et al. 2015).

Celem przedstawionej do oceny rozprawy była pogłębiona analiza dwóch białek z rodziny TMEM – TMEM72 oraz TMEM207, zawierająca zarówno analizę ekspresji alternatywnych transkryptów w tkance guza, jak i wieloczynnikową ocenę lokalizacji oraz orientacji analizowanych białek w błonach komórkowych. Podjęta została próba zdefiniowania ich funkcji poprzez analizy transkryptomu w liniach z wprowadzoną nadekspresją oraz bioinformatyczne analizy oceniające status immunologiczny ccRCC w odniesieniu do białek TMEM. Doktorantka dokonała także predykcji potencjalnych patomechanizmów RCC, w których analizowane białka TMEM mogą mieć swój udział.

Przedstawiona do oceny praca stanowi bardzo szerokie opracowanie liczące sobie 328 stron maszynopisu i jest tradycyjnie skonstruowana z wyodrębnionymi rozdziałami: *Wstęp*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Wnioski* oraz *Dyskusja*. Praca zawiera także *Streszczenie*, zdefiniowany *Cel pracy*, bardzo obszerny *Aneks* liczący blisko 200 stron, a także *Przyszłe plany badawcze* oraz stosowne *Spisy: literatury, treści, stosowanych skrótów, rycin i tabel*.

Mgr Pstrąg we *Wstępie* wprowadza czytelników w tematykę nowotworów nerki, poruszając wszystkie niezbędne aspekty takie jak: klasyfikacja nowotworów, ich epidemiologia, a także podłoże molekularne ich powstawania. Następnie doktorantka skupia się na przedstawieniu roli białek transbłonowych w nowotworach, podkreślając ich znaczenie dla diagnostyki, ale także terapii celowanej nowotworów np. przy pomocy przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko tego typu białkom (np. receptorom). Argumentuje także wybór dwóch białek TMEM tj. TMEM207 oraz TMEM72 do szczegółowej analizy przeprowadzonej w pracy doktorskiej. Autorka podejmuje się również przedstawienia klasyfikacji białek błonowych zarówno w aspekcie ich struktury hierarchicznej (I-, II-, III- i IV-rzędowej), jak i ich podziału ze względu na budowę i charakter zakotwiczenia w błonie komórkowej. Bardzo dobrym uzupełnieniem i rozdziałem kończącym wstęp jest krótkie wprowadzenie czytelnika w tematykę mikrośrodowiska guzów litych ze szczególnym uwzględnieniem immunologicznej perspektywy i odniesienia do predykcji bioinformatycznych przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Informacje zawarte w rozdziale *Materiały i metody* są przedstawione w sposób szczegółowy, a ich rozwinięcie zostało umieszczone także w *Aneksie*. Metodologiczna strona

dysertacji jest jej zdecydowanym atutem. Autorka bardzo biegle postępuje się technikami molekularnymi, projektując odpowiednie do zaplanowanych badań konstrukcje genetyczne, czy przeprowadza weryfikacje obecności transkryptów *TMEM72_ORF1* i *TMEM_ORF2* w materiale klinicznym. Zastosowane zaawansowane techniki mikroskopii konfokalnej, włączając FRAP czy FPP, pozwoliły na precyzyjne określenie lokalizacji i orientacji badanych białek. Bardzo ważnym elementem pracy są przeprowadzone przez doktorantkę analizy bioinformatyczne, które bezsprzecznie stanowią doskonałe uzupełnienie i poszerzenie przeprowadzonych w laboratorium badań.

Wyniki badań są szczegółowo opisane i bogato zilustrowane rycinami. Ich układ odpowiada postawionym celom i prowadzi czytelnika przez pracę, stanowiąc dowód na dojrzałość doktorantki w podążaniu za skutkowo-przyczynowym układem eksperymentów. Po dokładnym scharakteryzowaniu modelu badawczego (linie komórkowe z nadekspresją wariantów *TMEM72* oraz *TMEM207*) doktorantka przechodzi do omawiania wyników realizacji pierwszego celu i pokazuje uzyskany rozkład wariantów transkryptów genu *TMEM72* dla tkanki prawidłowej i nowotworowej nerki, dodatkowo posilując się wizualizacjami danych opublikowanych w TCGA. Kolejny etap predykcji struktury białek zaproponował model zakotwiczenia białek *TMEM207* oraz *TMEM72_ORF1* w błonie, a dla wariantu *TMEM72_ORF2* zasugerował brak domen transbłonowych. Wyniki predykcji zostały wykorzystane do precyzyjnego zaplanowania kolejnych eksperymentów *in vitro* na modelach komórkowych. Analiza FRAP potwierdziła osadzenie białek *TMEM207* oraz wariantu *ORF1* genu *TMEM72* w błonie, a dynamika dyfuzji białka *TMEM72_ORF2* była spójna z kontrolnym białkiem GFP niezakotwiczonym w błonie. Zastosowanie panelu barwników identyfikujących poszczególne kompartmenty i struktury komórkowe umożliwiło dokładną lokalizację badanych białek w komórkach. Analiza wykazała, iż obydwa transbłonowe białka kolokalizują ze strukturami wczesnych endosomów. Dla kompletności wyników warto było umieścić w pracy również wyniki uzyskane dla pozostałych barwników (aparat Golgiego, siateczka endoplazmatyczna oraz mitochondria). Kolejne zaawansowane techniki mikroskopowe wykorzystujące sekwencyjnie stosowane proteazy pozwoliły na weryfikację orientacji osadzenia białek *TMEM207* oraz *TMEM72_ORF1* w błonach i potwierdziły, iż białko *TMEM72_ORF2* nie jest białkiem transbłonowym.

Analiza zmian transkryptomu pod wpływem wprowadzania ektopowej ekspresji *TMEM207* oraz *TMEM72_ORF1* w komórkach pozwoliła zaproponować szlaki sygnałowe i metaboliczne, w których oba białka mogą być zaangażowane. Jednakże bez potwierdzenia przy pomocy innej techniki obserwowanych zmian (np. qPCR) na razie muszą one być traktowane jako wyniki wstępne.

Bardzo ciekawym elementem pracy jest próba predykcji i korelacji infiltracji komórek układu immunologicznego, w tym limfocytów T regulatorowych w tkankach RCC i prawidłowych z

ekspresją badanych białek. Udział komponenty immunologicznej zdecydowanie wpływa na rokowania pacjentów, ale także może stanowić przesłanki do zastosowania odpowiedniej immunoterapii. Jeżeli kolejne badania *in vitro* potwierdzą zaangażowanie białka TMEM72 w rekrutację Treg i w wyniku obniżenia swojej ekspresji tworzenie immunosupresyjnego środowiska guza może ono stanowić bardzo interesujące białko z punktu widzenia potencjalnej terapii.

Z obowiązku recenzenta, pomimo mojej bardzo dobrej oceny całości pracy, pozwolę sobie na niewielkie uwagi krytyczne i prośbę o wyjaśnienie kilku kwestii.

We *Wstępie* w rozdziale dotyczącym białek błonowych Autorka na str. 24 pisząc o różnych sposobach powiązania białek z błonami (białek integralnych i peryferyjnych) odnosi czytelnika do Ryc. 5, która obrazuje raczej wycinek podziału białek transbłonowych. Wydaje się, że ze względu na złożoność systemu klasyfikacji białek błonowych rycina przedstawiająca wszystkie aspekty tego podziału w bardziej kompleksowy sposób byłaby bardziej przydatna.

Jako że większość doświadczeń była oparta na przejściowej nadekspresji badanych białek, wydaje się stosowne by wydajność ekspresji na postawie obecności GFP oceniać również przy pomocy cytometrii przepływowej, a nie wyłącznie na podstawie obrazów mikroskopowych. Taka ocena pomogłaby wystandaryzować wyniki szczególnie w aspekcie badań transkryptomu i być może przyczynić się do zwiększenia ich spójności.

Kolejne pytanie dotyczy metodologii oznaczenia ekspresji wariantów transkrypcyjnych genu *TMEM72* (ORF1 oraz ORF2). Dobrą praktyką przy zastosowaniu barwnika SYBR Green do ilościowej oceny ekspresji jest prezentacja również krzywych topnienia produktów i/lub wizualizacja produktów PCR na żelu agarozowym. Czy zastosowany algorytm przeliczania udziału poszczególnych transkryptów brał pod uwagę wydajność poszczególnych par starterów? Jaką metodę zastosowano do normalizacji i czy fakt, iż startery oceniające ekspresję *TMEM72* bez rozróżnienia na transkrypty (*TMEM total*) prowadziły do uzyskania produktów różnej długości odpowiednio ORF1 (202pz) i ORF2 (135pz) były uwzględnione w kalkulacjach? Rycina 17 obrazująca wyniki nie jest w pełni informatywna. Wydaje się, że umieszczenie także oceny poziomu ekspresji (guz vs tkanka zdrowa) w analizowanych przez doktorantkę próbach, a nie tylko % udziału transkryptów, pokazałoby pełen obraz.

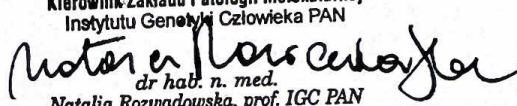
Ciekawi mnie również jak doktorantka wyjaśni rozbieżności pomiędzy predykcjami dotyczącymi liczby domen transbłonowych dla białka TMEM27_ORF1 przewidzianych przez analizy *in silico* (4 domeny) z wynikami uzyskanymi *in vitro* przy zastosowaniu oceny metodą FPP (ang. *Fluorescence Protease Protection Assay*).

Ostatnim zagadnieniem, które chciałabym przedyskutować z mgr Natalią Pstrąg jest pochodzenie komórkowe RCC, które zostały wzięte do analizy w aspekcie oceny ekspresji i selekcji

genów *TMEM* do szczegółowych badań. Jak podaje Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) transkrypty dla genów *TMEM207* oraz *TMEM72* ulegają ekspresji jedynie w komórkach nabłonkowych dystalnych części kanalików nerkowych. Czy doktorantka mogłaby odnieść się w dyskusji do poziomu ekspresji tych genów w tkankach nowotworowych uzyskanych od pacjentów w aspekcie linii komórkowej, z której badane guzy się wywodzą?

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska potwierdza wiedzę mgr Natalii Pstrąg potężoną z wyjątkowymi zdolnościami technicznymi i umiejętnością przedstawienia, analizy wyników i dyskusji uzyskanych wyników. Nowe informacje dotyczące biologicznych właściwości i predykcja potencjalnej funkcji *TMEM72* oraz *TMEM207* dotąd nie opisanych w literaturze tematu stanowią doskonały punkt wyjścia do kolejnych badań. Zawarte w treści recenzji uwagi stanowią jedynie podstawę do dalszej dyskusji naukowej podczas obrony pracy.

W świetle powyższych danych stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Natalii Pstrąg spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2017 poz. 1789). Tym samym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Natalii Pstrąg do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Zakładu Patologii Molekularnej
Instytutu Genetyki Człowieka PAN

dr hab. n. med.
Natalia Rozwadowska, prof. IGC PAN