

Recenzja
pracy doktorskiej mgr Wojciecha Pięłowskiego zatytułowanej:
„Zbadanie ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji wysoko swoistego dla
spermatogenezy białka HSPA2 w komórkach nowotworowych”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Wojciecha Pięłowskiego dotyczy ekspresji ludzkiego genu *HSPA2* i wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka HSPA2 w komórkach nowotworowych. Białko HSPA2 należy do rodziny białek HSPA. Białka z tej rodziny posiadają aktywność opiekuńczą. W warunkach stresowych, takich jak raptowne podwyższenie temperatury, białka z rodziny HSPA pasywnie chronią inne białka przed zmianą struktury przestrzennej. W przypadku już zagregowanych białek, białka opiekuńcze z rodziny HSPA, w reakcji zależnej od ATP, katalizują dysocjację agregatów białkowych. W warunkach bezstresowych białka HSPA uczestniczą w prawidłowym zwijaniu się nowo syntetyzowanych w rybosomie białek, translokacji polipeptydów do organelli komórkowych i na zewnątrz komórki. Białka HSPA stabilizują struktury przestrzenne wielu kluczowych białek, w tym czynników transkrypcyjnych, a także wielu kinaz białkowych. W tym kontekście należy nadmienić, że HSPA2 posiada aktywność białka opiekuńczego podobną do aktywności HSPA1 (białka HSP70, którego synteza indukowana jest pod wpływem stresu, Hageman i wsp. 2011). Jak wykazał zespół prof. Zdzisława Krawczyka i dr Doroty Ścieglińskiej, ekspresja genu *HSPA2* nie jest indukowana przez szok termiczny. Początkowo uważano, że ekspresja genu *HSPA2* zachodzi jedynie w czasie spermatogenezy w ludzkich jądrach. Dalsze badania wykonane w zespole prof. Zdzisława Krawczyka i dr Doroty Ścieglińskiej wykazały ekspresję genu *HSPA2* w wielu rodzajach komórek. W roku 2005 zespół prof. Marji Jaatteli z Danii odkrył, że wiele komórek nowotworowych (różnego typu) nadprodukuje białko HSPA2 (Rohde i wsp. 2005). Upřednio wykazano, że w komórkach nowotworowych dochodzi do wzmożonej ekspresji *HSPA1*. W pracy Rohde i wsp. 2005, wykazano, że zahamowanie ekspresji *HSPA1* lub *HSPA2* powodowało inną zmianę morfologii komórek nowotworowych, inną zmianę ekspresji genów i zahamowanie cyklu komórkowego na innym etapie. Zahamowanie ekspresji w tym samym czasie obu genów *HSPA1* i *HSPA2* miało efekt synergistyczny na proliferację komórek nowotworowych. Doświadczenia te sugerują, że mimo dużej homologii między sekwencjami nukleotydowymi obydwu genów ich funkcje w komórkach nowotworowych nie całkowicie się pokrywają. Dlatego uważam, że podjęcie dalszych prac nad zbadaniem funkcji HSPA2 w transformacji nowotworowej lub/i progresji nowotworu jest całkowicie uzasadnione tym bardziej, że w najnowszej literaturze fachowej istnieją doniesienia sugerujące korelacje między wzmożoną ekspresją *HSPA2* a parametrami klinicznymi świadczącymi o progresji nowotworów. W przypadku gruczolakoraka przewodów trzustkowych wysoki poziom ekspresji genu *HSPA2* koreluje z agresywnym przebiegiem choroby i może być samodzielnym negatywnym czynnikiem predykcyjnym czasu całkowitego przeżycia pacjenta (Zhang i wsp. 2015).

W przypadku płaskonabłonkowego raka przełyku wysoka ekspresja *HSPA2* koreluje z agresywnością choroby, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, tendencją do wznowy i krótszym czasem przeżycia pacjentów (Zhang i wsp. 2013). W przypadku płaskonabłonkowego raka szyjki macicy, raka nabłonka pęcherza oraz raka wątrobowokomórkowego wysoka ekspresja *HSPA2* koreluje z progresją nowotworu (Garg i wsp. 2010, Fu i wsp. 2014).

Dysertacja doktorska mgr Wojciecha Pigłowskiego liczy 132 strony i zawiera rozdziały: Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie Wniosków i Piśmiennictwo. Ogólnie tekst napisany jest jasno, językiem poprawnym choć czasami stosowane są skróty myślowe jak na przykład „ekspresja białka” (użyty w tytule dysertacji i kilkakrotnie powtarzany w tekście), podczas gdy słowo „ekspresja” powinno być zarezerwowane do ekspresji genu a nie białka. Obszerne wstęp świadczy o ogólnej wiedzy teoretycznej Doktoranta.

W recenzji skupię się na rozdziale „Wyniki”, który podsumowuje główne osiągnięcia uzyskane przez Doktoranta i, do których mam pewne uwagi krytyczne:

1. Pan Wojciech Pigłowski stosując qRealTime PCR wykazał, że najwyższy poziom transkryptów genu *HSPA2* wykazują komórki linii A549 pochodzące z gruczolakoraka płuca. Ponadto, wysoki poziom transkryptów genu *HSPA2* wykazują także komórki z linii H1299, HBL100 i MCF7. Pozostałe linie mają niski poziom ekspresji *HSPA2* i, co ciekawe, komórki z linii HepG2 (rak wątrobowo-komórkowy) nie syntetyzują transkryptu kodującego *HSPA2*. Ponieważ w dalszej części pracy Autor wskazuje, że białko *HSPA2* zachowuje się bardzo podobnie jak *HSPA1*: lokalizacja cytoplazmatyczno-jądrowa, migracja do jądra (i lokalizacja w jąderkach) pod wpływem szoku termicznego - byłoby cenne porównanie syntezy mRNA *HSPA2* z syntezą mRNA *HSPA1* w poszczególnych liniach nowotworowych. Może byłoby możliwe zaobserwowanie pewnych różnic?
2. Stosując metodę 5'RLM-RACE PCR z zastosowaniem jako matrycy preparatu całkowitego RNA izolowanego z komórek ludzkich jąder Doktorant wykazał, że główne miejsce inicjacji transkrypcji genu *HSPA2* znajduje się 109 par zasad od kodonu ATG, co odpowiada miejscu T2 (-116) - uprzednio zidentyfikowanego miejsca startu transkryptu *Hspa2* myszy i szczura. W kontrolnych doświadczeniach Doktorant nie znalazł w komórkach ludzkich transkryptów inicjowanych powyżej T-109.
3. Dzięki immunizacji królików peptydem zawierającym C-końcowy fragment mysiego białka *HSPA2* (pozycja aminokwasów 611-628) Doktorant uzyskał surowicę zawierającą poliklonalne przeciwciała anti-*HSPA2*. Nie rozumiem dlaczego nie zastosowano do produkcji przeciwciał względem ludzkiego *HSPA2* peptydu, którego sekwencja aminokwasowa odpowiadałaby C-końcowemu fragmentowi ludzkiego białka *HSPA2*? Przecież chodzi o specyficzność przeciwciał do ludzkich białek *HSPA* a nie do mysich? 18-aminokwasowy peptyd pochodzący z mysiego *HSPA2* (o następującym składzie: sklyqggpggg **gs** sggpt) jest krótszy o 6 środkowych aminokwasów od analogicznego 24-peptydu pochodzącego z C-końca łańcucha polipeptydowego ludzkiego *HSPA2* (o następującej sekwencji aminokwasowej: sklyqggpggg **sgggsga** sggpt). Może

specyficzność tak uzyskanych przeciwciał względem ludzkiego białka HSPA2 byłaby większa?

Po zastosowaniu metody izolacji immunoglobulin, stosując powinowactwo do ludzkiego antygeny HSPA2 unieruchomionego na membranie nitrocelulozowej, mgr Piękowski uzyskał preparat, który według niego bardziej swoiście reagował z ludzkim HSPA2. Jest to trudne do stwierdzenia bo zdjęcie przedstawione na rys. IV.3 jest przekontrastowane. W następnym etapie Doktorant starał się wykazać czy uzyskany preparat przeciwciał anti-HSPA2, izolowany dzięki powinowactwu do ludzkiego białka HSPA2, reaguje także z innymi białkami należącymi do rodziny HSPA. Zastosowano metodę *Western blot* oraz linie komórkowe stabilnie nadprodukujące HSPA1 lub HSPA2. Autor przedstawił jednak zdjęcie *Western blot* tak przekontrastowane, że nie można stwierdzić czy przeciwciała anti- HSPA2 nie reagują z HSPA1 (rys. IV.4). Z tych samych przyczyn nie można jednoznacznie stwierdzić czy przeciwciała anti-HSPA2 nie reagują z izolowanymi białkami HSPA1, HSPA6 i HSPA8 (rys. IV.5). W czasie publicznej obrony proszę o pokazanie innych ekspozycji tych samych *Western blotów* (rys. IV.4 oraz IV.5) lub zdjęć tych samych „blotów” wykonanych przy mniejszym kontraście (takie wymogi stawiane są dzisiaj autorom prac, które mają być opublikowane w szanujących się czasopismach).

Swoistość uzyskanych przeciwciał anti-HSPA2 oceniano także stosując metodę immunohistochemiczną. W skrawkach parafinowych ludzkich jąder białko HSPA2 swoiście wykryto w spermatocytach i spermatydach. Nie zaobserwowano białka HSPA2 w spermatogoniach. W kontrolnych doświadczeniach wykazano, że białko HSPA1 jest nieobecne w spermatocytach.

4. Stosując poliklonalne przeciwciała anti-HSPA2 Doktorant wykazał, że linie komórkowe, które syntetyzują mRNA HSPA2 syntetyzują także białka HSPA2. Wydaje się, że korelacja tych dwóch zjawisk jest zadowalająca, choć błąd pomiaru poziomu białka HSPA2 był znacząco wyższy niż błędy pomiaru poziomu mRNA. Łatwiej byłoby ten wynik interpretować, gdyby wykresy były zrobione przynajmniej w tej samej skali i umieszczone obok siebie (dotyczy Rys.IV.1 i Wykresu 4.2). O ile można wytłumaczyć brak białka przy obecności transkryptu HSPA2 w komórkach linii HCT16, o tyle wydaje się zagadkowy procentowy nadmiar białka w stosunku do transkryptu HSPA2 w komórkach linii MCF7. Poproszę o komentarz.
5. Stosując barwienie immunocytochemiczne oraz immunofluorescencyjne Pan Piękowski wykazał, że w komórkach A549, w których ekspresja genu *HSPA2* jest najwyższa, białko HSPA2 ma lokalizację najczęściej cytoplazmatyczną, ale po szoku termicznym (1h 42°C) HSPA2, podobnie jak inne białka szoku termicznego np. HSPA1, migruje do jądra komórkowego i lokalizuje się w jąderku. Koncentrację HSPA2 w jądrze komórkowym, zachodzącą pod wpływem szoku termicznego, mają potwierdzać następne doświadczenia wykonane przez Autora. Komórki linii A549 inkubowano przez 15, 30, 45, 60 min w temp. 42°C i następnie metodą różnicowego wymywania sporządzono ekstrakty białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Stwierdzono, że w wyniku szoku

termicznego w „tak zwanej” frakcji jądrowej obserwuje się kumulację białka HSPA2. Z pozoru wynik ten jest zgodny z lokalizacją tego białka wykonaną technikami immunocytochemicznymi i immunofluorescencyjnymi. Zadziwia jednak obecność aktywności we frakcji jądrowej (rys. IV.9). W czasie obrony prosiłbym Pana Pięłowskiego o komentarz tego wyniku. Translokację białka HSPA2 do jądra komórkowego pod wpływem szoku termicznego obserwowano także w przypadku komórek niedrobnokomórkowego raka płuca. Komórki H1299 były transfekowane wektorami nadprodukującymi HSPA2, HSPA2-GFP lub RFP-HSPA2. Stwierdzono kolokalizację RFP-HSPA2 ze znacznikowym białkiem fuzyjnym GFP-B23 rezydującym w jąderkach. Co ciekawe, HSPA2-GFP lokalizowało się w obszarze około- jądrowym z γ -globuliną sugerując centrosomalną lokalizację białka HSPA2. Podobne wyniki Autor otrzymał dla endogennego białka HSPA2 syntetyzowanego w komórkach A549. Uprzednio wykazano oddziaływanie HSPA1 z centrosomami.

6. W celu zbadania fenotypu HSPA2, stosując transfekcję fibroblastów chemicznych (komórki V79) retrowirusem zawierającym gen *HSPA2* (lub pusty wektor), Pan Pięłowski wyprowadził stabilne linie nadprodukujące HSPA2. W warunkach doświadczenia, gdzie nie została podana temperatura, nie następowała synteza białka HSPA1 (rys. IV.17). Wyniki testu klonogenego pokazały, że HSPA2 nie wpływa na zdolność tworzenia kolonii w 37°C. Jednak inkubacja zmodyfikowanych komórek V79 w temperaturze 44°C wykazała, że HSPA2 zwiększa proliferację komórek zmodyfikowanych V79/HSPA2 w stosunku do komórek kontrolnych V79/Neo. Autor twierdzi, że w tych warunkach na pewno nie dochodzi do ekspresji genu *HSPA1*, aczkolwiek nie prezentuje wyniku poziomu obu białek HSPA1 i HSPA2, chociażby w postaci Western blotu. Zwiększenie temperatury do 45°C, co autor określa „szokiem termicznym nasilonym”, powoduje prawie całkowite zahamowanie proliferacji komórek modyfikowanych V79, co dokumentuje wynikiem testu klonogenego. Z drugiej strony wiadomo, że w tych warunkach następuje ekspresja genu *HSPA1* w komórkach mysich fibroblastów V79. Tutaj także nie ma odpowiedniej kontroli poziomu obu białek! Poproszę o komentarz na temat roli HSPA1 w warunkach szoku termicznego oraz na temat ochrony komórek V79 przez HSPA2, mimo że obydwa białka translokują się do jądra pod wpływem szoku cieplnego (Rys. IV.9). Skoro Autor dysponował stabilną linią chemicznych fibroblastów z wprowadzonym genem *HSPA1* (co pokazuje na Rys. IV.4), nasuwa się pytanie, dlaczego równoległych doświadczeń nie wykonano dla komórek V79 z wprowadzonym genem *HSPA1*? Byłoby ciekawe zobaczyć fenotyp obu białek w jednakowych warunkach doświadczenia.

W dalszych doświadczeniach Doktorant wykazał, że egzogenne HSPA2 chroni komórki przed stresem proteotoksycznym (obecność inhibitora proteosomu MG132). W tym przypadku brak jednak kontroli ekspresji *HSPA2* i braku ekspresji *HSPA1* w warunkach doświadczenia. Skoro zahamowana jest proteosomalna degradacja białek, należy się spodziewać, że poziom białek będzie wyższy w porównaniu do wcześniejszych doświadczeń gdzie zmienną była temperatura

doświadczenia. Wprawdzie część wyników można znaleźć w pracy Filipczak i wsp. 2012, gdzie Pan Pięłowski jest współautorem, ale nie jest jasne, kto jest autorem tych doświadczeń. Przy ich opisie w pracy doktorskiej nie ma odnośnika do opublikowanych wyników. Mam nadzieję, że te braki zostaną uzupełnione w czasie publicznej obrony.

Przeszło 30 lat temu zespoły H. Pelhama i S. Lindquist wykazały, że HSPA1 (HSP70) po szoku termicznym jest translokowany do jądra komórkowego i lokalizuje się w jąderkach uczestnicząc w ochronie tworzących się tam rybosomów. Reakcje ochronne katalizowane przez białka z rodziny HSPA były niezbędne do przeżycia komórek warunków stresowych. Przedstawiona do recenzji praca mgr Wojciecha Pięłowskiego wskazuje na to, że HSPA2, inne białko należące do rodziny HSPA, posiada podobne do HSPA1 cechy: lokalizację jądrową w czasie szoku termicznego i ochronę komórek przed stresem termicznym i proteotoksycznym. Czy jest to oryginalny wynik? Tak, bo dotyczy innego białka pochodzącego z tej samej rodziny, ale na pewno nie jest to wynik zaskakujący, otwierający nowe możliwości eksperymentalne albo nowe interpretacje uprzednio uzyskanych wyników. Na pewno wiele wnoszącym wynikiem byłoby pokazanie, że HSPA2 zachowuje się w pewnych aspektach inaczej niż HSPA1. Może oddziałuje z innymi HSP40, może posiada inne substraty białkowe, lub w innych warunkach fizjologicznych posiada różny od HSPA1 fenotyp? Takie różnice muszą istnieć, gdyż inaczej w czasie ewolucji któryś z tych genów uległby degeneracji. Ponadto, doświadczenia wykonane przez zespół prof. Jaatteli sugerują synergistyczne działanie HSPA1 i HSPA2 w rozwoju nowotworu. Niezależnie od tego, że główna zagadka różnicy działania między HSPA1 i HSPA2 nie została rozwiązana w niniejszej rozprawie doktorskiej, to uzyskanie przez doktoranta bardziej specyficznych poliklonalnych przeciwciał anti-HSPA2 doprowadziło do wygenerowania przez zespół w Gliwicach oryginalnych i ciekawych wyników. W przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca, jądrowa lokalizacja białka HSPA2 koreluje z typem histologicznym raka płaskonabłonkowego oraz podwyższony poziom białka HSPA2 koreluje z krótszym czasem całkowitego przeżycia zaawansowanych wiekiem pacjentów chorujących na płaskonabłonkowego raka płuca (I i II stopień zaawansowania klinicznego, Ściegłńska i wsp. 2014).

Reasumując, recenzowana dysertacja doktorska mgr Wojciecha Pięłowskiego spełnia wymogi stawiane przez „Ustawę o stopniach i tytule naukowym” w zakresie „oryginalności dokonania i wykazania się ogólną wiedzą teoretyczną Doktoranta” w tematyce biologii nowotworów. Czy Doktorant nabył umiejętność samodzielnego prowadzenia prac naukowych? Mam nadzieję, że tak a w czasie publicznej obrony przekona nas, że jest pracownikiem naukowym nie pozbawionym krytycznego podejścia do własnych wyników naukowych. Dlatego proponuję, aby Rada Naukowa Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie dopuściła mgr Wojciecha Pięłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


.....
/Maciej Żylicz/