



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI

KIEROWNIK ZAKŁADU

PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Makowieckiej pt. „Wpływ żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ na inwazyjność komórek czerniaka”

Zdolność do generowania aktywnego ruchu należy niewątpliwie do jednej z najbardziej charakterystycznych cech organizmów żywych. Aktywny ruch przejawia się na bardzo wielu poziomach organizacyjnych, od poziomu molekularnego zaczynając, na ruchu całych organizmów a nawet populacji kończąc. Oprócz licznych procesów fizjologicznych, w których ruch komórek jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, aktywne przemieszczanie komórek ma również miejsce w wielu procesach patologicznych. Szczególną rolę migracja komórek odgrywa w procesie tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe. Zdolności do niekontrolowanej migracji komórek nowotworowych jest jedną z podstawowych właściwości umożliwiających nowotworom złośliwym naciekanie sąsiednich tkanek oraz tworzenie odległych przerzutów będących, w stopniu daleko wyższym niż sam niekontrolowany wzrost, przyczyną śmiertelności pacjentów obarczonych chorobą nowotworową. Aktywne przemieszczanie się komórek nowotworowych jest niezbędne w większości wyróżnionych etapów tworzenia przerzutów zaczynając od lokalnej inwazji i przeniknięcia przez błony podstawne, poprzez migrację w trójwymiarowej przestrzeni macierzy zewnątrzkomórkowej, pokonanie bariery stawianej przez ściany naczyń krwionośnych lub limfatycznych w procesach przenikania do ich wnętrza, a następnie ich opuszczania, aż do migracji w obrębie kolonizowanego organu, w którym rozwiną się guzy wtórne. Znaczenie aktywnej migracji komórek nowotworowych w procesie tworzenia przerzutów nie budzi obecnie wątpliwości i wiele badań wskazuje na istnienie korelacji pomiędzy aktywnością ruchową komórek nowotworowych a ich zdolnością do tworzenia przerzutów. Poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację tych procesów jest niewątpliwie warunkiem koniecznym do opracowania nowych terapii umożliwiających zahamowanie tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe. W świetle współczesnej wiedzy bardzo istotną, o ile nie podstawową, rolę w generowaniu ruchu komórki odgrywa aktyna. Nic więc dziwnego, że badania roli białek regulujących funkcje aktyny w komórce budzą duże zainteresowanie. Niewątpliwie białkami należącymi do tej grupy są żelsolina

i tymozyna $\beta 4$. Dotychczasowe badania nie pozwalają na stwierdzenie prostej korelacji pomiędzy aktywnością ruchową komórek nowotworowych a poziomem ekspresji tych białek. Doniesienia dotyczące badań różnych typów nowotworów prowadzą często do zupełnie odmiennych wniosków. Z tego względu znaczenie tych białek dla inwazyjności i migracji komórek jest interesującym tematem badawczym, którego podjęcie wydaje się jak najbardziej uzasadnione.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Makowieckiej była próba ustalenia roli żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w progresji czerniaka, a w szczególności ich wpływu na migrację komórek, aktywność adhezyjną oraz przejście epitelialno-mezenchymalne. Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani Prof. Doroty Nowak. Praca została zatem przygotowana w Zespole który od wielu lat zajmuje się tematyką znaczenia ekspresji różnych izoform aktyny oraz białek oddziałujących z aktyną w procesie wzrostu nowotworu i procesach tworzenia przerzutów.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 160 stron. W tekście zamieszczono 60 rycin, 18 tabel i cytowano 236 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani Aleksandry Makowieckiej ma typowy dla tego typu opracowań układ. W 30 stronicowym bogato ilustrowanym „Wstępie” autorka przedstawiła starannie przygotowany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. Wstęp doktorantka rozpoczyna od podania podstawowych informacji dotyczących biologii melanocytów a następnie omawia zmiany zachodzące w komórce podczas nabywania przez nią cech umożliwiających tworzenie przerzutów. Szczególną uwagę Autorka zwraca na rolę cytoszkieletu aktynowego w procesie nowotworzenia oraz jego rolę w procesach migracyjnych. Wstęp kończy podrozdział dotyczący żelsoliny i tymozyny $\beta 4$.

Wstęp napisany jest przejrzysto i dobrze wprowadza czytelnika do zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej. Dyskusyjna jednak wydaje mi się sugestia, że ruch ameboidalny związany jest jedynie z tworzeniem wypustek pęcherzykowatych typu „blebbs”. Wydaje mi się, że jest to tylko jedna z możliwości wytwarzania wypustek przez komórki migrujące ruchem ameboidalnym. Ten rodzaj ruchu może być również związany z tworzeniem pseudopodiów w wyniku polimeryzacji aktyny. Znacznie bardziej wolę również stosowanie terminu zahamowanie kontaktowe niż inhibicja kontaktowa (str. 15)

W rozdziale „Materiały i metody” autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. W swoich badaniach doktorantka wykorzystwała szereg metod zarówno biochemicznych jak i biologicznych, które są bez wątpienia właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń. Do nielicznych i drobnych uchybień i nieścisłości, na które natrafiłem w tym rozdziale można zaliczyć stwierdzenie, że Dako Fluorescent Mounting Medium to odczynnik do utrwalania preparatów. Zastanawia również powód przyjęcia w dwugodzinnego kroku czasowego w doświadczeniach oceny aktywności migracyjnej komórek. Nawet dla bardzo wolno poruszających się komórek wydaje się on być dość długi.

W rozdziale „Wyniki” autorka przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań.. Punktem wyjścia przedstawionej pracy była analiza poziomu żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w liniach czerniaka wywodzących się z guza pierwotnego oraz uzyskanie stabilnych klonów z obniżoną ekspresją *TMSB4X* lub pozbawione GSN a następnie wykorzystanie tego modelu do zbadania roli analizowanych białek w procesie migracji i inwazji a także ich wpływu na właściwości mechaniczne komórek. Autorka wykazała w tej części pracy, że komórki linii A375 w porównaniu do komórek WM1341D charakteryzuje wysoki poziom T $\beta 4$ i niski poziom GSN. Równocześnie komórki A375 wykazywały znacząco wyższy potencjał migracyjny i inwazyjny aniżeli komórki WM1341D. Dodatkowo w komórkach A375 po obniżeniu ekspresji *TMSB4X* zaobserwowano zwiększenie zdolności migracyjnych zarówno na podłożu nieopłaszczonym, jak i pokrytym matrycelem w stosunku do komórek kontrolnych. Natomiast w komórkach pozbawionych GSN zaobserwowano przeciwny efekt. Poza tym, zarówno w klonach sh-T $\beta 4$, jak i KO GSN nastąpił znaczący spadek inwazyjności tych komórek. Wysoki potencjał inwazyjny korelował w komórkach A375 z niską wartością modułu Younga.

Ponieważ celem pracy było ustalenie roli tymozyny $\beta 4$ i żelsoliny w progresji czerniaka nasuwa się pytanie czym podyktowane było przyjęcie modelu badawczego opartego o dwie linie komórkowe (WM1341D oraz A375) wywodzące się z guzów charakteryzujących się wzrostem wertykalnym a więc będących na podobnym etapie progresji. Czy nie bardziej naturalne byłoby porównanie komórek wywodzących się z guzów będących na różnych etapach procesu progresji z prawidłowymi melanocytami? Tym bardziej jest to zastanawiające, że jak pisze sama Autorka komórki WM1341D okazały się wyjątkowo odporne na jakiegokolwiek manipulacje genetyczne i tym samym nie stanowiły dobrego modelu badawczego. Oczywiście fakt istnienia różnic w

parametrach istotnych dla procesu tworzenia przerzutów przez te komórki po części tłumaczy wybór takiego modelu badawczego, jednak porównanie ich ze wspomnianymi komórkami prawidłowymi i będącymi na innych etapach rozwoju nowotworu mogłoby przynieść ciekawe obserwacje. Prosiłbym również o wyjaśnienie jak Autorka tłumaczy występowanie znacznych różnic w aktywności migracyjnej komórek A375 (88 μm) i komórek scr (50 μm). Wydaje się to zastanawiające, szczególnie jeśli odległość przebyta przez komórki z obniżonym poziomem tymozyny wynosi 66 μm i jest to interpretowane jako zwiększenie aktywności migracyjnej (bo porównywane jest do komórek scr). Czy podobne rozbieżności pomiędzy komórkami oryginalnymi i scr obserwowano też w teście inwazyjności (z powodu normalizacji wyników trudno to oszacować)? Co ciekawe, wydaje się, że takiej rozbieżności nie było w badaniach elastyczności komórek. Za daleko idącym uproszczeniem wydaje mi się również nazywanie inhibitora kinazy ROCK inhibitorem ruchu ameboidalnego a białka Rac 1 inhibitorem ruchu mezenchymalnego. Rzeczywiście uważa się, że większą rolę w ruchu mezenchymalnym niż ameboidalnym ma białko Rac a w przypadku kinazy ROCK jest odwrotnie, jednak to nie oznacza, że białko Rac nie jest potrzebne do ruchu ameboidalnego a kinaza ROCK do mezenchymalnego. Trudno więc mówić tutaj o specyficznych inhibitorach danego rodzaju ruchu.

W drugiej części pracy Doktorantka zajęła się zbadaniem roli żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w procesie adhezji komórek czerniaka. Przeprowadzone badania wykazały, że komórki A375, adherujące do podłoża charakteryzują się zdecydowanie mniejszą powierzchnią niż komórki WM1341D. Ponieważ, stwierdzono że wielkość komórek obu linii jest zbliżona, postawiono hipotezę, że różnice są wynikiem stopnia rozplaszczenia, co potwierdził pomiar wysokości komórek przy pomocy mikroskopu sił atomowych. Autorka wykazała ponadto, że żelsolina i tymozyna $\beta 4$ zaangażowane są w adhezję komórek czerniaka. Dla porównania zdolności adhezyjnych komórek A375 i WM1341D Autorka użyła testu MTT. Jest to test metaboliczny i rzeczywiście uzyskany wynik dla danego typu komórek jest zwykle proporcjonalny do ilości żywych komórek na płytce. Jednakże niekoniecznie 10 tys komórek jednego rodzaju wygeneruje taki sam wynik tego testu jak 10 tys innych komórek. Czy wykonano testy korelujące ilość komórek A375 i WM1341D z pomiarem Absorbancji przy 550 nm?

Zastanawiające są również podane średnie powierzchnie komórek, a raczej poprawniej byłoby powiedzieć średnie rzutu powierzchni, ponieważ ten rodzaj pomiarów nie podaje całej powierzchni komórki. Przykładowo średnia wartość dla komórek A375 wynosi 31 μm^2 , podczas

gdy przedstawione fotografie wskazują, że promień tych komórek wynosi około 20 μm co wyraźnie wskazuje, że powierzchnia musi być znacznie większa.

W kolejnych doświadczeniach Doktorantka kontynuowała badania zjawisk związanych z adhezją koncentrując się na wykazaniu znaczenia żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w formowaniu struktur adhezyjnych. Ta część pracy wydaje mi się najbardziej interesującą częścią dysertacji. Autorce udało się tutaj wykazać, że żelsolina i tymozyna $\beta 4$ wchodzi w skład struktur odpowiadających za adhezję komórek czerniaka. Żesolina kolokalizuje z integryną $\beta 1$, a sygnał immunocytochemiczny jest rozproszony w ciele komórki. Dodatkowo wykazano, że żelsolina może oddziaływać pośrednio lub bezpośrednio również z winkuliną, kinazami ILK i FAK. Z kolei tymozyna występuje w ogniskach adhezyjnych, gdyż wyraźnie kolokalizuje zarówno z winkuliną oraz integryną $\alpha V\beta 3$ w tych strukturach. Peptyd ten tworzy ponadto kompleksy z winkuliną, kinazami ILK i FAK.

Ostatnia część pracy dotyczyła roli żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w przejściu epitelialno-mezenchymalnym w komórkach czerniaka oraz poszukiwaniu cech komórek macierzystych w badanych komórkach. Otrzymane wyniki wskazują, że linie czerniaka WM1341D i A375, różnią się między sobą stopniem zaawansowania przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz cechami charakteryzującymi komórki macierzyste. Komórki A375 charakteryzowały się wysokim stopniem przejścia EMT co dobrze koreluje z wcześniej przedstawionymi wynikami obrazującymi ich wysoki potencjał inwazyjny i migracyjny oraz obniżoną adhezję. W komórkach pozbawionych GSN nie stwierdzono wpływu tej zmiany na poziom białek markerowych EMT. W przypadku obniżenia poziomu T $\beta 4$ w komórkach czerniaka obserwowano spadek poziomu dwóch białek związanych z EMT SNAIL1 oraz wimentyny. Interesującą obserwacją było, że komórki pozbawione GSN charakteryzowały się większymi zdolnościami do formowania kolonii. Dodatkowo odnotowano wzrost poziomu dwóch białek powiązanych z macierzystością komórek - nanog i nestyna. Z kolei obniżenie ekspresji *TMSB4X* w komórkach czerniaka spowodowało spadek zdolności do formowania kolonii przy jednoczesnym wzroście poziomu białek nanog i nestyna. Otrzymane wyniki niewątpliwie są interesujące, jednakże po raz kolejny mamy do czynienia z jakimiś problemami ze skalowaniem pomiarów. Przedstawiając wyniki testu klonogenności Autorka podaje, że średnica typowej kolonii komórek A375 wynosi 0,174 μm a komórek WM1341D 0,0116 μm . Oczywiście nie jest możliwe, żeby kolonia komórek mogła mieć takie wymiary.

Reasumując, w przedstawionej do recenzji pracy zaprezentowano szereg ciekawych obserwacji chociaż zapewne dalecy jeszcze jesteśmy od pełnego i spójnego obrazu roli żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ w procesach tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe.

W 11 stronicowym rozdziale „Dyskusja” autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Rozprawę kończy bardzo czytelny rozdział „Podsumowanie”, w którym przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i wnioski płynące z przeprowadzonych badań.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. W całym tekście można znaleźć jedynie nieliczne uchybienia tej natury.

Przedstawione tutaj uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że prace czyta się z dużym zainteresowaniem a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania wielu nowych pytań. Pani Aleksandra Makowiecka jest ponadto współautorką 5 prac eksperymentalnych opublikowanych w dobrych czasopismach. Prace te były już ponad 20 razy cytowane w literaturze światowej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską mgr Aleksandry Makowieckiej oceniam wysoko. W moim przekonaniu autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Makowieckiej przez Wysoką Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora nauk biologicznych.


(Zbigniew Madeja)