



UNIwersytet KAZIMIERZA WIELKIEGO  
W BYDGOSZCZY

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

Katedra Biochemii i Biologii Komórki  
ul. Ks. Józefa Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz



Bydgoszcz, dn. 8 sierpnia 2022 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Śmietanki p.t. **"Wpływ białka HAX1 na migrację kolektywną, adhezję typu komórka-komórka oraz mechanizm przerzutu nowotworowego w różnych podtypach raka piersi"** wykonanej pod kierunkiem dr. hab. n. med. Ewy A. Grzybowskiej, prof. Instytutu NIO-PIB.

### 1. Główne założenia i cel rozprawy

Rak piersi jest najczęstszą chorobą nowotworową, która co roku jest diagnozowana u milionów kobiet na całym świecie i jest przyczyną śmierci wielu dotkniętych tą chorobą osób w różnym wieku. Badania nad nowotworami piersi umożliwiły scharakteryzowanie swoistych markerów nowotworowych, co z kolei pozwoliło na wyróżnienie czterech podtypów raka piersi różniących się wrażliwością na różne formy terapii, częstością nawrotów i zdolnością do tworzenia przerzutów. Pomimo ogromnego postępu wiedzy w tej dziedzinie, przyczyny rozwoju raka piersi nie są dobrze poznane, a metody leczenia nie są w pełni skuteczne. Na całym świecie są prowadzone intensywne badania, których celem jest poznanie złożoności molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej i metastazy oraz znalezienie swoistych markerów różnych stadiów raka. Możliwość wczesnego wykrywania i precyzyjnego diagnozowania nowotworów umożliwi zastosowanie ukierunkowanej terapii ratującej życie wielu pacjentek.

Analizy przeprowadzone przez zespół Pani Profesor Ewy Grzybowskiej wykazały nadekspresję białka HAX1 w nowotworach piersi, co może być wykorzystane w prognozowaniu przerzutów (Trebinska-Stryjewska i wsp., *Oncol.* 2019; 2019: 6375025). Białko HAX1 należy do rodziny białek wewnątrznie nieuporządkowanych, które posiadają zdolność do oddziaływania z wieloma partnerami. Wśród cząsteczek oddziałujących z HAX1 znajdują się białka zaangażowane w regulację ruchliwości komórkowej. Zmiany w poziomie HAX1 mogą zatem prowadzić do zaburzeń wielu podstawowych procesów.

Zrozumienie roli białka HAX1 w mechanizmach rozwoju różnych podtypów raka piersi był głównym celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Śmietanki. Doktorantka postanowiła zrealizować to zadanie analizując wpływ HAX1 na funkcje komórkowe odgrywające zasadniczą rolę w migracji komórek modelowych reprezentujących różne typy nowotworów piersi oraz krążących komórek nowotworowych (CTC). Szczegółowe cele to:

- zbadanie udziału białka HAX1 w regulacji adhezji komórka-komórka,
- powiązanie HAX1 z kurczliwością aktomiozynową i ścieżkami sygnałowymi wpływającymi na zależną od miozyny II migrację komórek,
- przeanalizowanie wpływu HAX1 na proces entozy i anoikis,
- wyizolowanie od pacjentek ze zdiagnozowanych rakiem piersi CTC i sprawdzenie poziomu HAX1 oraz statusu epitelialno-mezenchymalnego tych komórek.

Tak postawione cele rozprawy pozwoliły Doktorantce na rozszerzenie wiedzy na temat udziału białka HAX1 w migracji komórkowej oraz na zrozumienie mechanizmów rozwoju patologicznych cech w nowotworach związanych z nadekspresją HAX1. Podjęta problematyka badawcza jest aktualna i bezpośrednio wynika z wcześniejszych badań nad białkiem HAX1, zatem jest istotna dla rozwoju wiedzy.

## **2. Zastosowane podejście eksperymentalne i otrzymane wyniki**

Badania zostały przeprowadzone na trzech komercyjnych liniach wyprowadzonych z różnych podtypów nowotworów piersi, na linii komórkowej wyprowadzonej z pojedynczej komórki krążącej oraz komórkach HeLa. Doktorantka wykorzystywała również znajdujące się w kolekcji Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej linie komórkowe z wyciszoną ekspresją HAX1 oraz jedną linię z nadekspresją HAX1. Pani Śmietanka podjęła też próbę wyizolowania i przeanalizowania CTC z krwi obwodowej pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi w fazie rozsiewu.

Hodowle komórkowe były poddawane różnorodnym testom migracji, dzięki którym Doktorantka mogła określić wpływ HAX1 na migrację kolektywną oraz migrację pojedynczych komórek. Porównanie prędkości migracji różnych typów komórek z niezmiennym, obniżonym i podwyższonym poziomem ekspresji HAX1 jednoznacznie wykazało, że białko HAX1 ma duże znaczenie dla migracji komórek o fenotypie epitelialnym, które dzięki obecności połączeń międzykomórkowych migrują kolektywnie. Wyciszenie białka HAX1 w komórkach o fenotypie mezenchymalnym, u których połączenia międzykomórkowe ulegają rozluźnieniu, nie wpływało na szybkość ich migracji. Podobny wynik Doktorantka otrzymała analizując wpływ wyciszenia ekspresji HAX1 na wzrost



komórek w przestrzeni trójwymiarowej, czyli tworzenie sfer. Ciekawym wynikiem zakończyły się badania migracji komórek mezenchymalnych MDA-MB-231 z nadekspresją HAX1. Okazało się, że pomimo iż obniżony poziom HAX1 nie był przez te komórki odczuwany, to zwiększenie poziomu ekspresji HAX1 znacząco przyspieszało ich migrację. Sugeruje to, że HAX1 może regulować ruchliwość komórkową na drodze kilku niezależnych mechanizmów. Należy podkreślić, że badania nad migracją komórkową były bardzo skrupulatnie zaplanowane i przeprowadzone, a kontrole były dobrze dobrane. Dzięki temu uzyskane wyniki są zinterpretowane prawidłowo.

Kolejny etap badań był konsekwencją wyników otrzymanych w testach ruchliwości komórkowej. Aby zrozumieć mechanizm wykorzystywany przez białko HAX1 w regulacji procesów ruchliwości, Autorka zastosowała metody immunocytochemiczne i mikroskopię konfokalną do przeanalizowania struktury warstwy komórkowej, aktynej kory komórkowej i włókien naprężeniowych oraz połączeń międzykomórkowych. Badania przeprowadzone były na komórkach stacjonarnych i kolektywnie migrujących, niezmiennych i z wyciszoną ekspresją HAX1. Obniżenie ekspresji HAX1 powodowało zmiany w lokalizacji białkowych składników połączeń międzykomórkowych oraz zmiany w aktynej korze komórki i włóknach naprężeniowych. Uzyskane wyniki wskazały na udział HAX1 w organizacji cytoszkieletu aktynowego i połączeń międzykomórkowych. W tym kontekście zastanawiam się z jakich powodów Autorka ograniczyła swoje analizy zmian strukturalnych do komórek MCF7 z wyciszoną ekspresją HAX1 i nie przeanalizowała wpływu nadekspresji HAX1 w komórkach MDA-MB-231. Jakich efektów strukturalnych można by oczekiwać w komórkach z podwyższonym poziomem ekspresji HAX1?

W poszukiwaniu molekularnych mechanizmów wykorzystywanych przez HAX1 do regulacji ruchliwości komórkowej, Doktorantka zastosowała trzy różne drobnocząsteczkowe inhibitory hamujące aktywność miozyny II, kinazy ROCK i septyn. Wybór tych inhibitorów świadczy to o dobrej orientacji Doktorantki w mechanizmach determinujących migrację, gdyż ruchliwość komórkowa jest w dużej części uwarunkowana przez aktywność niemięśniowej miozyny II obecnej zarówno we włóknach naprężeniowych jak i w aktynej korze. Wpływ inhibitorów Doktorantka prześledziła w komórkach MCF7 wykonując testy ruchliwości i analizy immunocytochemiczne. Dodanie do pożywki inhibitora miozyny II lub inhibitora ROCK zwiększało szybkość migracji komórek z wyciszonym HAX1, natomiast użycie inhibitora septyn wywierało odwrotny efekt. Zatem Doktorantka słusznie podejrzewała iż HAX1 reguluje aktywność miozyny II, a przez to wpływa na kurczliwość włókien aktomiozynowych. Analizując obrazy linii komórkowej MCF7 miHAX1 dostrzegłam, że w obecności blebistatyny komórki stały się bardziej regularne, ale zdecydowanie poszerzyła się

podblonowa warstwa korytkalnej aktywy (Rycina 30, dolny srodkowy i prawy panel). Poniewaz w rozprawie faktu ten nie zostal skomentowany, chcialabym prosic by w swojej odpowiedzi na recenzje zaproponowala Pani przypuszczalny mechanizm takiej odpowiedzi komorki na zahamowanie aktywnosci miozyny.

Dazac do wyjaśnienia kwestii czy HAX1 wpływa na miozynę bezpośrednio czy też pośrednio, Doktorantka przeanalizowała poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha miozyny. Stosując metodę Western Blot i przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanemu MYL9, Pani Śmietanka wykazała, że w dwóch liniach komórek MCF7 z wyciszoną ekspresją HAX1 poziom ufosforylowania MYL9 jest nieco wyższy. Z uwagi na fakt, że inhibitory ROCK, kinazy fosforylującej lekkie łańcuchy miozyny, znosił częściowo efekt wyciszenia ekspresji HAX1, badania te potwierdziły wpływ HAX1 na białka regulujące aktywność miozyny.

Doktorantka stwierdziła również, że zmiany w komórkach MCF7 wywołane wyciszeniem ekspresji białka HAX1 zwiększają liczbę entoz i wydłużają czas przeżywalności komórek hodowanych na podłożach nieadherentnych, ale nie mają znaczącego wpływu na przejście epitelialno-mezenchymalne.

Na ostatnim etapie pracy Doktorantka podjęła się ambitnego zadania wyizolowania i zbadania krążących komórek nowotworowych i ich klasterów z krwi pacjentek, jednakże problemy techniczne jakie napotkała uniemożliwiły uzyskanie odpowiedniej liczby komórek, które mogłyby poddać analizom opracowanym dla linii komórkowych.

Część wyników badań, które Doktorantka włączyła do swojej rozprawy została opublikowana w dobrym piśmie *Molecular Biology of the Cell*, a niektóre metody analiz zostały zaprezentowane w *Journal of Visualized Experiments*, nowoczesnym piśmie demonstrującym wyniki w formie filmów video. Opublikowanie wyników badań w międzynarodowych czasopismach świadczy o tym, że wyniki badań spotkały się z uznaniem międzynarodowego środowiska naukowego.

### **3. Struktura pracy**

Rozprawa doktorska Pani Śmietanki została przedstawiona w klasycznej formie monografii liczącej 178 stron. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań i zawiera następujące rozdziały: teoretyczny wstęp, założenia i cel pracy, materiały, metody, wyniki oraz ich dyskusję. W osobnym rozdziale znajdują się wnioski. Na początku pracy umieszczone zostały streszczenia w j. polskim i angielskim. Po spisie treści Autorka załączyła wykaz najczęściej stosowanych skrótów. Spis literatury liczy 332 pozycje i obejmuje najnowsze publikacje na temat przedmiotu pracy. Na końcu opracowania Autorka umieściła



Suplement, w którym udokumentowała poziom ekspresji HAX1 otrzymany przez kolegów z Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej oraz część własnych wyników.

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały bogato zilustrowane. W pracy Autorka zawarła aż 54 ryciny, wśród których 6 ilustruje treści opisane we Wstępie.

Wstęp jest interesującym wprowadzeniem do przeprowadzonych badań. Na początku Autorka wyjaśniła współczesną klasyfikację nowotworów piersi i opisała mechanizmy powstawania przerzutów. W kolejnym podrozdziale opisała mechanizm przejścia epitelialno-mezenchymalnego i jego rolę w rozwoju nowotworów. Bardzo dobrze zostały opisane typy migracji komórkowej, krążące komórki nowotworowe i metody ich analizy. Ostatni podrozdział Wstępu został poświęcony białku HAX1, jego budowie i biologicznym funkcjom. W tej części rozprawy zabrakło jedynie opisu budowy miozyny, lokalizacji miozyny II w komórkach mięśniowych oraz molekularnego mechanizmu oddziaływań aktomiozynowych i ich regulacji. Ponieważ wyniki otrzymane z użyciem inhibitorów dotyczą regulacji aktywności miozyny, takie wprowadzenie pomogłoby w zrozumieniu powiązań funkcji komórkowych z mechanizmem działania i regulacji mięśniowej miozyny.

Cele pracy są jasno określone, a wybór przedmiotu badań Autorka uzasadniła koniecznością zbadania roli HAX1 w procesach prowadzących do przerzutów w nowotworach piersi wynikającą ze wstępnych badań. Brakuje tu jednak klarownie sformułowanej hipotezy, którą Doktorantka zweryfikowałaby podczas swoich badań.

Materiały i metody zostały opisane w sposób wyczerpujący, a zawarcie w tabelach informacji na temat używanych buforów i przeciwciał nadaje tej części rozprawy zwarty charakter. Opis stosowanych procedur dobrze koresponduje z opisem wyników, chociaż przydałoby się wyjaśnienie na jakiej podstawie zostały dobrane stężenia inhibitorów. Zabrakło mi również uzasadnienia powodów, dla których test przechodzenia przez pory był przeprowadzony w gradiencie i bez gradientu surowicy. Autorka nie ustrzegła się również przed błędami podając, na stronie 54 i 60, że blebistatyna jest inhibitorem RhoA.

Jak wcześniej wspomniałam, wyniki są bogato zilustrowane i dobrze opisane. Każdy podrozdział zawiera krótkie uzasadnienie przeprowadzenia opisywanych doświadczeń oraz podsumowanie otrzymanych rezultatów, co podkreśla logiczne powiązania pomiędzy przeprowadzonymi eksperymentami.

Dyskusja jest zwarta i została poprowadzona w interesujący sposób. Doktorantka krytycznie podeszła do rezultatów swojej pracy omawiając je w kontekście wyników otrzymanych przez innych autorów, które nie zawsze są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Autorkę rozprawy. Świadczy to o otwartym podejściu Pani mgr Śmietanki do własnych danych. Szczególną wartość ma zaproponowany przez Doktorantkę mechanizm działania

białka HAX1 w komórkach MCF7, który łączy uzyskaną wcześniej wiedzę ze zdobytymi przez nią danymi przedstawionymi w rozprawie. Natomiast ogarniają mnie wątpliwości co do słuszności „wartościowania” uzyskanych wyników. Na przykład na stronie 141 Autorka pisze: „Zahamowanie aktywności miozyny II przy pomocy blebistatyny niweluje negatywny wpływ wyciszenia genu *HAX1* na tempo migracji kolektywnej...”. Komórki kontrolne są wyprowadzone z nowotworów, zatem charakterystyczna dla nich duża ruchliwość jest cechą niekorzystną. Wydaje się, że wyciszenie ekspresji genu *HAX1*, które obniża zdolność komórek do migracji, powinniśmy uznać raczej za wpływ pozytywny.

Praca jest napisana zrozumiałym i poprawnym językiem, choć Autorka nie ustrzegła się przed paroma niezręcznościami, błędami gramatycznymi i interpunkcyjnymi. Na przykład źle brzmi znajdujące się na stronie 13 sformułowanie: „Pacjentki z tym zdiagnozowanym podtypem mają dłuższe przeżycie wolne od choroby”. Natomiast zdanie ze strony 32: „Zapewnia to wytrzymałość przemieszczających się struktur oraz umożliwia na powstanie w wyłonieniu się wielu form migrujących zbiorowo komórek epitelialnych...”, zapewne wymknęło się korektom tekstu pracy. Ponadto podczas lektury rozprawy odniosłam wrażenie, że Doktorantka ma tendencję do nadużywania przyimka ‘dla’. Dla przykładu, na stronie 89 w jednym zdanie przyimek ten został użyty czterokrotnie: „...wykonano preparaty fluorescencyjne dla testu rysy dla punktów czasowych: 0h, 4h, 14h, 24h dla linii z wyciszoną ekspresją genu *HAX1* i dla linii kontrolnej”. Chociaż zdanie to jest zrozumiałe, to może drobna korekta poprawiłaby tekst pod względem językowym.

#### 4. Podsumowanie

Przedłożona do oceny rozprawa jest interesującym studium nad mechanizmami regulacji procesów migracji komórek raka piersi przez białko HAX1. Doktorantka wykazała się umiejętnością stawiania pytań i rozwiązywania naukowych problemów oraz prowadzenia eksperymentów z użyciem hodowli komórkowych i technik mikroskopowych.

Stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Śmietanki spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
prof. dr hab. Joanna Moraczewska