

Poznań, 23 lipca 2021

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Mateusza Jana Chmielarczyka
pt.

Identyfikacja i analiza nowych oddziaływań antyapoptotycznego czynnika HAX1 i ich rola w procesie nowotworowym

1. Tematyka rozprawy doktorskiej

Badania objęte rozprawą dotyczą poznania nowych funkcji komórkowych białka HAX1 (ang. Haematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 – associated protein X-1), odkrytego po raz pierwszy 25 lat temu. Liczne i szerokie badania pokazały jego występowanie w mitochondriach ale także w jądrach, cytoplazmie i błonie komórkowej. Zgromadzono również wiele danych wskazujących na zaangażowanie tego białka w apoptozie, migracji, adhezji i homostazie wapniowej. Niezwykle ciekawym spostrzeżeniem był zwiększony poziom ekspresji białka HAX1 w kilku nowotworach. Zrozumiałe jest zatem, że ważnym zagadnieniem jest molekularny mechanizm funkcjonowania tego białka w procesie nowotworowym. Niezbędna jest zatem głęboka analiza jego oddziaływań z różnorodnymi składnikami komórkowymi a następnie identyfikacja strukturalnych domen zaangażowanych w swoiste rozpoznanie ligandów. Jest to oczywiste i konieczne, jeśli strategicznym celem badań jest opracowanie nowego środka przeciwnowotworowego. Takie działania mogą być łatwiejsze i bardziej skuteczne, jeśli znana jest struktura przestrzenna białka, w tym przypadku HAX1. Problemem jest, jak na razie, brak wiedzy o budowie III rz, która jak się wydaje jest kluczowa dla poznania molekularnego mechanizmu rozpoznania ligandów oraz ich funkcjonalne znaczenie.

Obecnie brak informacji o strukturze kryształu HAX1 ani też o badaniach spektroskopowych z zastosowaniem spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego lub dichroizmu kołowego. Ograniczenia te mogłyby być jednak pokonane przez wykorzystanie dynamicznie rozwijającej się techniki Cry-EM.

Dotychczasowe próby modelowania dostarczyły ograniczonych i niepewnych informacji o budowie przestrzennej oraz miejscach wiązania niektórych jonów. Na obecnym etapie badań HAX1 wydaje się, że białko to należy do grupy nieuporządkowanych wewnętrznie. Zatem multifunkcjonalność oraz plastyczność strukturalna powodują, że poznanie mechanizmu jego funkcjonowania w procesie nowotworowym jest bardzo trudnym problemem badawczym, z którym mgr Mateusz J. Chmielarczyk, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy A. Grzybowskiej, zmierzył się w ocenianej rozprawie doktorskiej. Można nawet powiedzieć, że poszukiwania swoistych oddziaływań białka HAX1 z różnymi składnikami komórkowymi na obecnym etapie są podobne do znajdowania igły w stogu siana.

2. Cele pracy doktorskiej

Głównym celem pracy było znalezienie i charakterystyka białek swoście oddziaływujących z HAX1 oraz ich rola w procesie nowotworzenia. Potencjalną grupę 36 białek wykazujących oddziaływanie białko-białko, otrzymano z analizy drożdżowego systemu dwuhybrydowego. Dla wyodrębnienia białek wybiórczo oddziaływujących z HAX1 wykorzystano szereg technik eksperymentalnych jak ko-immuno-precypitacja oraz jej połączenie z spektrometrią mas, a także inne testy funkcjonalne stosowane w badaniach komórkowych.

Na podstawie analizy otrzymanych danych zaproponowano, że jednym z białek charakteryzujących się dużym powinowactwem do HAX1 jest białko HRAS. Ze względu na jego zaangażowanie w procesie nowotworowej transformacji komórki, właśnie oddziaływanie z tym białkiem (p21) poddano dalszej analizie. HAX1 poprzez domenę przy końcu karboksylowym oddziałuje także z innymi białkami rodziny RAS. Wykazano również, że HAX1 aktywuje HRAS oraz szlak MAPK i moduluje transport HRAS w komórce. Eksperymenty potwierdzające te obserwacje zostały wyczerpująco opisane i przedyskutowane.

Można stwierdzić, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty.

Praca liczy 127 stron i składa się z 7 rozdziałów. We wstępie doktorant omawia aktualny stan wiedzy o HAX1 oraz metody badawcze oddziaływań pomiędzy białkami (33 strony). Cele pracy zostały opisane ogólnie (1 strona), a materiały i metody bardzo dokładnie (19 stron). Formalnie najdłuższym fragmentem są wyniki (46 stron), ale dyskusja liczy tylko 14 stron. Spis literatury liczy 150 pozycji.

3. Główne wyniki badań przedstawionych w rozprawie

3.1. Przeanalizowano 9 bibliotek ludzkich cDNA wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy. Łącznie wyodrębniono 36 białek oddziałujących z HAX1.

- 3.2. Wykazano, że sekwencja aminokwasów przy końcu karboksylowym (150-279) jest zaangażowana w wiązanie białek, gdzie białko HAX1 było przynętą w systemie dwuhybrydowym.
- 3.3. Fragment przy końcu C jest również miejscem wiązania dla HAX1 kiedy było ofiarą w Y2H.
- 3.4. Wyselekcjonowano 13 białek o największym powinowactwie do HAX1.
- 3.5. Analiza immunoprecypitacji specyficznej dla HAX1 oraz spektroskopii mas pokazała grupę 63 białek, które można podzielić na 3 grupy zaangażowane w cykl Krebsa, metabolizm RNA oraz translację.
- 3.6. Porównanie wyników otrzymanych z drożdżowego systemu dwuhybrydowego oraz spektroskopii mas pokazało, że tylko białko CLPB jest identyfikowane w obu tych metodach.
- 3.7. Do walidacji wybrano 7 białek HRAS, CRYAB, PDGF- β , TRIM25, TRIP10, DDX3X i SET, które mają właściwości onkogenne. Immunoprecypitacja potwierdziła interakcje trzech białek HRAS, DDX3X i PDGF- β z HAX1.
- 3.8. Białka KRAS, NRAS, HRAS i niektóre mutanty oddziałują z HAX1.
- 3.9. W części komórek (10%) stwierdzono obecność HAX1 i HRAS w aparacie Golgiego.
- 3.10. Oddziaływania HAX1 z HRAS stymulują aktywację p21.
- 3.11. Obniżenie poziomu ekspresji urokinazowego akceptora plazminogenu oraz tenascyny C jest wynikiem wyciszenia genu HAX1.

4. Uwagi do pracy

- 4.1. Głównym celem pracy było znalezienie swoistych oddziaływań białkowych HAX1 istotnych dla procesu karcinogenezy. Kluczowym warunkiem powodzenia tych wysiłków była i jest znajomość struktury HAX1, które na obecnym etapie badań nie jest znana. Doktorant powołuje się na prace innych autorów wskazujących, że białko to jest wewnętrznie nieuporządkowane. W takiej sytuacji należy wykorzystać wszelkie dostępne narzędzia biologii molekularnej do analizy białek. Podstawą jest sekwencja aminokwasów HAX1, której w pracy nie zauważyłem. Doktorant jej nie zamieścił. Z pobieżnej analizy sekwencji warto podkreślić dużą liczbę ujemnie naładowanych aminokwasów (Asp, Glu) oraz aminokwasów z ładunkiem dodatnim (Arg, Lys), łącznie 31. Na uwagę zasługuje również duża ilość Pro, Gly oraz aminokwasów hydrofilowych. Punkt izoelektryczny HAX1 wynosi 4.76. Są to elementarne informacje mające olbrzymie znaczenie w poznaniu struktury i funkcji białka.

- 4.2. Jakie metody przewidywania struktury białek stosował doktorant w swoich doświadczeniach z HAX1?
- 4.3. Przy końcu aminowym HAX1 znajduje się oligopeptyd zawierający 11 ujemnie naładowanych aminiokwasów (30-41), który został zakwalifikowany jako region nieuporządkowany. Czy grupy karboksylowe kwasu asparaginowego i glutaminowego nie mają możliwości oddziaływania z kationami (aminokwasy o ładunku dodatnim lub jon metalu)?
- 4.4. Doktorant przywołuje wcześniejsze badania innych autorów, że fragment białka HAX1 przy końcu aminowym (aminokwasy 1-59) jest odpowiedzialny za transport do mitochondriów. Cechą wspólną peptydów sygnałnych jest ich struktura helikalna. Czy ten warunek jest spełniony w białku HAX1?
- 4.5. Region białka HAX1 (138-170) proponowany jest jako miejsce wiązania wapnia. Czy takie oddziaływania zapewniają 3 reszty kwasu asparaginowego i jedna kwasu glutaminowego?
- 4.6. Na stronie 19 doktorant przywołuje prace wskazujące na zaangażowanie białka HAX1 w internalizacji integryny oraz bezpośrednie oddziaływanie z podjednostką integryny (Tabela 1). Dlaczego w badaniach własnych nie zauważono oddziaływań HAX1 z integryną?
- 4.7. W badaniach przesiewowych potwierdzono oddziaływania HAX1 z trzema białkami HRAS, DDGF-B i DDX3X, z których tylko oddziaływanie HAX1 z białkiem p21 pozostało w zainteresowaniach doktoranta (Tabela 9). Dlaczego dwa pozostałe białka nie były dalej analizowane?
- 4.8. Doktorant stwierdza niską „pokrywalność” wyników testów przesiewowych i tłumaczy to niską specyficznością tkankową kompleksów z HAX1. W jaki sposób doktorant oceniał swoistość testu?
- 4.9. Doktorant nie zauważył związku między ekspresją HAX1 a inwazyjnością mimo zróżnicowanej ekspresji niektórych białek ECM, chociaż są inne obserwacje w tym zakresie.
- 4.10. Jakie były przesłanki wyboru określonych fragmentów sekwencji HAX1 do analizy oddziaływań w drożdżowym systemie dwuhybrydowym?
- 4.11. Jakie były podstawy wyboru wariantów białka HAX1 do oddziaływań z HRAS (str. 65)?
- 4.12. Czy w badaniach oddziaływań HAX1 z HRAS doktorant rozważał wpływ modyfikacji potranslacyjnych p21, które są ważne dla jego funkcji, ale być może do oddziaływania z XAX1. Wiadomo, że fragment przy końcu karboksylowym jest izoprenylovany a reszty cystein C181 i C184 są palmitylowane.
- 4.13. Autor pracy powinien dołożyć starań do właściwej redakcji tekstu, w którym jest dużo żargonu laboratoryjnego. Przytaczam kilka przykładów:

- pokrywalność sekwencji (str. 11),
- prognozowane struktury (str. 11),
- zamodelowano struktury (str. 11),
- analiza typu NMR (str. 12),
- środowisko naśladujące błony lipidowe (str. 12),
- IDP pomagają w modyfikacjach posttranslacyjnych (str. 12),
- kolejne pokolenie proteomików,
- do zajścia ubikwitynacji (str. 13),
- a także białka, które mają raptem kilka oddziaływań (str. 13),
- analiza funkcjonalna roli białka HAX1 (str. 86),
- takie cechy HAX1 jak polarność (str. 14),
- brak odniesienia w tekście do Ryc. 10, 11, 16, 17,
- podpis pod Ryc. 13,
- paragraf „Wyniki” nie powinien zawierać dyskusji wyników doświadczeń własnych. To powinno być w „Dyskusji”, np. Ryc. 19, str. 71,
- itd.

5. Wniosek końcowy

- 5.1. Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej mgr Mateusza Jana Chmielarczyka są bogatym materiałem eksperymentalnym dotyczącym badań nowych, nieznanych białek oraz ich wzajemnych oddziaływań w procesie nowotworowym. Rozprawa stanowi także istotny wkład do poznania oddziaływań białka p21, a w ogólności białek G.
- 5.2. Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami wprowadzonymi przez Dz. U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2010 r., Nr 96, poz. 620, Dz. U. z 2010, Nr 182, poz. 1228) i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie p. mgr Mateusza Jana Chmielarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

