

Dr hab. Beata Burzyńska, profesor IBB PAN

Tel. 48 22 592 12 14, email: atka@ibb.waw.pl

Warszawa, 21.11.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Sylwii Tabor

pt. „**Wpływ białka HAX1 na ścieżkę sygnałową estrogenu i progresję w luminalnym raku piersi**”

wykonaną pod kierunkiem dr hab. n. med. Ewy Grzybowskiej

w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie -

Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie

HAX1 (*HCLS1-associated protein X-1*) jest białkiem o działaniu antyapoptotycznym wykazującym ekspresję w różnych tkankach. Białko HAX1 bierze udział w wielu procesach i funkcjach komórkowych, w tym w regulacji apoptozy, proliferacji komórek, adhezji i migracji komórek, endocytozy, autofagii, biogenezy rybosomów i metabolizmie mRNA. Coraz więcej badań potwierdza, że HAX1 wykazuje wysoką ekspresję lub nadekspresję w różnych typach nowotworów, która skorelowana jest z gorszymi wynikami leczenia. Zaangażowanie HAX1 w hamowanie apoptozy i migrację komórek - procesami kluczowymi dla nowotworzenia i tworzenia się przerzutu nowotworowego - sugeruje, że nadekspresja HAX1 w nowotworach może promować przeżycie komórek i zwiększać potencjał inwazyjny komórek złośliwych. Białko HAX1 jest nie tylko ściśle związane z patogenezą nowotworów złośliwych, mutacje w genie kodującym to białko zidentyfikowano u pacjentów z rzadką chorobą genetyczną - wrodzoną neutropenią (Zespół Kostmanna).

Praca eksperymentalna lek. Sylwii Tabor powstała w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej NIO-PIB, w którym od szeregu lat prowadzone są badania nad biologiczną funkcją i rolą białka HAX1 w patogenezie chorób nowotworowych.



Doktorantka postawiła sobie ambitny cel określenia wartości prognostycznej i predykcyjnej białka HAX1 w komórkach luminalnego raka piersi. Badania zostały przeprowadzone w dwóch częściach: klinicznej i doświadczalnej. Pierwszy etap obejmował analizę statystyczną wyników badań immunohistochemicznych tkanek pochodzących z guza pierwotnego oraz danych klinicznych. Próbkę pochodziły od 23 chorych bez przerzutów odległych i od 23 chorych, u których zdiagnozowano przerzuty odległe w czasie dziewięcioletniej obserwacji. Zastosowano ściśle określone kryteria włączenia/wyłączenia z badania. Drugą, niezależną grupę stanowiły próbki od 90 chorych (48 chorych bez przerzutów i 42 chorych z przerzutami), do których zostały zastosowane te same kryteria kliniczne. W tym miejscu należy podkreślić znaczenie wykonania tych samych badań na niezależnej grupie walidacyjnej, co zdecydowanie wzmacnia otrzymane wyniki.

Druga część Rozprawy przedstawia prace eksperymentalne, wykonane przy wykorzystaniu zmodyfikowanych linii komórkowych, mające na celu zbadanie wpływu poziomu ekspresji białka HAX1 na stymulację hormonalną oraz na ekspresję genów związanych ze szlakami sygnałowymi estrogenu.

Rozprawa została przygotowana w formie klasycznego manuskryptu i jest napisana w języku polskim z wyjątkiem streszczenia, które zostało napisane także w języku angielskim. Manuskrypt wraz z bibliografią liczy 121 stron i składa się z XI rozdziałów. Praca została przygotowana starannie i jest napisana poprawnym językiem. Natomiast, brakuje mi spisu publikacji naukowych, które powstały przy współautorstwie Doktorantki w okresie realizacji rozprawy doktorskiej.

Wprowadzenie zostało podzielone na dwie części. W części pierwszej przedstawiony jest stan wiedzy na temat białka HAX1, ze szczególnym naciskiem na jego rolę w procesie nowotworzenia. Część druga koncentruje się na raku piersi: epidemiologii, charakterystyce podtypów biologicznych, strategii leczenia oraz omawia testy wielogenowe stosowane w stratyfikacji chorych, które umożliwiające leczenie spersonalizowane. W następnym rozdziale został przedstawiony jasno sprecyzowany **cel pracy**. **Część metodyczna** w obszerny sposób opisuje materiały oraz metody wykorzystane w badaniach. W sposób dokładny przedstawione są metody immunohistochemiczne, które zostały użyte do badania poziomu białka w preparatach skrawków guza utrwalonych w formalinie. Kolejno Autorka opisuje warunki hodowli linii komórkowych i procedurę testów żywotności (MTT), natomiast metodyka wyprowadzania linii o obniżonym poziomie białka HAX1 znajduje się w części rozprawy poświęconej wynikom, co jest dla mnie niezrozumiałe. Pozostała część Materiałów i Metod to opis reakcji qPCR oraz listy genów wchodzących w skład panelu komercyjnego jak i panelu zaprojektowanego przez Doktorantkę.

Osobnym rozdział stanowi **Charakterystyka badanych chorych**, z podziałem na Grupę pilotażową i Grupę rozszerzoną. W rozdziale tym Autorka zawarła kliniczną charakterystykę pacjentów, a także analizuje rozkłady typów histologicznych nowotworów oraz stopień zaawansowania pooperacyjnego w badanych grupach. W rozdziale **Wyniki** zostały wyodrębnione dwie części: kliniczna i eksperymentalna. Część kliniczną Doktorantka rozpoczyna od bardzo interesującej analizy danych pochodzących z wielkoskalowych eksperymentów mikromacierzowych, zamieszczonych w dostępnych bazach Gene Expression Omnibus (GEO) oraz National Center for Biotechnology Information (NCBI). Autorka uwzględniła dane z 35 kohort i wykazała, że ekspresja genu *HAX1* jest skorelowana z predykcją czasu przeżycia, głównie u chorych z dodatnią ekspresją receptorów estrogenowych. ***W tej części zabrakło mi dokładniejszego omówienia otrzymanych wyników, jak choćby bardziej indywidualnego przeanalizowania wyników z poszczególnych kohort oraz próby odpowiedzi na pytanie dlaczego wyniki w poszczególnych kohortach są zróżnicowane.*** W kolejnych podrozdziałach przedstawione są wyniki badań immunohistochemicznych białka HAX1 w materiale tkankowym, pobranym od chorych z przerzutami odległymi lub bez przerzutów w grupie pilotażowej oraz w grupie walidacyjnej. Oznaczenia te zostały wykonane w cytoplazmie i jądrze oraz w stosunku do całkowitego poziomu białka HAX1. Otrzymane wyniki wykazały podwyższony poziom cytoplazmatycznego oraz całkowitego białka HAX1 u chorych, u których w okresie obserwacji zaobserwowano przerzuty odległe w porównaniu do chorych bez stwierdzonego nawrotu. W obu badanych grupach wykazano, że podwyższony poziom całkowitego i cytoplazmatycznego białka HAX1 jest negatywnym czynnikiem prognostycznym i jest skorelowany z krótszym czasem przeżycia od nawrotu odległego i czasem przeżycia całkowitego, szczególnie w ER-dodatnim raku piersi. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w czasie przeżycia bez nawrotu i w czasie przeżycia całkowitego w przypadku podwyższonego poziomu jądrowego HAX1.

Część eksperymentalna Wyników zawiera wyniki badań, których celem było wyjaśnienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wpływ białka HAX1 na rozwój nowotworu oraz jego przerzutowanie. Do badań tych wykorzystano linię MCF-7 estrogenozależnego raka piersi, niewykazującą ekspresji *HAX1*, oraz linie w których próbowano wyciszyć gen *HAX1* dwoma metodami. Ponieważ nie udało się wyciszyć *HAX1* metodą CRISPR/Cas9, do dalszych badań wykorzystano linie, w których wyciszenie uzyskano wykorzystując krótkie RNA (siRNA i shRNA). ***Poprosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego jej zdaniem wyciszenie ekspresji genu HAX1 za pomocą metodą CRISPR/Cas9 się nie powiodło.*** Skonstruowane linie komórkowe zostały następnie wykorzystane do badania wpływu ekspresji genu *HAX1* na stymulację hormonalną i aktywność cytotoksyczną związków o działaniu antyestrogenowym.



Doktorantka wykazała, że stymulacja progesteronem prowadzi do wzrostu wartości MTT w liniach kontrolnych, natomiast w liniach z wyciszonym genem *HAX1* nie uzyskano tego efektu. W kolejnym kroku postanowiono zbadać czy poziom ekspresji genu *HAX1* ma wpływ na ekspresję genów związanych ze ścieżką sygnałową estrogenu. W tym celu wykorzystano komercyjne panele ekspresyjne oraz panele samodzielnie zaprojektowane, zawierające geny wyselekcjonowane na podstawie informacji funkcjonalnych uzyskanych z genetycznych baz danych. Oba panele zawierały także 4 geny referencyjne. ***Dlaczego więc ekspresja HAX1 była szacowana w stosunku do genu o najniższej ekspresji?*** Wykazano, że zmiany w ekspresji genu *HAX1*, mają wpływ na ekspresję niektórych genów ścieżki estrogenowej. Choć otrzymano spójne wyniki dla badanych linii, niestety nie były to wyniki statystycznie istotne. Zapewne dlatego, Doktorantka podkreśla, że są to wyniki wstępne i wymagają potwierdzenia w dalszych eksperymentach.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka omawia własne wyniki na tle literatury przedmiotu. Dyskusja jest obszerna i została podzielona na podrozdziały. Uważam jednak, że w części tej Autorka zbyt wiele miejsca poświęca omówieniu własnych wyników. Dwa ostatnie rozdziały to podsumowanie i wnioski, streszczenie rozprawy oraz spis literatury liczący 77 pozycji.

W przedstawionej do oceny Rozprawie Doktorantka pokazała wiele wartościowych wyników dotyczących zarówno analiz klinicznych jak i badań eksperymentalnych. Część z tych wyników została już opublikowana, natomiast ***czy pozostałe wyniki zawarte w tej Rozprawie będą także przedmiotem dalszych publikacji?***

Uwagi szczegółowe:

- Wykaz stosowanych skrótów nie jest kompletny. Szczególnie brakuje rozwinięcia skrótów, powszechnie używanych w onkologii (np. Rak piersi NOS, Stan PgR), ale nie tylko (np. ANOVA). Ponadto, uważam, że nadmierne używanie skrótów w treści Rozprawy, utrudnia śledzenie tekstu, szczególnie osobom niezwiązanym bezpośrednio z tematyką onkologiczną
- Str. 16 - prawidłowa nazwa angielska ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy to quantitative polymerase chain reaction, qPCR
- Rycina 9 i 10 - powinny być dokładniej opisane i wyjaśnione w tekście
- Rycina 39 -zazwyczaj poziom badanego białka jest standaryzowany do białka odnośnikowego. Czy w tym przypadku zastosowano ładowanie takich samych objętości/ilości białka?



WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa doktorska lekarz Sylwii Tabor „Wpływ białka HAX1 na ścieżkę sygnałową estrogenu i progresję w luminalnym raku piersi” spełnia wymagania i warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie o dopuszczenie Pani lek. Sylwii Tabor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Beata Burzyska