



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej

i Wirusologii

KIEROWNIK

PROF. DR HAB. HANNA ROKITA

Recenzja

pracy doktorskiej p. mgr Damiana Sojki

pt „Scharakteryzowanie wpływu hamowania funkcji białek opiekuńczych HSPA, ze szczególnym uwzględnieniem białka HSPA2, na wybrane cechy fenotypowe komórek niedrobnokomórkowego raka płuca”

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy badania funkcji białka HSPA2 (ang. heat shock protein A2) w nowotworach. Dotychczasowe szeroko zakrojone badania wielu badaczy w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowym Instytucie Badawczym, Oddziale w Gliwicach pozwoliły wykazać istotne funkcje tego białka w różnicujących się męskich komórkach rozrodczych, w naskórku oraz komórkach nowotworowych.

Punktem wyjścia do badań zawartych w ocenianej pracy stały się wcześniejsze wyniki Promotorki rozprawy, p. prof. Doroty Ścieglińskiej. Przeprowadzone na potrzeby tej rozprawy badania wpisują się w nurt poszukiwań nowych celów a także selektywnych inhibitorów chaperonów z rodziny HSPA (HSP70), które znane są ze swych właściwości antyapoptotycznych. Wyniki stanowiące rozprawę doktorską zostały już opublikowane w trzech prestiżowych czasopismach: Int J Mol Sci, Cancers (Basel) i Sci Rep a czwarta publikacja, przeglądowa, w Anticancer Agents Med Chem, stanowi suplement tej rozprawy.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska stanowi połączenie czterech prac, opublikowanych w wymienionych powyżej czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym

współczynnika oddziaływania tych 4-ciu publikacji wynoszącym ok. 17. Publikacje poprzedza obszernie 45-stronicowe omówienie wyników stanowiące autoreferat podzielony na wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. W dwóch publikacjach doświadczalnych mgr Damian Sojka jest pierwszym autorem, w trzeciej doświadczalnej drugim a w pracy przeglądowej trzecim autorem. Jego udział w powstaniu tych prac został potwierdzony przez Niego, prof. prof. Dorotę Ścieglińską i Zdzisława Krawczyka oraz dziewięciu pozostałych współautorów, którzy precyzyjnie określili swoje udziały w poszczególnych publikacjach.

Poza autoreferatem i pełnymi tekstami czterech publikacji wraz z suplementami, rozprawa zawiera listę publikacji wchodzących w skład rozprawy, listę pozostałych publikacji Autora rozprawy, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów publikacji.

Ocena merytoryczna

Autoreferat opatrzone prawie stoma pozycjami piśmiennictwa, stanowi właściwie osobną spójną pracę. We wstępie opisano białka szoku komórkowego, ich poznaną dotychczas rolę w nowotworach, rodzinę dwunastu wysoce homologicznych białek HSPA, w tym HSPA1 i tytułowe białko HSPA2 oraz jego dotychczas opisaną (przede wszystkim w ośrodku w Gliwicach) aktywność w komórkach nowotworowych, naskórku czy nabłonku oskrzeli.

Ta część pracy jest bardzo dobrze przygotowana i świetnie ilustrowana rycinami w postaci macierzy.

W badaniach zastosowano prawidłowo dobrane metody. Wykorzystano linie komórek ludzkiego nabłonka oskrzeli, 4 linie niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), linię raka piersi MCF7 i raka szyjki macicy HeLa. Geny *HSPA1* i *HSPA2* wyciszano wykorzystując zjawisko interferencji RNA z zastosowaniem shRNA dla transkryptów badanych genów w wektorach lentiwirusowych. Jedna z linii NDRP miała podwójne wyciszenie, które skutkowało znacząco obniżoną zawartością białka HSPA1 i HSPA2. Metoda CRISPR/Cas9 pozwoliła zablokować transkrypcję genu *HSPA2* a wektor lentiwirusowy został użyty do uzyskania linii ze zwiększoną ekspresją tego genu. Metoda Western blot i immunohistochemiczna służyły do analizy białek. Testy fenotypowe, takie jak wzrost komórek oznaczano testem MTS, przeżywalność testem z MTS, barwieniem błękitem trypanu, aneksyną V oraz przez pomiar aktywności

dehydrogenazy mleczanowej. Potencjał proliferacyjny analizowano barwiąc komórki fioletem krystalicznym a klonogenność komórek w dostosowanym do warunków wzrostu badanych linii teście zdolności do tworzenia kolonii. Fazy cyklu komórkowego i wrażliwość komórek na cisplatynę czy bortezomib analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Zdolność komórek do migracji badano za pomocą „testu rysy” i testu w komorze Boydena, adhezję do białek macierzy zewnątrzkomórkowej przy pomocy testu komercyjnego a potencjał inwazyjny w teście migracji przez macierz zewnątrzkomórkową. Zestaw metod dopełnia właściwie dostosowana analiza statystyczna.

Należy podkreślić, że w doświadczeniach stosowano odpowiednie kontrole, jak np. niemodyfikowane komórki (typu dzikiego), czy komórki z sekwencją nie prowadzącą do wyciszenia docelowego transkryptu. Z kolei swoistość obniżenia syntezy białka HSPA2 wykazywano oznaczając jednocześnie inne homologiczne białka z tej rodziny: HSPA1, HSPA5 i HSPA8.

Publikacja nr 1 w *Int J Mol Sci* stanowi szeroko zakrojone studium pozwalające udowodnić, że niektóre opublikowane dane dotyczące ekspresji i funkcji białka HSPA2 w nowotworach należy traktować ze znaczną ostrożnością a niektóre z tych danych powinny wręcz być poddane weryfikacji. O ile ilościowe oznaczenia transkryptu metodą RT-qPCR przy zachowaniu odpowiednich warunków dotyczących sekwencji starterów czy temperatury danej fazy reakcji nie nastroczają wielu problemów, to zastosowanie w immunohistochemii mało specyficznych przeciwciał rozpoznających białko HSPA2, stanowi już dość istotny problem. Autorzy pokazali, że tylko jedno z sześciu stosowanych przez nich i innych badaczy przeciwciał anty HSPA2 nie wykazuje dodatkowo wiązania z HSPA1, HSPA6 czy HSPA8. Z tego względu tylko to przeciwciało było stosowane w prowadzonych doświadczeniach. W badaniach uwzględniono komórki nie tylko z endogenną ekspresją białek HSPA, ale także z wyciszeniem i nadekspresją białek HSPA1 i 2 oraz rekombinowane białka HSPA. W suplemencie do tej publikacji przedstawiono bardzo szczegółową analizę wyników badań HSPA2 *in vitro* w liniach komórek różnych nowotworów.

Publikacja nr 2 w *Cancers (Basel)* zawiera wyniki badań nad wpływem białka HSPA2 na fenotyp komórek NDRP, MCF7 i HeLa oraz komórek nienowotworowych pochodzących z nabłonka oskrzeli. W tej obszernej publikacji zastosowano różne metody hamowania ekspresji genu *HSPA2*, takie

jak stabilne wyciszenie *HSPA2* przy pomocy shRNA i technologii CRISPR/Cas9. Pokazano, że niedobór białka HSPA2 w badanych komórkach nowotworowych nie wpływa na ich wzrost, klonogenność czy zdolność do adhezji, migracji oraz inwazji. Podobnie, niedobór białka HSPA1 i obu białek HSPA1 i HSPA2 pozostawał bez wpływu na proliferację i klonogenność komórek NDRP. Ważnym wynikiem jest pokazanie, że w komórkach prawidłowego nabłonka oskrzeli (linii BEAS-2B) obecność białka HSPA2 jest potrzebna do utrzymania potencjału klonogennego i zdolności do adhezji tych komórek, co rzeczywiście wskazywałoby na utratę tych funkcji HSPA2 w warunkach transformacji nowotworowej.

Niewątpliwie dobrym uzupełnieniem przeprowadzonych przez Autora badań *in vitro*, byłoby sprawdzenie wpływu deficytu białka HSPA2 na wzrost i zdolność do tworzenia przerzutów badanych linii nowotworowych w modelu *in vivo* np. u myszy.

Publikacja nr 3 w Sci Rep, relacjonuje wyniki badania wpływu HSPA1 i 2 na fenotyp komórek niedrobnokomórkowego raka płuca w warunkach selektywnego lub równoczesnego wyłączenia ekspresji tych genów. W tych warunkach nie obserwowano jednak zahamowania wzrostu czy chemiooporności. Tylko zastosowanie inhibitorów wszystkich białek HSPA (np. VER 155008 czy JG-98) uwrażliwiało komórki NDRP na bortezomib (inhibitor proteasomu) ale nie na pochodne platyny. To innowacyjne podejście pozwoliło wykazać, że kombinacja inhibitorów proteasomu (ale nie pochodnych platyny) i inhibitorów białek HSPA mogłaby być przydatna w badaniach przedklinicznych wysoce agresywnych form NRDP. Różne mechanizmy oporności komórek rakowych na cis-platynę zostały omówione w **publikacji nr 4** (Krawczyk i in., 2018). W tej pracy Autorzy pokazali, że nie ma powszechnego związku między poziomem ekspresji białek szoku komórkowego i wrażliwością komórek rakowych na cis-platynę. Stwierdzono, że związek taki może w znacznym stopniu zależeć od kontekstu molekularnego i komórkowego a białka szoku komórkowego są właśnie ważnym elementem złożonej odpowiedzi komórek rakowych na cis-platynę.

Wracając do autoreferatu, to **Dyskusja** a szczególnie zawarty w niej podrozdział „**Perspektywy dalszych badań**” zostały przedstawione w sposób bardzo kompetentny. Wskazano na konieczność poznania mechanizmów regulacji ekspresji genu *HSPA2* w komórkach somatycznych czy wprowadzenia

do badań *in vitro* hodowli 3D. Autor przytoczył przykłady badań innych autorów, które pozostają w sprzeczności bądź w zgodzie z uzyskanymi w pracy wynikami. Ciekawie przedstawiono rolę białek z rodziny HSPA w chemiooporności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca, z przypisaniem kluczowej roli w tym procesie ogólnemu nadmiarowi tych białek.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. **mgr Damiana Sojki** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i 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.). Z tego względu wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie p. mgr Damiana Sojki do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wagę uzyskanych wyników, ich nowatorstwo i znakomite przedstawienie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną **nagrodą**.



Hanna Rokita