



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Komórki

Kierownik

prof. dr hab. Joanna Bereta

Recenzja osiągnięcia naukowego pt. „Regulacja i znaczenie zmian w proteomie komórek przewlekłej białaczki szpikowej w progresji nowotworu i oporności na terapię w mikrośrodowisku szpiku” oraz dorobku naukowego w postępowaniu habilitacyjnym pani dr Pauliny Podszywałow-Bartnickiej

Wykształcenie oraz przebieg pracy naukowej i zawodowej Habilitantki

Pani dr Paulina Podszywałow-Bartnicka ukończyła studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w 2003 r. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskała w 2009 r. po obronie rozprawy „Udział izoform aneksyny A6 w regulacji zależnego od Ca^{2+} wydzielania katecholamin” przygotowanej w Pracowni Biochemii Lipidów Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Sławomira Pikuty. Po obronie kontynuowała pracę w Instytucie Biologii Doświadczalnej, ale w Pracowni Cytometrii, najpierw jako asystent na stażu podoktorskim, a od 2015 roku do dzisiaj jako adiunkt.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora odbyła szereg krótko- i długoterminowych staży naukowych m.in. na Uniwersytecie w Leicester w Wielkiej Brytanii (2 miesiące, 2011), na Uniwersytecie Temple w Filadelfii (trzy pobyty po 3 miesiące, 2014-17), dziewięciodniowy staż w Szpitalu Uniwersyteckim w Bonn (2018), 10-miesięczny (2022/2023) oraz dwuletni staż na Uniwersytecie Yale w New Haven, (2023-2025). Wyjazdy były możliwe dzięki uzyskiwanym przez dr Podszywałow-Bartnicką stypendiom: BIO-IMAGINE (Siódmy Program Ramowy Unii Europejskiej), stypendium Fundacji Kościuszkowskiej i stypendium Fundacji Fulbrighta. Podczas staży poszerzała warsztat badawczy (np. zdobyła doświadczenie w izolacji ludzkich komórek mezenchymalnych podścieliska szpiku kostnego) i prowadziła badania proteomiczne i transkryptomyczne komórek białaczkowych. **Habilitanka spełnia więc z nawiązką ustawowy wymóg aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.**

Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe „Regulacja i znaczenie zmian w proteomie komórek przewlekłej białaczki szpikowej w progresji nowotworu i oporności na terapię w mikrośrodowisku szpiku” **to cykl powiązanych tematycznie publikacji.** W jego skład wchodzi siedem artykułów doświadczalnych i jeden przeglądowy, opublikowanych w latach 2014 – 2024.

W czterech z nich pani dr Podszywałow-Bartnicka jest pierwszą autorką, w dwóch – drugą (w jednej z nich pierwszą autorką jest doktorantka pracująca pod jej bezpośrednią opieką), w najnowszej

publikacji eksperymentalnej – autorką korespondencyjną i w artykule przeglądowym – współautorką korespondencyjną. We wszystkich publikacjach Habilitantka miała wiodący lub bardzo duży udział, szczegółowo opisany zarówno w Autoreferacie, jak i w Wykazie osiągnięć naukowych. Zakres pracy Habilitantki przy poszczególnych publikacjach jest zgodny z podanym w stopkach publikacji oraz z oświadczeniami współautorów. Należy podkreślić, że publikacje były wynikiem realizacji grantów naukowych, w których Habilitantka pełniła funkcję kierownika grantu (pięć projektów) lub głównego wykonawcy (cztery projekty).

Omówienie wybranych wyników pracy naukowej Habilitantki opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie:

1. Podszywalow-Bartnicka P et al. Downregulation of BRCA1 protein in BCR-ABL1 leukemia cells depends on stress-triggered TIAR-mediated suppression of translation. *Cell Cycle*. 13:3727-3741, 2014.

Autorzy zbadali zależność między obecnością białka BCR-ABL1 w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (CML), a poziomem białka BRCA1. Wykluczili wpływ BCR-ABL1 na transkrypcję BRCA1, stabilność transkryptu i białka. Stwierdzili, że BCR-ABL1 wywołuje stres komórkowy, który skutkuje uwięzieniem mRNA kodującego BRCA1 w granulach stresowych przy współudziale białka TIAR wiążącego sekwencję ARE obecną w 3' UTR tego transkryptu. Przekonująco pokazany mechanizm regulatorowy. Praca ważna także z medycznego punktu widzenia – wskazuje możliwe dodatkowe ścieżki terapeutyczne w leczeniu CML i ALL z translokacją *BCR-ABL1*.

2. Podszywalow-Bartnicka P et al. Increased phosphorylation of eIF2a in chronic myeloid leukemia cells stimulates secretion of matrix modifying enzymes. *Oncotarget*. 7:79706-79721, 2016.

Mimo wielu ważnych obserwacji przedstawionych w tej publikacji mam zastrzeżenia do stosowanego modelu. Według mojej najlepszej wiedzy Autorzy publikacji porównywali proteomy linii komórkowych wyselekcjonowanych po transfekcji komórek odpowiednimi plazmidami. Jeśli tak, to obserwowane różnice w proteomach mogą po części wynikać z przypadkowych innych różnic pomiędzy uzyskanymi klonami niekoniecznie związanych z brakiem fosforylacji eIF2 prowadzącej do zahamowania syntezy większości białek. Nie jestem również przekonana, że wniosek o stymulacji inwazyjnego potencjału fibroblastów szpiku kostnego przez białka wydzielane przez komórki białaczkowe z wystymulowaną ekspresją ATF4 jest słuszny.

3. Wolczyk M, Podszywalow-Bartnicka P et al. Stress granules assembly affects detection of mRNA in living cells by the NanoFlares; an important aspect of the technology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1861:1024-1035, 2017.

W tej pracy Autorki potwierdziły wcześniejsze obserwacje dotyczące różnic w ekspresji genu kodującego BRCA1 w modelowych mysich komórkach limfoblastycznych D32 niewykazujących, bądź wykazujących ekspresję kinazy BCR-ABL: wyższy poziom mRNA badanego metodą RT-qPCR, niższy poziom białka BRCA1. Publikacja powstała w wyniku próby zastosowania nowej w tamtych latach metody analizy poziomu konkretnego mRNA w żywych komórkach z wykorzystaniem specyficznej sondy określanej jako SmartFlare albo NanoFlare. Przełomowa, wydawać by się mogło, technika, okazała się całkowicie chybioną, a firma Merck w kolejnych latach wycofała się z syntezy i sprzedaży tych sond. Publikacja z współautorstwem Habilitantki była jedną z pierwszych

pokazujących brak korelacji pomiędzy wynikami analizy poziomu mRNA metodą RT-qPCR a metodą wykorzystującą sondy SmartFlare. W mojej opinii, to bardzo ważna publikacja, gdyż zwracała uwagę badaczy na ograniczenia długo wyczekiwanej metody umożliwiającej przyżyciową analizę poziomu konkretnego mRNA.

4. Podszywalow-Bartnicka P et al. Characteristics of live parameters of the HS-5 human bone marrow stromal cell line cocultured with the leukemia cells in hypoxia, for the studies of leukemia-stroma cross-talk. *Cytometry Part A*. 93:929940, 2018.

Kolejna publikacja jest poświęcona opracowaniu modelu pozwalającego na badanie wzajemnych oddziaływań komórek podścieliska i komórek białaczkowych w warunkach hipoksji takiej, jaka panuje w szpiku kostnym. Habilitantka wykorzystowała techniki cytometrii przepływowej do oznaczania proliferacji, apoptozy i żywotności komórek, cyklu komórkowego, poziomu reaktywnych form tlenu oraz potencjału błonowego mitochondriów w komórkach linii fibroblastów szpiku (HS-5) w kokulturze z komórkami białaczkowymi. Rozróżnienie parametrów dotyczących dwóch typów komórek było możliwe dzięki ich wyznakowaniu odmiennymi znacznikami fluorescencyjnymi. Wykorzystując opracowany model Autorzy wykazali, że obecność komórek podścieliska znacząco ogranicza śmierć komórek białaczkowych wywołaną hamowaniem aktywności kinazy BCR-ABL przez imatinib. Publikacja ma dwojakie znaczenie – prezentuje bardzo dobrze opracowany model badawczy oraz zwraca uwagę na wpływ komórek mikrośrodowiska nowotworu na efekty terapeutyczne stosowanych specyficznych leków, co ma szczególne znaczenie w przypadku białaczek. Eliminacji komórek białaczkowych w krwi nie towarzyszy zniszczenie tych komórek w niszy szpiku kostnego.

5. Podszywalow-Bartnicka P et al. PARP1 inhibitor eliminated imatinib-refractory chronic myeloid leukemia cells in bone marrow microenvironment conditions. *Leuk Lymphoma*. 22:1-3, 2019.

W tej publikacji Habilitantka przedstawia wyniki kontynuacji badań nad niższą wrażliwością komórek progenitorowych CML w szpiku na leki – inhibitory BCR-ABL i weryfikuje postawioną hipotezę, że terapia wykorzystująca kombinację inhibitora BCR-ABL z inhibitorem polimerazy 1 poli(ADP-rybozy) (PARP-1) biorącej udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA może być skuteczna w eliminacji białaczkowych komórek macierzystych i progenitorowych rezydujących w szpiku kostnym. Postawienie tej hipotezy było konsekwencją wcześniejszych badań (także z udziałem Habilitantki) wskazujących na obniżenie poziomu/aktywności innych białek uczestniczących w naprawie DNA (np. BRCA1) w komórkach z ekspresją BCR-ABL. Badania *in vitro* były prowadzone w warunkach odpowiadających warunkom w niszy szpiku, czyli w warunkach hipoksji i kontynuowane *in vivo* w modelu myszy NRGs. Wyniki badań wskazują na znaczący efekt inhibitora PARP-1 w eliminacji progenitorowych komórek CML w niszy szpiku kostnego, ale również wskazują na istotność prowadzenia badań *in vitro* nad skutecznością potencjalnych terapeutyków w warunkach maksymalnie zbliżonych do naturalnych, czyli w obecności komórek tworzących mikrośrodowisko i przy odpowiednim stężeniu tlenu. Warto podkreślić, że skuteczność inhibitorów PARP-1 u pacjentów z nowotworami hematologicznymi jest obecnie przedmiotem badań klinicznych.

6. Le BV, Podszywalow-Bartnicka P et al. TGFβR-SMAD3 Signaling Induces Resistance to PARP Inhibitors in the Bone Marrow Microenvironment. *Cell Reports*. 33:108221, 2020.

Praca wieloautorska (26 autorów pochodzących z 12 ośrodków badawczych), w której Habilitantka jest drugą współautorką. Jej udział w tej bardzo ważnej publikacji jest znaczący. Praca obejmująca modele różnych typów białaczek ludzkich i mysich jasno wskazuje na fakt, że mikrośrodowisko szpiku kostnego chroni komórki białaczkowe przed cytotoksycznym wpływem leków, w szczególności ogranicza syntetyczną letalność wywołaną przez inhibitory PARP-1 w komórkach z upośledzoną aktywnością alternatywnych ścieżek naprawy podwójnych pęknięć DNA. Autorzy wykorzystując inhibitory ścieżek sygnałowych i narzędzia edycji genomu stwierdzili, że aktywacja osi TGF β /TGF β R/SMAD3 wywołana hipoksją jest odpowiedzialna za obniżoną wrażliwość komórek białaczkowych na inhibitory PARP-1. Zahamowanie tej ścieżki spowodowało znaczący spadek żywotności komórek białaczkowych w doświadczeniach *in vitro* w warunkach hipoksji oraz w szpiku kostnym *in vivo* (myszy SCID). Autorzy wyjaśnili również zależny od ścieżki TGF β mechanizm odporności komórek białaczkowych na chemioterapeutyki w szpiku kostnym; zahamowanie SMAD3 znacząco obniżało ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć DNA – zarówno białka uczestniczące w rekombinacji homologicznej, jak i w klasycznym procesie niehomologicznego łączenia końców (D-NHEJ). W mojej opinii to bardzo ważna praca łącząca aspekty wiedzy podstawowej z wskazaniem terapeutycznych możliwości zastosowania przedstawionych odkryć.

7. Wolczyk M, Serwa R, Kominek A, Klejman A, Milek J, Turos-Korgul L, Chwalek M, Charzynska A, Dabrowski M, Dziembowska M, Skorski T, Piwocka K, Podszywałow-Bartnicka P: TIAR and FMRP shape pro-survival nascent proteome of leukemia cells in the bone marrow microenvironment. *iScience* 26:106543, 2023.

Praca, w której Habilitantka jest autorką korespondencyjną jest logiczną kontynuacją wcześniejszych jej badań. Biorąc pod uwagę to, że (i) hipoksja i komórki podścieliska ograniczają wrażliwość komórek CML na terapię, (ii) metabolizm CML podlega regulacji nie tylko na poziomie transkrypcji genów, ale także przez regulację procesów związanych z obróbką i stabilnością mRNA wpływających na translację i proteom oraz (iii) białka wiążące RNA i uczestniczące w odpowiedzi komórek na stres, TIAR oraz FMRP, biorą udział w wielu procesach dotyczących funkcjonowania pre-mRNA i mRNA, pani dr Podszywałow-Bartnicka podjęła tu złożone badania nad wpływem komórek podścieliska na translację i proteom CML w warunkach hipoksji i nad określeniem roli białek TIAR i FMRP w modulacji procesu translacji i proteomu. Najistotniejszymi wnioskami płynącymi z tej bogatej w wyniki publikacji jest potwierdzenie znaczenia procesu translacji w regulacji metabolizmu CML i ich oporności na terapię w niszy szpiku kostnego, określenie profilu białek, których poziom jest modulowany przez TIAR (białka zaangażowane w odpowiedź na stres komórkowy i cykl komórkowy) i tych modulowanych przez FMRP (procesy metaboliczne, biogeneza rybosomów) a także stwierdzenie, że aktywność TIAR ogranicza wrażliwość CML na terapię opartą o hamowanie elongacji translacji z zastosowaniem homoharringtoniny.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania zarówno w artykule jak i w Autoreferacie sugerujące zależność efektu Warburga od hipoksji. Opisane ponad 100 lat temu przedstawienie metabolizmu w komórkach nowotworowych na pozyskiwanie energii głównie z glikolizy, właśnie dlatego wzbudzało i wciąż wzbudza wielkie zainteresowanie, że występuje także w warunkach normoksji.

8. Podszywałow-Bartnicka P, Neugebauer KM: Multiple roles for AU-rich RNA binding proteins in the development of haematologic malignancies and their resistance to chemotherapy. *RNA Biology* 21:1-17, 2024.

Świetna publikacja przeglądowa poświęcona białkom wiążącym RNA wpływającym na różne aspekty regulacji ekspresji genów w komórkach białaczkowych i w komórkach stanowiących mikrośrodowisko nowotworów krwi. Habilitantka odwołuje się w niej częstokroć do wyników własnych prac. Mam jednak wątpliwość co do zaklasyfikowania regnazy-1 i roquiny do białek wiążących ARE. W oddziaływaniu tych dwóch białek z RNA istotny jest element strukturalny, o czym Habilitantka wspomina, natomiast sekwencje w obrębie tej struktury w różnych mRNA znacząco się różnią. W pracy, na którą powołuje się Habilitantka zaliczając regnazę-1 i roquinę do ARE-BP, nie znajdują takiej klasyfikacji tych białek.

Podsumowując: Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego są oryginalne, nowatorskie i bezsprzecznie znacząco przyczyniają się do poznania i zrozumienia wpływu mikrośrodowiska na zmiany proteomu komórek białaczkowych, które to zmiany z kolei warunkują ich przeżywanie i obniżenie wrażliwości na różne strategie terapeutyczne. Zrozumienie tych zjawisk jest pierwszym krokiem do wdrażania skutecznych terapii przeciwbiałaczkowych. Przedstawione do oceny publikacje są również istotne z punktu widzenia metodologicznego, przede wszystkim ze względu na prowadzenie eksperymentów w warunkach maksymalnie zbliżonych do fizjologicznych oraz ze względu na prezentowanie różnic wyników eksperymentów w zależności od zastosowanych warunków. Cykl publikacji przedstawiony jako osiągnięcie naukowe pani dr Podszywałow-Bartnickiej stanowi więc **istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne**.

Ocena dorobku naukowego

Dane bibliometryczne:

Po uzyskaniu stopnia doktora pani dr Paulina Podszywałow-Bartnicka, oprócz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, jest współautorką 16 artykułów, w tym 14 eksperymentalnych, opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach; np. jest współautorką dwóch publikacji w *Blood* i jednej w *Journal of Clinical Investigations*. W pięciu spośród tych 14 eksperymentalnych, wieloautorskich prac, pani dr Podszywałow-Bartnicka jest drugą współautorką, a więc z pewnością miała znaczący udział w ich powstaniu. W okresie składania dokumentacji w przewodzie habilitacyjnym, publikacje z jej udziałem były cytowane 474 razy bez autocytowań, a jej Indeks Hirscha wynosił 13. Habilitantka prezentowała wyniki swoich badań w formie wykładów na 10 konferencjach międzynarodowych i jednej polskiej oraz w formie posterów na ponad 20, w tym na konferencjach EMBO/EMBL czy gordonowskich.

Tematyka badawcza i praca naukowa:

Po obronie doktoratu pani dr Podszywałow-Bartnicka rozpoczęła pracę naukową w zespole pani prof. dr hab. Katarzyny Piwockiej. Jej badania od początku koncentrowały się na biologii komórek chronicznej białaczki szpikowej, a w szczególności na zmianach proteomu wynikających ze zmian genetycznych oraz zmian uwarunkowanych wpływem mikrośrodowiska, co znalazło odzwierciedlenie w zaprezentowanym osiągnięciu naukowym. Inne projekty, w których uczestniczyła Habilitantka były również związane z tematyką możliwych strategii terapeutycznych chorób

nowotworowych wykorzystujących wiedzę na temat zmian genetycznych, epigenetycznych i proteomicznych związanych z rozwojem nowotworów. W ostatnich latach badania pani dr Podszywałow-Bartnickiej koncentrują się na znaczeniu alternatywnego splajsinu w odpowiedzi komórek CML na stres oraz na możliwości terapeutycznego wykorzystania różnic w splajsinu determinujących istotne różnice w proteomie komórek nowotworowych.

Udział w projektach naukowych:

Pani dr Podszywałow-Bartnicka uczestniczyła lub uczestniczy w 13 projektach naukowych finansowanych przez polskie, europejskie i amerykańskie instytucje, pełniąc funkcję wykonawcy w trzech z nich, głównego wykonawcy w czterech, reprezentantki Polski w Komitecie Zarządczym w jednym i **kierownika projektu w pięciu**. Należy podkreślić, że od razu po zakończeniu studiów doktoranckich z sukcesem zdobywała finansowanie własnych projektów badawczych.

Była kierownikiem dwóch grantów Luventus Plus (MNiSW), grantów Sonata i Harmonia (NCN) oraz *the Hollis Brownstein New Investigator research grant (Leukemia Research Foundation, USA)*.

Współpraca naukowa:

Już afiliacje współautorów publikacji pani dr Podszywałow-Bartnickiej wskazują na jej bardzo intensywną współpracę z naukowcami z innych grup badawczych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, z naukowcami z innych instytucji w Warszawie – z Wydziału Biologii UW, Politechniki Warszawskiej i Międzynarodowego Instytutu Mechanizmów i Maszyn Molekularnych PAN oraz z naukowcami z Wielkiej Brytanii i USA. Na szczególną uwagę zasługuje piętnastoletnia i bardzo owocna współpraca z prof. Tomaszem Skórskim z Temple University School of Medicine w Filadelfii, który początkowo był dla pani dr Podszywałow-Bartnickiej mentorem, a z biegiem stał się partnerem w projektach przez nią kierowanych. Habilitantka współpracuje także z prof. Karłą Neugebauer z Yale University w New Haven w badaniach nad splajsinem mRNA w komórkach białaczki oraz z prof. Anne E. Willis z Medical Research Council w Wielkiej Brytanii, w ramach programu COST.

Podsumowując: Świetnie przygotowany Autoreferat oraz Wykaz osiągnięć naukowych jasno wskazują, że pani dr Paulina Podszywałow-Bartnicka jest dojrzałym, w pełni samodzielnym naukowcem. Zdobywa granty na finansowanie własnych badań, stawia ważne naukowe pytania i nawiązuje współpracę z naukowcami z renomowanych ośrodków badawczych, aby jak najpełniej i najlepiej na te pytania odpowiedzieć.

Działalność organizacyjna i dydaktyczna:

Pani dr Paulina Podszywałow-Bartnicka brała udział w licznych przedsięwzięciach naukowo-dydaktycznych często łącząc wysiłki organizacyjne z nauczaniem. Była współorganizatorką i osobą prowadzącą zajęcia na licznych warsztatach poświęconych cytometrii przepływowej organizowanych przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Brała również udział w organizacji warsztatów proteomicznych poprzedzających konferencję EMBO w Ljublanie (2019 r). Była członkiem komitetu oceniającego postery w konkursie magistrantów podczas zjazdu American Society of Biochemistry and Molecular Biology w Seattle, USA (2023), a obecnie, jako reprezentantka Polski w Komitecie Zarządzającym projektu TRANSLACORE (w ramach programu COST) jest członkiem komisji organizującej wykłady i wsparcie współpracy młodych naukowców.

Pani dr Podszywałow-Bartnicka pełniła także funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim pani Magdaleny Wołczyk oraz była opiekunką naukową jednej magistrantki.

Wnioski końcowe:

Po zapoznaniu się z przedstawioną dokumentacją oraz z cyklem prac stanowiących osiągnięcie naukowe pani dr Pauliny Podszywałow-Bartnickiej stwierdzam, że Habilitantka spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego określone w art. 219 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie dr Podszywałow-Bartnickiej do dalszych etapów postępowania ws. nadania jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie ze względu na konsekwentny rozwój warsztatu badawczego i wysoki poziom badań naukowych Habilitantki przyczyniających się do zrozumienia procesów towarzyszących progresji chronicznej białaczki szpikowej wnioskuję o wyróżnienie jej osiągnięcia naukowego.

