



Warszawa, 16.08.2021 r.

Dr hab. Elżbieta Speina
Pracownia Biologii RNA

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Chmielarczyka

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. Ewa Grzybowska.

Zastosowanie metod wysokoprzepustowych zarówno w zespole promotora, jak i przez inne grupy badawcze ujawniły uprzednio szereg interakcji pomiędzy czynnikiem HAX1 a jego partnerami białkowymi, jednakże informacje na ich temat są nadal ograniczone i dlatego podjęcie próby identyfikacji przez mgra Mateusza Chmielarczyka nowych oddziaływań i ich scharakteryzowania uważam za jak najbardziej uzasadnione. Na wyniki rozprawy doktorskiej składają się wieloletnie badania stanowiące część większego projektu/projektów, w których Autor brał udział. Badania te zostały opublikowane w postaci wieloautorskiej pracy, która ukazała się w roku 2020 w Bioscience Reports. Ponadto, Doktorant został włączony do prac nad charakterystyką białka HAX1, co zaowocowało współautorstwem trzech kolejnych publikacji, ich wyniki nie wchodzą jednak w skład niniejszej rozprawy.

Ambitnym celem przedstawionej pracy była próba określenia tzw. interaktomu białkowego HAX1, co mogłoby pozwolić na pogłębienie wiedzy na temat procesów biologicznych, w które czynnik ten może być zaangażowany. Projekt ten wymagał ogromnej pracy oraz wykorzystania różnych technik, od klonowania i przygotowania konstruktyw plazmidowych do

analiz za pomocą wysokoprzepustowego systemu dwuhybrydowego oraz immunoprecypitacji połączonej ze spektrometrią mas, a następnie szczegółowych analiz biochemicznych, obrazowania oraz analizy poziomu mRNA i białek w komórce. Zaplanowane doświadczenia były pracochłonne, ale ich analiza wymagała równie dużego wysiłku. Ze wszystkich tych zadań Doktorant wywiązał się bardzo dobrze. Mimo że nie wszystkie wyniki pokazują spektakularne różnice, to przedstawiona praca jest przykładem solidnego i rzetelnego podejścia do zagadnienia.

Główne wnioski płynące z rozprawy to:

1. Zastosowane metod wysokoprzepustowych umożliwiło identyfikację nowych, nieopisanych wcześniej oddziaływań HAX1. W zależności od wybranej techniki były to: białko odpowiedzialne za wzrost komórek, HRAS, płytkopochodny czynnik wzrostu, PDGF-B i zależna od ATP helikaza RNA, DDX3X. Wszystkie te białka związane są z rozwojem nowotworów lub agresywnością guza.
2. Za pomocą szczegółowych testów potwierdzono i dokładnie scharakteryzowano oddziaływanie pomiędzy HAX1 a HRAS. Okazało się, że procesy zachodzące po związaniu HRAS mogą mieć znaczenie w procesie nowotworzenia.
3. Nie udało się potwierdzić wpływu HAX1 na proces przerzutowania komórek raka piersi, pomimo zwiększonego poziomu białek macierzy zewnątrzkomórkowej w obecności HAX1.
4. Wykazano, że HAX1 reguluje ekspresję receptora progesteronu.

Jak widać, praca jest wielowątkowa i chociaż wnosi wiele nowych, cennych informacji na temat oddziaływań antyapoptycznego czynnika HAX1 i jego roli w procesie nowotworowym, to na jej podstawie trudno sobie skonstruować jakąś jednolitą historię. Wątpliwości też może budzić to, na ile stosowane testy odzwierciedlają rzeczywistą sytuację w komórce. Myślę, że Autor był w pełni świadomy ograniczeń stosowanych przez siebie metod. Zastanawiający jest dla mnie fakt niskiej pokrywalności wyników uzyskanych w drożdżowym systemie dwuhybrydowym i za pomocą spektrometrii mas (MS). Doktorant wytłumaczył to niedoskonałością układu drożdżowego. Jednakże, dlaczego nie udało się wyników uzyskanych w tym systemie zidentyfikować techniką MS, która jest dużo bardziej wiarygodna i za pomocą której wykryto 63 nowe potencjalne oddziaływania? Ponadto, dlaczego interakcje HAX1 z białkiem RAS udało się zidentyfikować z biblioteki cDNA, a nie udało się zidentyfikować za pomocą spektrometrii mas? Jaka może być tego przyczyna? Prosiłabym o komentarz.

Opracowanie stanowiące rozprawę doktorską jest starannie przygotowane, choć Autor nie ustrzegł się błędów redakcyjnych. Praca składa się z 24 stron wstępu, zwięzłe i jasno przedstawionego celu badań, omówienia metodyki (17 stron), dokładnego i obszernego opisu uzyskanych wyników (47 strony), dyskusji (16 stron) i wniosków oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, a także spisu publikacji (150 pozycji) i suplementu zawierającego tabele prezentujące całościowe wyniki uzyskane metodami wysokoprzepustowymi.

Wstęp jest napisany poprawnie. Zawiera większość najważniejszych informacji niezbędnych do zrozumienia dalszych części rozprawy, poza tym zawiera klarowne ilustracje. Inne części napisane są też bez zarzutu, choć Doktorant nie ustrzegł się w dyskusji pewnych powtórzeń ze wstępu, co jest częstym mankamentem wielu rozpraw doktorskich. Należy podkreślić, że interpretacja wyników jest rzeczowa, pozbawiona nadinterpretacji, co wskazuje na krytyczne podejście Kandydata do otrzymanych danych oraz jego dojrzałość naukową. Trochę brakuje zbiorczych podsumowań i uogólnień pokazujących, jakie jest globalne znaczenie otrzymanych wyników oraz jak wyniki te można wykorzystać, a także, co jest najbardziej ciekawym punktem wyjścia do dalszych badań.

Podsumowując, przedstawiona praca jest interesująca i wnosi sporo nowego do identyfikacji oddziaływań białka HAX1 i rozszyfrowania ich wpływu na proces onkogenezy.

Uwagi szczegółowe:

- Strona 35, rys. 5: Wydaje mi się, że blot ten powinien znaleźć się w części Wyniki. Dlaczego pokazano analizę western blot wyciszania białka HAX1 tylko dla linii MCF-7, a co z pozostałymi liniami komórkowymi wykorzystanymi w pracy, takimi jak HeLa i MDA-MB-231?
- Uważam, że opisy tabel powinny znaleźć się raczej nad tabelami niż pod nimi. Taki kanon jest ogólnie przyjęty.
- Strona 39, linia 3: Zamieszczony jest tu równoważnik zdania, który nie wnosi żadnej informacji. Można się domyślać, że chodzi o uzyskanie bakterii chemokompetentnych metodą Inoue.
- Strona 39, linie 7-8: Nie wydaje mi się, aby istniała taka aparatura jak „wytrząsarka bakteryjna”.
- Strona 52, Wyniki: ciekawa jestem, czym się kierowano w wyborze do badań cDNA, uzyskanego z takich struktur mózgu jak istota czarna, podwzgórze i hipokamp?

Skąd się wzięło białko bakteryjne w drożdżowym systemie dwuhybrydowym przy przeszukiwaniu ludzkich bibliotek cDNA?

Strona 69, rys. 21A i 46: brak analizy statystycznej; nie podano, czy różnice były istotne statystycznie? Błąd w numeracji rysunku 46 (powinien być 38) i dalszych.

- Strona 73, 77 i 80; rys. 24, 25, 29 i 33: skrót SEM (z ang. *standard error of the mean*) oznacza błąd standardowy średniej, a nie odchylenie standardowe. Skrót dla odchylenia standardowego to SD (z ang. *standard deviation*). Nie ma czegoś takiego, jak „średnie odchylenie standardowe” i „średni błąd standardowy”, są natomiast: „odchylenie standardowe średniej” i „błąd standardowy średniej”. Jestem przekonana, że oto właśnie chodziło Autorowi.

Ryc. 25: dlaczego podano dwie wartości istotności statystycznej? $p=0.016$ jest mniejsze od 0.05. Poza tym uważam, że lepiej byłoby tutaj zrobić analizę wariancji, a następnie wybrać którąś z analiz typu post-hoc.

- Brak odniesienia w tekście do rys. 20A i 37B.
- Rozdział 4.4.2 i 4.5.1, rys. 40-43: dlaczego wykonano trzy różne kontrole „ładowania” dla badanych próbek, a mianowicie: analizę stain free SDS-PAGE (rys. 40 i 43), oznaczanie GAPDH (rys. 41) i beta aktyny (rys. 42)?
- Rys. 47 powinien nosić numer 46.

Powyższe uwagi mają charakter redakcyjny i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Chmielarczyka. Doktorant pokazał znaczenie biologiczne (lub brak znaczenia) interakcji HAX1 z kilkoma nowymi partnerami białkowymi. Uzyskane przez Doktoranta rezultaty są nowatorskie i wartościowe, stanowią zarazem punkt wyjścia do dalszych szczegółowych badań. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników świadczą o zdolności Kandydata do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a zatem w pełni uzasadniają jego ubieganie się o stopień doktora. Stwierdzam więc, że przedstawiona do oceny rozprawa w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i zarazem zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o jej przyjęcie i dopuszczenie mgra Mateusza Chmielarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Spejka