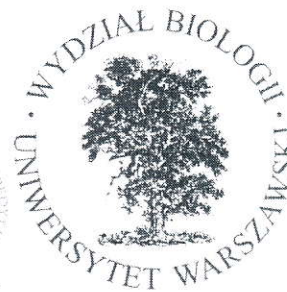




Instytut Genetyki i Biotechnologii
UNIwersYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
ul. PAWIŃSKIEGO 5A, 02-106 WARSZAWA
TEL: (+22) 592-22-44, FAX: (+22) 658-41-76
<http://www.igib.uw.edu.pl>



Prof. dr hab. Ewa Bartnik

tel.0048 22 592 22 47

e-mail: ebartnik@igib.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Rafała Wakuły pt. „Wpływ ludzkiego białka HAX1 na morfologię i funkcjonowanie mitochondriów w komórkach nowotworowych”

Promotor – dr hab. Ewa Grzybowska

Badania białka HAX1 i kodującego je genu prowadzone są przez prof. Janusza Siedleckiego, dr hab. Ewę Grzybowską i ich współpracowników od kilkunastu lat, ale jak wiele białek eukariotycznych ma ono różne funkcje i podejrzewam, że nieprędko będą one wszystkie zbadane. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zajmuje się wpływem tego białka na mój ulubiony obiekt czyli mitochondria.

Ekspresja badanego białka jest podwyższona w niektórych nowotworach a jego brak prowadzi do choroby Kostmanna. Punktem wyjścia recenzowanej rozprawy był fakt, że dane literaturowe najczęściej podają, że białko to jest zlokalizowane w mitochondriach, ale nie były znane inne jego działania niż wpływanie na apoptozę. Praca miała 5 określonych celów – dotyczyły układu doświadczalnego do zbadania wpływu białka HAX1 na funkcje mitochondriów, weryfikacji lokalizacji tego białka, zbadanie jego interaktorów, ustalenie wpływu braku HAX1 na transkryptom komórek i zbadanie wpływu HAX1 na wybrane funkcje mitochondriów.

Modelem doświadczalnym były linie komórkowe raka szyjki macicy (HeLa) i ostrej białaczki (HL-60), kontrolne i z delecją genu *HAX1*.

Po uzyskaniu wyżej wymienionych linii komórkowych dalsza część pracy polegała na ustaleniu lokalizacji komórkowej białka i na określeniu jaka sekwencja (jak się okazało, 26 pierwszych aminokwasów, a nie jak sugerowały wcześniejsze dane literaturowe 60 pierwszych aminokwasów) jest niezbędna dla jego lokalizacji w mitochondriach. Następnie

pan mgr Wakuła scharakteryzował interakcje pomiędzy HAX1 i białkami mitochondrialnymi, dysponując uzyskanymi w ramach tej pracy doktorskiej kontrolnymi liniami komórkowymi pozbawionymi białka HAX1. Do bliższej charakterystyki interakcji wybrano dwa białka, które były najsilniej wzbogacone w próbkach po immunoprecypitacji HAX1 – CLPB i SCL25A13. Po zweryfikowaniu, że interakcje te faktycznie zachodzą ustalono jak kontaktują się ze sobą te białka. Zbadano też bardzo starannie co się dzieje z tymi interaktorami w liniach komórek nie produkujących białka HAX1 – i stwierdzono niewielkie obniżenie poziomu i transkryptów i samych białek gdy nie jest obecne białko HAX1, natomiast lokalizacja obu badanych białek nie zmieniła się.

Ciekawym wynikiem badań jest stwierdzenie zmian w fizjologii komórek pozbawionych białka HAX1 – mają one m.in. wyższy poziom agregatów białkowych i zwiększoną wrażliwość na inhibitor proteasomu MG-132 i nadtlenek wodoru. Agregaty nie mają lokalizacji mitochondrialnej, w dyskusji doktorant sugeruje, że może to być związane z tym, że kontrola jakości w kompartmentie mitochondrialnym, w którym normalnie lokalizuje się HAX1 jest związana z cytoplazmatyczną odpowiedzią na stres, co zresztą pasuje do zwiększonej wrażliwości komórek HeLa bez HAX1 na hamowanie proteasomu.

Kolejnym etapem pracy była analiza transkryptomyczna, a mianowicie ustalenie jakie geny ulegają koekspresji z genem *HAX1*, z wykorzystaniem danych pacjentek z rakiem szyjki macicy i chorych na ostrą białaczkę szpikową (odpowiednio do stosowanych modeli komórkowych). Geny, których koekspresja była najbardziej prawdopodobna zaliczają się do 2 grup procesów związanych z mitochondriami (translacja mitochondrialna oraz łańcuch oddechowy i fosforylacja oksydacyjna) oraz z lokalizowaniem białek do błon, co bardzo dobrze pasuje do ustalonej eksperymentalnie lokalizacji badanego białka. Zbadano także jak HAX1 wpływa na transkryptom komórek ostrej białaczki szpikowej wykorzystując uzyskaną linię komórkową pozbawioną ekspresji tego białka. Stwierdzono obniżenie poziomu transkryptów szeregu genów odpowiedzialnych za translację mitochondrialną i fosforylację oksydacyjną.

Ostatnia grupa badań dotyczyła podstawowego pytania pracy – jak HAX1 wpływa na różne parametry mitochondrialne takie jak oddychanie, ultrastruktura, translacja i cykl moczniowy. Na podstawie uzyskanych wyników można było oczekiwać, że brak ekspresji genu *HAX1* może mieć różne efekty, jednak w zasadzie ich nie stwierdzono poza spowolnieniem zahamowania kompleksu I przez jego inhibitor rotenon. Wydaje mi się, że warto by było użyć więcej niż jedno białko ulegające translacji w mitochondriach do tego

badania, bo wyciąganie wniosku na podstawie jednego z 13 takich białek jest uzasadnione, ale może warto by było np. przebadąć któreś z białek z kompleksu I.

Praca ma klasyczny układ, z suplementem przedstawiającym m.in. dodatkowe zdjęcia oraz spis konstruktów DNA i interaktorów *HAX1*. Praca jest długa – 200 stron – ale nie mogę tego krytykować, nie widzę niczego zbędnego ani powtarzającego się. Język pracy jest klarowny, sposób przedstawiania badań i wyników logiczny i jasny. Bardzo mi się podoba opis wyników – z punktami uzasadnienie na początku danego działu i podsumowanie na końcu – to bardzo ułatwia czytanie pracy, i pokazuje też jak doktorant podchodził do kolejnych – licznych – eksperymentów. Także bardzo pomocny jest podany na str. 86 schemat planu badawczego. Jest bardzo mało literówek, poza chyba jednym spowodowanym przez spellcheck – tam gdzie coś odnosi się do neutrofili jest wszędzie neutrofilii. No i w 2 miejscach doktorant odnosi się do swojej pracy jako do pracy dyplomowej, zazwyczaj określa się rozprawę doktorską jako pracę doktorską, nie dyplomową (str. 161 i 164). Obecnie stosuje się nazwę choroba Huntingtona, używana przez doktoranta nazwa płasawica Huntingtona jest rzadko stosowana. Jeszcze jedna uwaga to fakt, że grecka litera alfa się jakoś znajduje przy wszystkich zdjęciach żeli, dając twory takie jak alfa-beta actin, alfa-HAX itp. (np. str. 123, str. 152).

Mam w zasadzie jedną uwagę merytoryczną, a mianowicie str. 169 „Dzieje się tak nie tylko dlatego, że kluczowe podjednostki ETC są produkowane na mitochondrialnych rybosomach” – jednak ogromna większość podjednostek ETC nie jest, bo powstaje na rybosomach cytoplazmatycznych, i trudno powiedzieć, że nie są one (białka ETC zakodowane w jądrze) kluczowe. Zresztą doktorant zdaje sobie z tego sprawę, co wynika z dalszej części cytowanego zdania.

Mam jedno pytanie do pracy – na str. 170 jest zdanie „konsekwencje tej zmiany wywołują tkankowo-specyficzne odpowiedzi komórkowe”. Czy ustalone linie komórkowe są naprawdę modelem tkanek, szczególnie jeśli wyniki uzyskano na 2 liniach komórkowych 2 różnych nowotworów.

Doktorant opanował wiele metod biologii molekularnej, i także znakomicie potrafi i opisywać i analizować własne dane i jasno określać co jest zrobione a także jakie dalsze badania powinny być przeprowadzone, natomiast wstęp jest tak dobrze napisany, że może warto go opublikować w nieco skróconej wersji. Bardzo mi się podoba forma prezentowania dyskusji, rozważanie możliwych wyjaśnień uzyskanych wyników, a nie tylko klasyczne w dyskusjach ich omawianie. Świadczy to i o dojrzałości autora pracy i o jego świetnej znajomości szerokiej literatury przedmiotu.

Zwracam się więc do Rady Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Curie-Skłodowskiej o dopuszczenie pana mgr Macieja Wakuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą. Jest to jedna z najlepszych prac, jakie zdarzyło mi się recenzować. Doktorant jest współautorem 7 publikacji z listy filadelfijskiej, w tym dwu 1-autorskich, a jedna z nich przedstawiająca część wyników uzyskanych w ocenianej rozprawie ukazała się w piśmie Bioscience Reports o IF 2,92. Sama praca jest wyjątkowo dobrze napisana i wnosi wiele nowych danych o roli białka HAX1 w procesach mitochondrialnych.

Warszawa 21.01.2021



Prof. dr hab. Ewa Bartnik