



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Kierownik

Prof. dr hab. HANNA ROKITA

Kraków, 4 stycznia 2016 r.

**Recenzja
pracy doktorskiej p. mgr Wojciecha Pigłowskiego**

**pt „Zbadanie ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji wysoce
swoistego dla spermatogenezy białka HSPA2 w komórkach
nowotworowych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy analizy ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka HSPA2 (inna nazwa HSP70-2 czy HSP70-3) w komórkach nowotworowych. Tematyka rozprawy wpisuje się w szeroko zakrojone badania od wielu lat prowadzone przez zespół promotora niniejszej rozprawy w Zakładzie Biologii Nowotworów (obecnie: Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów) w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddziale w Gliwicach, dotyczące funkcji wielu różnych białek szoku cieplnego i czynnika szoku cieplnego HSF1 w spermatogenezie i ludzkich nowotworach. Białka szoku cieplnego, do których należy białko HSPA2, to białka opiekuńcze uczestniczące nie tylko w utrzymywaniu prawidłowej konformacji nowo syntetyzowanych białek, ale także w tworzeniu kompleksów białek, w transporcie i naprawie białek oraz w kierowaniu uszkodzonych białek do degradacji w proteasomach. Ponadto, wiadomo, że białka te mogą wspomagać inicjację nowotworów, ich wzrost, przerzuty, angiogenezę czy zmianę wrażliwości komórek rakowych na stosowane chemoterapeutyki.

Chociaż mechanizmy molekularne aktywności niektórych białek szoku cieplnego zostały już dobrze poznane, to białko HSPA2 nie było dotąd dobrze scharakteryzowane. Poznanie jego funkcji wydaje się być istotne w związku z aktualnymi doniesieniami na temat przydatności oznaczeń jego podwyższonej zawartości w niektórych nowotworach jak np. przewodowym gruczolaku trzustki czy raku wątrobowo-komórkowym. Poziom transkryptów *HSPA2* czy białka mógłby być dobrym czynnikiem predykcyjnym czasu całkowitego przeżycia pacjenta lub samodzielnym i niezależnym czynnikiem prognostycznym. Dodatkowym powodem, dla którego potrzebne było

wyjaśnienie funkcji HSPA2 w komórkach, były wcześniejsze ustalenia, dotyczące roli białka HSPA1, innego podobnego pod względem sekwencji aminokwasowej do HSPA2 białka z rodziny HSPA ale różniącego się od HSPA2 wzorem ekspresji. W związku z powyższym, jak sam Doktorant podkreśla w rozprawie, w ustalaniu korelacji poziomu ekspresji HSPA1 z cechami klinicznymi danego nowotworu, powinno się uwzględniać ekspresję HSPA2.

Rozprawa doktorska Pana mgr Wojciecha Pigłowskiego posiada typowy dla takich prac układ: streszczenie w języku polskim, obszerny wstęp, rozdział zatytułowany „Materiał i metody”, wyniki, dyskusję uzupełnioną krótkim podsumowaniem wyników i wnioskami oraz spis piśmiennictwa. Załączono także listę czterech publikacji, w których zawarto wyniki przedstawione w rozprawie. Publikacje te ukazały się w latach 2007-2012 a ich sumaryczny IF wynosi ok. 10. Ponadto w jednej z nich p. Pigłowski jest pierwszym a w trzech pozostałych drugim autorem, co świadczy o znaczącym udziale Autora rozprawy w ich wykonaniu.

Opis białek szoku termicznego, ich klasyfikacja, charakterystyka genów i kodowanych przez nie białek oraz obszerne przedstawienie genu *HSPA2* łącznie z opisem jego ekspresji w komórkach somatycznych i w nowotworach, stanowią rozległy **wstęp**. Na uwagę zasługuje szczegółowy opis genów z rodziny *HSPA* człowieka oraz ekspresji HSPA2 w komórkach somatycznych i nowotworowych (ta ostatnia podsumowana w dwóch przejrzystych tabelach na końcu tego rozdziału). Wstęp jest ilustrowany trzema rycinami i czterema tabelami.

Stosowane przez Doktoranta **metody** obejmowały: klonowanie produktów PCR w wektorach plazmidowych i ekspresję genów w komórkach ssaczych. Należy podkreślić, że na potrzeby pracy doktorskiej w oparciu o plazmidy oraz retrowirusy skonstruowano sześć różnych wektorów ekspresyjnych. Stosowano metody hodowli i transformacji bakterii, izolacji plazmidowego DNA, analizy elektroforetycznej DNA i reakcję cyklicznego sekwencjonowania DNA. Ponadto prowadzono hodowle komórkowe oraz izolowano z komórek hodowanych *in vitro* i z tkanek a następnie analizowano kwasy nukleinowe i białka. Do ilościowego oznaczania zawartości transkryptów zastosowano RT-PCR w czasie rzeczywistym a do detekcji białek zastosowano metody immunocytochemiczne i immunohistochemiczne. Opracowano własną metodę oczyszczania króliczej poliklonalnej surowicy rozpoznającej ludzkie białko HSPA2, stosowano także mikroskopię fluorescencyjną. Należy podkreślić ogromną staranność Autora w opisie

stosowanych metod, o czym świadczy także umieszczenie w tym rozdziale aż ośmiu rycin i siedmiu tabel.

Do najważniejszych **wyników** zawartych w pracy należy zaliczyć:

1. Oznaczenie zróżnicowanej zawartości transkryptów *HSPA2* w siedmiu liniach nowotworowych i 3 liniach nienowotworowych, co wykazało, że ekspresja genu *HSPA2* nie jest ograniczona do spermatocytów i spermatyd. Ponadto pokazano, że transkrypt ludzkiego genu *HSPA2* jest identyczny w jądrach i w komórkach nowotworowych. Należy tu podkreślić, że Doktorant zastosował aż trzy geny referencyjne, β -aktyny, β -glukuronidazy i β -2 mikroglobuliny (ich średnią geometryczną), aby wyeliminować błędy mogące wynikać z różnego pochodzenia tkankowego badanych genów.
2. Ustalenie głównego miejsca startu transkrypcji genu *HSPA2* człowieka w odległości 109 par zasad powyżej kodonu ATG – startu translacji, w wyniku analizy sekwencji nukleotydowej sklonowanych transkryptów *HSPA2* (metodą 5'RLM-RACE PCR). Jako uzupełnienie, dodatkowo potwierdzono swoistość produktu PCR metodą Southern blot z użyciem wewnętrznej sondy oligonukleotydowej.
3. Oczyszczenie króliczej poliklonalnej surowicy swoście wykrywającej białko *HSPA2* koniecznej w badaniach wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka *HSPA2*. Ze względu na brak handlowo dostępnych przeciwciał swoście wykrywających białko *HSPA2*, Doktorant wybrał na podstawie analizy porównawczej sekwencji aminokwasowych białek z rodziny HSPA odpowiedni peptyd, który posłużył do immunizacji królików i otrzymania poliklonalnej surowicy. Zastosowanie metody powinowactwa do antygeny, czyli ludzkiego białka *HSPA2* unieruchomionego na nitrocelulozie, pozwoliło uzyskać monoswoistą surowicę poliklonalną anty-*HSPA2*, umożliwiającą wykrywanie *HSPA2*, natomiast nie reagującą z białkami *HSPA1*, 6 i 8. Swoistość tych przeciwciał została dodatkowo potwierdzona w testach kompetycyjnych z użyciem syntetycznego peptydu użytego do immunizacji królików. Uzyskanie przez Doktoranta tych przeciwciał umożliwiło bezpośrednie wykrywanie białka *HSPA2* bez konieczności posługiwania się wynikami pochodzącymi z zastosowania rekombinowanego białka *HSPA2* połączonego z białkami znacznikowymi, takimi jak GFP czy RFP.

4. Oznaczenie poziomu białka HSPA2 w badanych liniach komórkowych nowotworowych i nienowotworowych metodą Western blot oraz wyjaśnienie, że brak białka HSPA2 w linii komórkowej HCT116 pomimo obecności znacznej ilości transkryptu *HSPA2* nie jest spowodowany mutacją w sekwencji kodującej genu a raczej wynika z regulacji na poziomie potranskrypcyjnym. W tym celu Autor sklonował sekwencję kodującą białka HSPA2 i fragmentu 5'UTR a następnie zsekwencjonował ten fragment. Ten ostatni wynik jest niewątpliwie ciekawy, gdyż świadczy o występowaniu zróżnicowanej regulacji ekspresji HSPA2 w niektórych nowotworach.
5. Pokazanie metodą immunocytochemiczną, immunofluorescencyjną, metodą transfekcji wektorami kodującymi białko HSPA2 i białka fuzyjne (GFP-HSPA2 i RFP-HSPA2) oraz testami kolokalizacji z białkami znacznikowymi jąder i centrosomów, że białko HSPA2 podczas szoku cieplnego ulega translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego i nagromadza się w jąderkach oraz w centrosomie, w komórkach interfazowych i mitotycznych. Ta grupa wyników uzyskana dla linii komórkowej A549 o najwyższym poziomie endogennej ekspresji genu *HSPA2*, została przez Autora zweryfikowana w doświadczeniach z użyciem linii NCI-H1299 (niedrobnokomórkowego raka płuca) wykazującej ponad 2-krotnie niższą zawartość białka HSPA2. Zwiększenie poziomu ekspresji tego białka do poziomu porównywalnego z poziomem oznaczanym w komórkach A549 wymagało wprowadzenia wektora ekspresyjnego zawierającego promotor o odpowiednio dobranej sile, ale pozwoliło wykazać podobne zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka HSPA2 pod wpływem szoku cieplnego jak w linii A549.
6. Wykazanie roli cytoprotekcyjnej białka HSPA2 przez pokazanie, że egzogenna ekspresja HSPA2 w fibroblastach chomika (linia V79) uzyskana w wektorze retrowirusowym, chroni te komórki przed negatywnymi skutkami szoku termicznego a także stresu proteotoksycznego wywołanego dodaniem inhibitora proteasomu – MG132. Zdolność tak zmodyfikowanych komórek do proliferacji oznaczono metodą testu klonogenego, w którym wykazano ochronną rolę egzogennej białka HSPA2 względem komórek poddanych działaniu szoku termicznego lub traktowanych inhibitorem proteasomu.

Rozdział ten jest ilustrowany 18 rycinami i 4 wykresami. Należy podkreślić, że we wszystkich doświadczeniach stosowano odpowiednie kontrole (jak wspomniane aż 3 geny referencyjne w ilościowym RT-PCR, czy

test swoistości oczyszczonej surowicy poliklonalnej anti-HSPA2 albo oznaczenie helikazy WRN we frakcji jądrowej jako kontrolnego białka znacznikowego) a doświadczenia powtórzono co najmniej trzykrotnie. Stosowane linie komórkowe były rutynowo testowane na obecność infekcji *Mycoplasma* sp. aby wykluczyć użycie zakażonych komórek.

Dyskusja pracy została napisana w sposób obszerny, świadczący o dużej wiedzy Doktoranta. Ciekawie przedyskutowano aspekty metodyczne pracy dotyczące m.in. trudności w uzyskaniu swoistego przeciwciała rozpoznającego jedynie białko HSPA2 a nie pozostałe z tej rodziny, jak HSPA1 czy HSPA6 i HSPA8 czy sprawę konstruowania białek fuzyjnych. Te ostatnie mogły mieć wpływ na obserwowaną przez Autora zmniejszoną wydajność translokacji danego białka fuzyjnego do jądra komórkowego. Wiele miejsca poświęcono w dyskusji rozważaniom na temat molekularnych mechanizmów transportu cytoplazmatyczno-jądrowego białek HSPA, charakterystycznego nie tylko dla HSPA2, ale także HSPA1 i HSPA8. Część dotycząca sygnałów lokalizacji jądrowej i jąderkowej, udziału importyn w tym procesie czy wreszcie transportu alternatywnego i roli białka Hikeshi napisano ze sporym rozmachem. Także opis funkcji białek z rodziny HSPA w strukturach centrosomu i wrzeciona podziałowego został przedstawiony bardzo interesująco. Charakterystyka roli cytoprotekcyjnej białek z rodziny HSPA z uwzględnieniem udziału białka HSPA2 w tym procesie kończy ten rozdział.

Piśmiennictwo w liczbie 201 pozycji zawiera większość najnowszych prac.

Na zakończenie, kilka drobnych **uwag** dotyczących rozprawy:

1. redakcja pracy jest wzorowa; w obszernym tekście znaleziono zaledwie kilkanaście błędów literowych.
2. właściwa nazwa białek GFP czy RFP, to raczej „białko zielonej fluorescencji” czy „białko czerwonej fluorescencji” a nie „zielone” lub „czerwone fluorescencyjne białko” (str. 6-7).
3. w opisie wektora pCR-Blunt II-TOPO oraz w legendzie Ryciny III.1. (str. 42-43) wskazano 247 tyrozynę topoizomerazy I DNA jako miejsce połączenia z wektorem ale na Rycinie III.1. wskazano Tyr-274.
4. opisany w legendzie do Ryc. IV.6. (str. 85) test na swoistość przeciwciał anti-HSPA2 z użyciem syntetycznego peptydu, to „test kompetycyjny”

(„współzawodniczy”) a nie „kompetencyjny” choć istotnie sprawdza on zdolność (kompetencję ?) przeciwciała do rozpoznania antygenu w obecności sporego nadmiaru peptydu.

5. w ocenie wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia białka HSPA2 pod wpływem szoku cieplnego być może na podstawie badań fluorescencji znacznikowych białek fuzyjnych możliwe byłoby ilościowe oszacowanie puli białka przechodzącej do jądra w ciągu 10 minut szoku cieplnego ? (Rycina IV.11, str. 93). Z załączonych zdjęć wynika, że większość białka znajduje się w jądrze.

6. w pracy brakuje przedstawienia możliwych najbliższych badań, które pozwoliłyby lepiej wyjaśnić rolę białka HSPA2 w jąderku (to np. jako kontynuacja rozdziału „Podsumowanie wyników i wnioski” czy nowy rozdział „Perspektywy badań”).

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Wojciecha Pigłowskiego spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Pigłowskiego do następnych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wagę uzyskanych wyników, ich nowatorstwo i znakomite przedstawienie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną **nagrodą**.

Hanna Rokita