

Dr hab. Joanna Kamińska
Pracownia Genetyki i Biologii Molekularnej Drożdży
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa; ul. Pawińskiego 5a

Warszawa, 05.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Śmietanki zatytułowanej: „Wpływ białka Hax1 na migrację kolektywną, adhezję komórka-komórka oraz mechanizm przerzutu nowotworowego w różnych podtypach raka piersi.”

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii – Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Ewa Grzybowska, profesor Instytutu. Dysertacja dotyczy białka Hax1, które jest od kilkunastu lat obiektem zainteresowania naukowego Pani Promotor. Poznanie funkcji tego białka jest istotne z powodów medycznych, gdyż mutacje w genie *HAX1*, kodującym to białko zostały opisane jako powodujące rzadką chorobę genetyczną - wrodzoną neutropenię (chorobę Kostmanna) oraz zaburzenia poznawcze, a zwiększony poziom białka Hax1 opisano między innymi w różnych typach nowotworów.

Ten ostatni wymieniony aspekt jest podstawą prac prowadzonych w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, a wykonane przez mgr Urszulę Śmietankę i zaprezentowane w rozprawie doktorskiej doświadczenia stanowią ich fragment. Dotyczą one wpływu wyciszenia ekspresji genu *HAX1* na wybrane fenotypy związane z migracją komórek w trzech różnych liniach komórkowych wyprowadzonych z komórek pobranych od pacjentek z różnymi typami raka piersi.

Praca doktorska ma typowy układ dla prac eksperymentalnych. Pracę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis skrótów. Następnie Doktorantka zamieściła wstęp dotyczący tematyki pracy i obejmujący dwa główne elementy. Pierwsza część dotyczy nowotworów, szczególnie zaś nowotworów piersi – charakterystyki ich typów i ogólnie mechanizmów powstawania przerzutów, migracji komórek i typów komórek nowotworowych krążących w organizmie. Druga część wstępu to przedstawienie wiedzy na temat białka Hax1, jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej, oddziaływań z innymi białkami, wpływu na różnorodne procesy komórkowe oraz na temat jego udziału w patogenezie chorób genetycznych i w nowotworach. Wstęp jest bardzo dobrze napisanym rozdziałem. Czyta się go lekko i z przyjemnością. Jednakże w tej części pracy zabrakło mi krótkiego przedstawienia białek septyn i bardziej rozbudowanego opisu udziału szkieletu aktynomiozynowego w procesach generowania siły motorycznej, napięcia i transdukcji tego napięcia między komórkami. Przykładowo opis mógłby bazować na artykułach przeglądowych opublikowanych w *Current Biology* [Vol. 31, (10)] w 2021 roku. Brak ten odczuwa się przy przejściu do analizy otrzymanych wyników i dyskusji.

W drugim rozdziale Autorka przedstawiła założenia i cel swojej pracy. Określiła, że ogólnym celem Jej pracy jest „wyjaśnienie niektórych aspektów wpływu braku białka Hax1 na progresję w raku piersi”. W celu realizacji tego zamierzenia Doktorantka postanowiła:

1. przetestować wpływ białka Hax1 na adhezję komórka-komórka i na migrację komórek linii komórkowych wyprowadzonych z różnych typów raka piersi,
2. poszukać jaki jest mechanizm działania białka Hax1 na migrację kolektywną komórek,
3. opisać jaki jest wpływ wyciszenia *HAX1* na proces entozy,
4. oszacować poziom białka Hax1 w komórkach nowotworowych krążących w krwi obwodowej pacjentek z rakiem piersi i określić status zróżnicowania epitelialno-mezenchymalnego tych komórek.

Do realizacji celów doktorantka zastosowała różnorodne metody, które zostały opisane szczegółowo w kolejnym rozdziale Materiały i Metody. Dobór tych metod jest adekwatny do zamierzonych celów. Kolejny rozdział zawiera opis wyników wielowątkowych badań przeprowadzonych przez Doktorantkę które pozwoliły na stwierdzenie, że:

1. Wyciszenie ekspresji genu *HAX1* ograniczyło migrację komórek o fenotypie epitelialnym, ale nie mezenchymalnym w dwóch typach testów – w teście zarastania i w teście rysy.
2. Wyciszenie ekspresji genu *HAX1* nie wpłynęło natomiast na migrację pojedynczych komórek badaną testem przechodzenia przez pory, zarówno w komórkach o fenotypie epitelialnym jak i o fenotypie mezenchymalnym.

Wyniki te stanowiły podstawę wywnioskowania, że białko Hax1 jest istotne dla migracji kolektywnej komórek. W dalszej części pracy Doktorantka zajęła się poszukiwaniem mechanizmu wpływu białka Hax1 na ten typ migracji. W związku z tym, że migracja kolektywna komórek wymaga istnienia połączeń międzykomórkowych, regulacji przylegania komórek do podłoża i jest zależna od procesów przebudowy cytoszkieletu aktynomiozynowego, który odpowiada za tworzenie struktur istotnych dla przemieszczania się komórek, Doktorantka oceniła:

1. wygląd warstwy komórek linii o fenotypie epitelialnym z wyciszonym genem *HAX1*,
2. określała lokalizację białek charakterystycznych dla połączeń międzykomórkowych takich jak desmosomy, połączenia przylegające i połączenia ściste, odpowiednio plakoglobiny, E-kadheryny i kładyn 2 i 5 używając w tym celu techniki immunofluorescencji pośredniej,
3. wybarwiała cytoszkielet aktynowy i obserwowała zmiany jego organizacji. Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe pokazały: zmienione ułożenie komórek z wyciszonym genem *HAX1* w obrębie warstwy oraz zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego, tj. grubsze włókna spolimeryzowanej aktyny.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie wpływu trzech związków chemicznych wpływających na kurczliwość cytoszkieletu aktynomiozynowego. Badania pokazały, że użycie inhibitora wiązania miozyny z aktyną lub inhibitora kinazy ROCK, aktywującej polimeryzację aktyny, poprawia migrację komórek, w testach rysy i zarastania oraz przywraca częściowo regularność ułożenia komórek w warstwie. Natomiast zastosowanie inhibitora septyn w komórkach kontrolnych tj. bez wyciszenia genu *HAX1* dawało taki sam efekt jak wyciszenie tego genu. Uzyskany wynik dotyczący działania inhibitora miozyny na normalizację fenotypów komórek z wyciszonym *HAX1* skłonił Doktorantkę do sprawdzenia poziomu fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny II, formy aktywnej miozyny w procesie generowania siły motorycznej.

Doktorantka w trakcie eksperymentów scharakteryzowała również badane komórki pod kątem częstotliwości zajścia procesu entozy, który to proces warunkowany jest działaniem włókien aktynomiozyny oraz sprawdziła wpływ wcześniej testowanych inhibitorów oraz transformującego czynnika wzrostu beta na ten proces. Część dotyczącą charakterystyki komórek linii wyprowadzonych z raka piersi w której wyciszano gen *HAX1* zawiera jeszcze analizę wpływu tego wyciszenia na tworzenie sfer w hodowlach 2D, przeżywalność komórek w warunkach braku przylegania do podłoża oraz analizę poziomu białek markerowych przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Ostatnią zamierzoną częścią eksperymentalną pracy była analiza poziomu białka Hax1 i markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego w linii komórkowej wyprowadzonej z komórki nowotworowej krążącej w krwi obwodowej pacjentki oraz bezpośrednio w komórkach nowotworowych wyizolowanych z krwi 36 pacjentek leczonych w NIO-PIB. Doktorantce udało się wyizolować stosując metodę Screen Cell pojedyncze krążące komórki nowotworowe i ich klastry z krwi tylko 6 pacjentek. Dalsze badania sugerowały, że te komórki prawdopodobnie uległy uszkodzeniu. Doktorantka w tej części borykała się z problemami technicznymi pracy z materiałem od pacjentek i brakiem opracowanych procedur. Pomimo, że Autorce nie udało się zrealizować do końca zamierzeń tej części pracy to uważam, że opisanie niepowodzenia ma wysoki walor edukacyjny dla kolejnych osób, które zajmować będą się dalszymi badaniami. Jest to też podstawa do opracowywania techniki, która pozwoli wydajnie izolować komórki nowotworowe z krwi pacjentów i następnie je charakteryzować.

Większość wyników przedstawionych w rozprawie została otrzymana w trakcie wielokrotnie powtórzonych eksperymentów i opracowana statystycznie. Ciąg przeprowadzonych eksperymentów nie budzi zastrzeżeń.

Do przedstawionych wyników mam następujące uwagi i pytania:

Rycina 8 – jakie przeciwciała zostały użyte do uwidocznienia białka Hax1 i Hax1-Flag? Czy znacznik Flag jest na N czy na C końcu białka? Z opisu w tekście wynika, że na N końcu, a na rycinie jest napisane, że na C końcu. Czy zapis Flag Flag oznacza dwukrotnie powtórzoną sekwencję kodującą znacznik Flag? Nie jest to dla mnie jasne. Autorka nie skomentowała też faktu, że nadprodukcja Hax1-Flag skutkuje zwiększonym poziomem endogennie kodowanego Hax1.

Czy wiadomo dlaczego kształt komórek MCF7 Kontrola#1 i MCF7 Kontrola-sh przedstawionych na Rycinach 20 i 21 różni się. Komórki MCF7 Kontrola-sh na Rycinie 20 są większe, a na Rycinie 21 ułożone bardziej nieregularnie.

Niejasne jest dla mnie sformułowanie: „zaobserwowano zmiany w znakowaniu dla plakoglobiny i E-kadheryny” (str. 86). Treść zdania sugeruje problem techniczny ze znakowaniem. Jednakże przypuszczam, że Autorka miała na myśli albo zmiany poziomu intensywności sygnału fluorescencyjnego, albo zmiany w rozmieszczeniu tego sygnału na obrazach. Proszę o wyjaśnienie.

Opisując wynik przedstawiony na Rycinie 21 Doktorantka odniosła się tylko do zmian w wyglądzie włókien naprężeniowych panel B. Przedstawione w panelu A zdjęcia pokazujące wygląd włókien aktyny korytkalnej w komórkach z wyciszonym na dwa różne sposoby (z użyciem siRNA i shRNA) genem *HAX1* różnią się między sobą i w stosunku do kontroli bez wyciszenia. Proszę o komentarz. Jeżeli chodzi o włókna naprężeniowe to Autorka pisze, że po wyciszeniu *HAX1* są one dłuższe. Nie jest to fortunne określenie. Lepszym określeniem jest to użyte w publikacji w MBC, w której Doktorantka jest współautorem. Są one tam określane jako lepiej uwidaczniające się. Należy bowiem pamiętać, że w mikroskopie nie zaobserwujemy

pojedynczych włókien, a dopiero ich wiązki. Jeżeli końce wiązki stanowią pojedyncze włókna to ich nie widzimy. Natomiast jeżeli składają się one z wielu włókien, są grubsze, to wtedy uwidaczniają się i wiązka wydaje się dłuższa. Ewidentnie na przedstawionym zdjęciu widać grubsze wiązki aktynowe w komórkach z wyciszonym *HAX1* dlatego sugeruję sprawdzenie stosunku poziomów G i F-aktyny w badanych układach, np. przez wirowanie różnicowe.

W tytułach rozdziałów 5.5, 5.6 i 5.6.1 brak jest określenia jakich inhibitorów wpływ był badany.

Jak poprawnie po polsku nazywa się inhibitor blebistatyna czy blebbistatyna? Po angielsku jest z podwójnym „b”, w tekście pracy Autorka skłania się do pisowni z pojedynczym „b”, jednak na Rycinie 30 umieściła napis blebbistatyna.

Na rycinie 35 Autorka analizuje metodą western blot poziom ufosforylowanej formy miozyny II, wyniku tego nie był kwantyfikuje i wyciąga wniosek, że po wyciszeniu genu *HAX1* jest więcej formy ufosforylowanej. Zabrakło mi tu analizy nie poziomu samej ufosforylowanej miozyny między badanymi próbkami, ale porównania stosunku poziomów miozyny ufosforylowanej do nieufosforylowanej w badanych próbkach. Taka analiza dopiero pozwoli powiedzieć, czy jest więcej aktywnej (ufosforylowanej) miozyny.

Na Rycinie 37B obraz warstwy komórek kontrolnych różni się od tego prezentowanego na wcześniejszych rycinach. Zabrakło mi tu zdania wyjaśnienia dlaczego tak jest.

Nie rozumiem sformułowania 4-6 obrazów na 100 komórek (strona 112) i 11-12 obrazów na 100 komórek (strona 113), 11 obrazów na 100 komórek (strona 114). Ile komórek policzono?

Strona 113 nie podano co to jest TGFβ.

Ad Rycina 40A i 40C - Jak ma się wynik z części A do tego co zaprezentowane w części C? Dlaczego ilość entoz dla mieszanej kultury kontrola/kontrola (37%) jest wyższa niż dla próbki miHAX1/miHAX1 (24%), gdy w panelu A ilość entoz dla kultury z wyciszonym *HAX1* jest większa niż dla kontroli?

Strona 116 niepotrzebnie wprowadzono nazwę typ 3, skoro potem jest wytłumaczenie. Prościej byłoby od razu napisać, że chodzi o komórkę z wyciszonym *HAX1* w komórce kontrolnej. Wcześniej nie ma opisu żadnych typów.

Rycina 44 – nie widać na membranie sygnału od wimentyny, czy tak ma być, czy to jest kwestia jakości wydruku?

Rycina 46 – brak jest podziału na część A i część B, a taki podział sugeruje podpis.

Kolejny rozdział to Omówienie wyników i dyskusja. Ze względu na wiele sposobów działania białka Hax1 na komórki poprowadzenie Dyskusji było trudne. Autorka zdecydowała się na przedyskutowanie wpływu wyciszenia genu *HAX1* oddzielnie na poszczególne badane fenotypy odnosząc się do wyników badań już opublikowanych. Takie poprowadzenie dyskusji spowodowało, że nie dowiedziałam się, co Autorka uważa, za najważniejsze osiągnięcie swojej pracy. Wszystkie opisane fenotypy wydają się być jednakowo cenne. Moja uwaga krytyczna do Dyskusji dotyczy schematu przedstawionego na Rycinie 52. Zabrakło na nim odniesienia do faktu, że septyny a dokładnie septyna9_{i1} reguluje aktywność min. kinazy ROCK (Zeng et al. Cell Death and Disease (2019) 10:720 <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1947-9>) co wpływa na cytoszkielet aktynowy. Oprócz tej jednej uwagi Dyskusja nie budzi moich zastrzeżeń.

W końcowej części rozprawy znajduje się rozdział Wnioski, w którym Autorka wypunktowała osiągnięcia swojej pracy oraz spis bibliografii obejmujący 332 pozycje.

Dysertację kończy rozdział 9 zawierający dodatkowe 3 ryciny na których przedstawiono wynik analizy western blot stanowiący kontrolę poziomu wyciszenia *HAX1* w testowanych liniach i klonach, oraz barwienia metodą May Grunwald Giemsa i fluorescencyjnego preparatów uzyskanych z materiału pobranego od pacjentek.

W warstwie edytorskiej praca zawiera pojedyncze błędy literowe oraz niefortunne sformułowania i nieścisłości, jak:

Str. 39 „zrzucić klastery CTC do krwioobiegu”

Str. 40 Dynabeads jest ogólnym określeniem kulek magnetycznych, a nie metodą

Str. 69 „wyprowadzono [...] odpowiednią linię kontrolną w linii komórkowej MDA-MB-231.”

Str. 70 „AraC działa poprzez bezpośrednią inkorporację do DNA, wykazując specyficzność względem fazy S.”

Str. 85 – niedokończone zdanie na górze strony

Str. 128 – wyrażenie „barwienia epitelialno-mezenchymalnego” jest skrótem myślowym

Str. 138 Nie rozumiem fragmentu zdania „znaczenie dla zrozumienia różnych procesów fizjologicznych i komórkowych m.in. takich jak [...] inżynieria komórkowa...”.

Str. 143 „ GTPazy septynowe”

Str.146 „gęstsze [...] włókna naprężeniowe”

Str.151 „status białka Hax1” – niejasne czy chodzi o poziom Hax1, jego lokalizację, oddziaływania

Wymienione nieścisłości nie zmniejszają wartości rozprawy. Uważam, że Autorka dokonała szeregu obserwacji, które poszerzają naszą wiedzę o działaniu białka Hax1 w regulacji migracji komórek przez wpływ na cytoszkielet aktynomiozyny. Stanowią one cenną bazę pod dalsze prace, już czysto z zakresu biologii komórki, które pozwolą zdeterminować mechanizmy wpływu białka Hax1 na organizację cytoszkieletu aktynowego, a co za tym idzie na migracje komórek. O jakości przeprowadzonych prac najlepiej świadczy fakt, że otrzymane w ich trakcie wyniki weszły w skład dwóch publikacji, pracy eksperymentalnej opublikowanej w 2019 w renomowanym czasopiśmie *Molecular Biology of the Cell* (MBC) oraz pracy metodologicznej z 2020 roku opublikowanej w *Journal of Visualized Experiments* (JoVE). Dodatkowo warto zwrócić uwagę, że Doktorantka ma w swoim dorobku jeszcze jedną pracę, która ukazała się w 2021 w *Journal of Translational Medicine*.

Podsumowując moja ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Śmietanki jest pozytywna. Stwierdzam, że rozprawa doktorska 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 ze zm.). Składam więc wniosek Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Śmietanki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Joanna Kamińska