

Prof. dr hab. Krzysztof Liberek
Zakład Biochemii Białek
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 2.07.2021

Opinia o rozprawie doktorskiej Pana mgr. Damiana Sojki pt. "Scharakteryzowanie wpływu hamowania białek opiekuńczych HSPA, ze szczególnym uwzględnieniem białka HSPA2, na wybrane cechy fenotypowe komórek niedrobnokomórkowego raka płuca"

Białka opiekuńcze, w znakomitej większości należące do grupy białek stresu termicznego, są odpowiedzialne za utrzymywanie homeostazy białek. W komórkach nowotworowych homeostaza białek ulega często zaburzeniu co powoduje zwiększoną ekspresję białek opiekuńczych. Białka opiekuńcze z rodziny HSP70 (HSPA), będące tematem ocenianej rozprawy, są głównymi białkami opiekuńczymi. Szereg doniesień naukowych próbuje powiązać poziom ekspresji białek HSP70 ze zdolnością komórek nowotworowych do proliferacji oraz uczynić z nich czynnik prognostyczny. Często jednak wyniki tych badań nie są konkluzywne z uwagi na stosowaną metodykę badawczą, w szczególności gdy jest to zbiorcza lub mało specyficzna analiza zmian w ekspresji poszczególnych białek z rodziny HSP70. Pan mgr Damian Sojka w pracy doktorskiej podjął się przeprowadzenia szczegółowej analizy poziomu ekspresji jednego z białek HSP70, białka HSPA2, w liniach komórkowych wywodzących się z niedrobnokomórkowego raka płuca. Badania miały na celu znalezienie korelacji pomiędzy poziomem HSPA2 a cechami fenotypowymi analizowanych komórek. Wybrany temat doktoratu uznaję za ważny i mogący mieć zastosowanie praktyczne.

Całość materiałów przedstawionych jako rozprawa doktorska liczy 159 stron. W skład tych materiałów wchodzi trzy publikacje oryginalne, będące podstawą rozprawy, przedstawione w języku polskim omówienie wyników zawartych w tych publikacjach, oświadczenia współautorów publikacji oraz praca przeglądowa stanowiąca suplement do

rozprawy doktorskiej. Omówienie wyników jest bardzo obszerne i zostało podzielone na rozdziały, odpadające stosowanym w klasycznych rozprawach doktorskich. Jest ono dobrze i jasno napisane i stanowi dobre uzupełnienie publikacji oryginalnych. Publikacje oryginalne zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Biosciences*, *Cancers* oraz w *Scientific Reports*. W pierwszej publikacji mgr Sojka jest drugim autorem, w dwóch pozostałych pierwszym. W publikacjach biologicznych taki układ autorów jednoznacznie wskazuje na wiodącą rolę mgr. Sojki w prowadzonych badaniach. Wiodąca rola mgr. Sojki znajduje również potwierdzenie w informacjach zamieszczonych w sekcji *Author Contributions* w poszczególnych publikacjach jak i oświadczeniach współautorów. Oceniając całość przedstawionych wyników nie można mieć wątpliwości co do wiodącej roli doktoranta w ich uzyskaniu. Co za tym idzie mogą one stanowić podstawę do uzyskania stopnia naukowego doktora.

W pierwszej z przedstawionych publikacji eksperymentalnych mgr Sojka wraz ze współautorami analizował specyficzność komercyjnie dostępnych przeciwciał anty-HSPA2 względem innych białek z rodziny HSP70. Okazało się, że spośród sześciu analizowanych przeciwciał tylko jedno wykazywało specyficzność wyłącznie względem rekombinowanego białka HSPA2. Pozostałe wykrywały również inne białka z rodziny HSP70. Ten wynik jednoznacznie pokazuje na konieczność krytycznego spojrzenia na komercyjnie dostępne enzymy i przeciwciała i wskazuje na konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów specyficzności we własnym laboratorium przed przystąpieniem do właściwych badań eksperymentalnych.

W kolejnej publikacji mgr Sojka analizował wpływ HspA2 na cechy fenotypowe komórek niedrobnokomórkowego raka płuca, raka piersi, raka szyjki macicy oraz unieśmiertelnionych komórek nabłonka oskrzeli. Ekspresja HSPA2 była wyciszana przy użyciu technologii interferencyjnego RNA oraz CRISPR/Cas9. Uzyskane wyniki pokazały, że HSPA2 nie ma istotnego wpływu na analizowane fenotypy komórek nowotworowych natomiast jest istotne dla potencjału klonogenego oraz zdolności do adhezji komórek nabłonka.

W trzeciej publikacji mgr Sojka badał jak wpływa inhibicja białek z rodziny HSP70 na wzrost i żywotność komórek niedrobnokomórkowego raka płuca. Użycie niskocząsteczkowego inhibitora kompetycyjnego VER 155008, konkurującego o miejsce wiązania ATP w HSP70, spowodowało zahamowanie proliferacji analizowanych komórek. Podobne efekty uzyskano dla JG-98, allosterycznego inhibitora białek HSP70. Badane inhibitory skojarzone z

bortezomibem, inhibitorem proteasomu, wykazywały większą toksyczność w stosunku do komórek niedrobnokomórkowego raka płuca.

Całość uzyskanych przez mgr. Damian Sojkę wyników jest bardzo interesująca. Po pierwsze pokazał on, że ekspresja HSPA2 nie jest niezbędna dla wzrostu komórek niedrobnokomórkowego raka płuca, raka piersi, raka szyjki macicy. Podobnie, obniżenie ekspresji kanonicznego HSP70, HSPA1 nie wywierało negatywnego wpływu na wzrost analizowanych komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki są odmienne od dotychczasowych doniesień literaturowych. Należy jednak zauważyć, że eksperymenty opublikowane przez mgr Sojkę były bardzo dobrze kontrolowane, tzn. obniżenia ekspresji HSPA2 dokonano na różne sposoby oraz używano wysoce specyficznych przeciwciał. Co interesujące, negatywny wpływ na wzrost komórek nowotworowych uzyskano po zahamowaniu aktywności ATPazowej szerokiego spektrum białek HSP70, obecnych w komórce, w wyniku użycia drobnocząsteczkowego inhibitora tych białek. Ten wynik pokazuje, że białka HSP70 pełnią w komórkach nowotworowych redundantne funkcje i tylko zahamowanie aktywności całej rodziny białek HSPA skutkuje zahamowaniem wzrostu komórek nowotworowych. Co ciekawe, efekt synergistyczny w zahamowaniu wzrostu komórek nowotworowych uzyskano w wyniku zastosowania inhibitora VER 155008 oraz bortezomibu. Oba te związki upośledzają proteostazę w komórkach, pierwszy poprzez inhibicję białek opiekuńczych HSP70, drugi poprzez inhibicję proteasomu. Ten wynik pokazuje, że utrzymanie proteostazy jest istotna dla polifracji komórek nowotworowych. Nie jest jednak jasne jak głębokie zmiany w proteostazie są w stanie akceptować komórki poszczególnych typów nowotworów.

W swojej pracy Pan mgr Sojka skupił się na analizie wpływu białek opiekuńczych HSP70, w szczególności HSPA2 na cechy fenotypowe komórek nowotworowych. Jest to zgodne z ogólnymi trendami w badaniach mających na celu określenie istotności białek opiekuńczych dla proliferacji komórek nowotworowych. Należy jednak zwrócić uwagę, że białka HSP70 nie działają same. We wszystkich znanych układach współpracują z innymi pomocniczymi białkami opiekuńczymi (ang. *cochaperones*). W szczególności uważa się, że białka z domeną J (ang. *J-domain proteins*) pełnią kluczową rolę, gdyż są czynnikiem regulującym oddziaływanie HSP70 z substratem. Uważa się, że białka z domeną J tworzą kompleks z substratem, a następnie w wyniku ich oddziaływania z HSP70 dochodzi do przekazania substratu do miejsca wiążącego w HSP70 oraz do hydrolizy ATP, co skutkuje zmianą konformacyjną HSP70 prowadzącą do

stabilnego oddziaływania substratem. Taki mechanizm wydaje się być uniwersalnym. W związku z tym białka z domeną J należy uznać za bardziej substratowo specyficzne niż białka HSP70. Co za tym idzie, może w badaniach wpływu ekspresji białek opiekuńczych na komórki nowotworowe należałoby poświęcić więcej uwagi białkom J. Jest to trudne zadanie, gdyż w komórkach ludzkich jest znacznie więcej różnych białek J niż białek HSP70. W ostatnio opublikowanej pracy przeglądowej (Marszalek & Craig; 2017, TIBS) liczbę białek J określono na 45 a HSP70 na 17. Tak więc, możliwe jest, że zahamowanie ekspresji specyficznego białka J będzie miało dla komórek nowotworowych bardziej dotkliwe skutki niż zahamowanie ekspresji jednego wybranego białka Hsp70. Pewne poparcie dla tych rozważań mają wyniki uzyskane dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Gen SIS1, kodujący jedno z białek J, jest istotny, natomiast delecja SSA1 (gen kodujących główne HSP70) nie jest letalna. Prosiłbym doktoranta o ustosunkowanie się do tego problem w trakcie publicznej obrony. Co doktorant sądzi o możliwości ewentualnego specyficznego hamowania aktywności wybranych pomocniczych białek opiekuńczych, współpracujących z HSP70 (*ang. cochaperones*), w kontekście hamowania wzrostu komórek nowotworowych?

Rozdział omówienie wyników, napisany po polsku przez doktoranta, czyta się łatwo i znakomicie wprowadza on czytelnika w zagadnienia przedstawione w szczegółowo pracach oryginalnych. Jedyna rzecz która mnie w nim raziła to zupełnie niepotrzebne spolszczenie angielskiego *chaperone* oraz *cochaperone* co doprowadziło do powstania terminów „koczaperon”, „czaperon” czy też „czaperonin”. Termin białka opiekuńcze, używany także przez doktoranta, jest wystarczająco dobry do opisanie tej grupy białek i co ważne, znakomicie opisuje ich działanie.

Reasumując, pracę doktorską mgr. Damiana Sojki oceniam wysoko. Nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do oceny praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668). W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Damiana Sojki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.