



JAGIELLONIAN
UNIVERSITY IN
CRACOW

Kraków, 5 kwietnia 2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Gielaty, p.t. „Charakterystyka inwazyjnych komórek raka piersi z wykorzystaniem nowatorskiego systemu reporterowego α -katuliny”

Faculty of Biochemistry,
Biophysics and
Biotechnology

Prof. Jarosław Czyż

Nowotwory to obecnie jedno z najpoważniejszych wyzwań cywilizacyjnych. Jednym ze zjawisk, które mają kluczowe znaczenie dla promocji i progresji nowotworów, jest ewolucja inwazyjności komórek nowotworowych czyli sekwencja zmian ich profilu fenotypowego ułatwiająca im inwazję sąsiednich tkanek i odległych organów. Mimo wielu lat badań, mechanistyczne podłoże tego zjawiska dalekie jest od pełnego wyjaśnienia, co też stanowi jedną z przyczyn trudności w znalezieniu leków, które skutecznie przeciwdziałająby rozwojowi nowotworów w ich późniejszych stadiach. Stąd wynika intensyfikacja badań nad naturą tego zjawiska, jego „(nie)binarnością”, a także regulatorami i markerami procesów z tym związanych, w tym tzw. przejściem epithelialno-mezenchymalnym (ang. EMT). Ich znaczenie jest szczególnie istotne w przypadku powszechnie występujących typów nowotworów, które dodatkowo cechują się ciężkim przebiegiem i wysoką śmiertelnością, a do takich bez wątpienia należy rak piersi. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli białek szeroko rozumianego kompleksu powierzchniowego w regulacji potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych. Jednym z nowo odkrytych białek wchodzących w jego skład jest α -katulina, która na poziomie molekularnym jest do pewnego stopnia hybrydą α -kateniny i winkuliny, białek kluczowych dla funkcji struktur determinujących adhezję komórkową. Powiązania funkcji α -katuliny z EMT badane były już wcześniej, gdzie m. in. wykazano korelację między poziomami α -katuliny a umiejscowieniem komórek w obrębie frontu inwazyjnego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Z drugiej strony wiedza na ten temat jest wciąż fragmentaryczna, co między innymi wynika z braku odpowiednich modeli doświadczalnych.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6146
fax +48(12) 664 69 02
e-mail:
jarek.czyz@uj.edu.pl

Rozprawa doktorska p. mgr. Mateusza Gielaty stanowi kontynuację wcześniejszych badań prowadzonych przez grupę badawczą prof. Agnieszki Kobielać nad biologicznym znaczeniem α -katuliny w kontekście jej zaangażowania w progresję nowotworową. Autor skoncentrował się na funkcji α -katuliny w tworzeniu frontu inwazyjnego nowotworów piersi. Z racji częstotliwości występowania i przebiegu tej choroby jej znaczenie cywilizacyjne jest obecnie nie do przecenienia, a zaproponowana tematyka wpisuje się w aktualne trendy

badawcze. Obejmuje ona zarówno aspekty podstawowe, jak i kwestie potencjalnie kluczowe dla terapii raka piersi. Badania te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem nowego modelu doświadczalnego opartego o linie komórek raka piersi transfekowane genem kodującym GFP pod kontrolą promotora α -katuliny. Nowatorstwo ocenianej rozprawy zasadza się też na oryginalnym podejściu do analiz funkcji α -katuliny w progresji nowotworów piersi, opartym na połączeniu wydajnego systemu identyfikacji pojedynczych komórek o wysokiej ekspresji α -katuliny i analiz transkryptomicznych, a także na odniesieniu wyników tych analiz do zdolności komórek raka piersi do „mimikry naczyńiopodobnej” i roli CD44 w tym procesie.

Podstawę merytoryczną rozprawy mgr. Mateusza Gielaty tworzy jeden artykuł przeglądowy i jedna oryginalna praca doświadczalna. Obie te prace zostały opublikowane w międzynarodowym obiegu informacji naukowej w roku 2022, w czasopiśmie naukowych o ustalonej już reputacji, tj. w *International Journal of Molecular Sciences* i *Scientific Reports*. Dość wspomnieć, że sumaryczny Impact Factor obliczony dla obu tych czasopism wynosi ok. 11.2. W obu tych pracach doktorant jest 1-szym autorem, a dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów potwierdzają kluczowy wkład Doktoranta w przygotowanie prac. Warto też wspomnieć, że znaczna część wyników stanowiących trzon publikacji doświadczalnej została uzyskana w ramach dwóch projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w tym projektu Preludium 19 (Charakterystyka wolno krążących komórek nowotworowych raka piersi z wykorzystaniem sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek; Nr 2020/37/N/NZ5/03069), którego Doktorant był kierownikiem. Fakt opublikowania danych zawartych w rozprawie świadczy również o tym, że materiał doświadczalny stanowiący jej podstawę oraz spójność opisanych w poszczególnych publikacjach wyników i wykorzystywana metodologia zostały już pozytywnie ocenione przez grono ekspertów. Niemniej w czasie ich lektury nasunęło mi się kilka komentarzy i pytań, które z obowiązku recenzenta wyartykułuję w dalszej części recenzji.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Mateusza Gielaty została ujęta w 66 stron, na które składają się wykazy, informacje nt. finansowania badań, przejrzyste w odbiorze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, informacja o założeniach i celach pracy, odbitki publikacji stanowiących podstawę merytoryczną rozprawy, podsumowanie i wnioski, oświadczenia współautorów, analiza bibliometryczna i piśmiennictwo. Wstęp rozprawy przedstawiony jest na 5 stronach maszynopisu i zawiera syntezę wiedzy na temat raka piersi, roli EMT w procesach embriogenezy, utrzymywaniu homeostazy i rozwoju nowotworów oraz znaczenia mimikry naczyńiopodobnej w progresji nowotworowej. Całość została spuentowana opisem aktualnego stanu wiedzy nt. korelacji między poziomami α -katuliny a inwazyjnością komórek nowotworowych oraz rozważaniami uzasadniającymi podjęcie przez Autora tej tematyki badawczej. Uzasadnienie to opiera się na wcześniejszych doniesieniach nt. korelacji między ekspresją tego białka a inwazyjnością komórek nowotworowych. Całość ma charakter

syntetyczny i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Z obowiązku recenzenta wspomnę jednak, że za dojrzałą treścią Streszczeń i Wstępu nie zawsze nadaje się strona formalna. W rozprawie brakuje ostatniej strony pracy przeglądowej. Dało się też zauważyć stosunkowo sporą liczbę błędów i skrótów myślowych (np. „stany pośrednie charakteryzujące się cechami”, „ α -SMA – białko aktyny”, „morfologia podobna do fibroblastów”, „macierzystość nowotworowa”, etc.). Mój niepokój wzbudził też fragment, w którym Autor powiązał EMT i rozwój frontu inwazyjnego z nowotworowymi komórkami macierzystymi (str. 17). Jest to chyba zbyt daleko idące uproszczenie, gdyż cechami wyróżniającymi komórki macierzyste jest wydajna kontrola równowagi między zdolnością do samoodnowy i generowaniem heterogenego fenotypowo potomstwa (multipotencją). Brakuje dowodów, że komórki są w stanie utrzymać taki stan np. w naturalnie dynamicznym środowisku układu krwionośnego i limfatycznego. Wydaje się raczej, że komórki uczestniczące w kaskadzie metastatycznej uzyskują (lub odzyskują) cechy komórek macierzystych dopiero po zasiedleniu niszy (pre)metastatycznej. Ponadto ekspresja „markerów”, np. CD44, niekoniecznie musi implikować rzeczywisty „macierzysty” fenotyp komórek. Poza tym lektura tych fragmentów nie nasunęła mi innych merytorycznych zastrzeżeń. Dlatego w dalszej części recenzji zamierzam skoncentrować się przede wszystkim na przesłaniu uzyskanych wyników i ich możliwych konsekwencjach poznawczych.

Artykuł przeglądowy p.t. „Emerging roles of the α -catenin family member α -catulin in development, homeostasis and cancer progression” jest eleganckim studium właściwości i interaktomu α -katuliny stanowiącym syntezę aktualnego stanu wiedzy nt. możliwych funkcji tego białka w procesach rozwojowych, regulacji homeostazy (procesach regeneracyjnych) oraz inwazji nowotworowej. W pracy kolejno opisano występowanie i strukturę α -katuliny, ze szczególnym naciskiem na homologię sekwencji i struktury α -katuliny, α -kateniny i winkuliny oraz na możliwe implikacje tego faktu dla funkcji α -katuliny. W dalszej części pracy omówiony został interaktom tego białka, w tym jego strukturalne interakcje z białkami cytoszkieletu (determinujące architekturę cytoszkieletu) oraz funkcjonalne powiązania tego białka z szeregiem elementów szlaków sygnałowych, takich jak małe białka G, PI3K, Akt, GSK, NF- κ B, etc. Rzeczywiście wydają się one być kluczowe dla procesów związanych z rozwojem embrionalnym i utrzymywaniem homeostazy tkankowej, co również zostało systematycznie omówione w artykule. Wspólnym mianownikiem tych procesów pozostaje EMT, a dane opisane w tym artykule rzeczywiście uzasadniają potrzebę kontynuacji badań w kierunku analiz zaangażowania α -katuliny w tworzeniu frontu inwazyjnego nowotworów. Z tego względu praca ta jest też dobrym wstępem do części eksperymentalnej rozprawy, która została ujęta w ramy drugiego artykułu składającego się na recenzowaną rozprawę doktorską, zatytułowanego „Catulin reporter marks a heterogeneous population of invasive breast cancer cells with some demonstrating plasticity and participating in vascular mimicry” i opublikowanego w czasopiśmie Scientific Reports.

W artykule tym w sposób przekonujący opisano zaangażowanie α -katuliny w regulację potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych. Połączono w niej wykorzystanie modelu umożliwiającego identyfikację i izolację pojedynczych komórek na podstawie wysokich poziomów α -katuliny opartego o linie komórek raka piersi transfekowane genem kodującym GFP pod kontrolą promotora α -katuliny, analizy inwazyjności komórek *in vitro* i *in vivo* oraz badania transkryptomiczne. Dzięki temu wykazano zaangażowanie α -katuliny w regulację potencjału inwazyjnego pojedynczych komórek *in vivo* i *in vitro*. Jest ono obrazowane przez korelację między wysokimi poziomami α -katuliny a lokalizacją komórek we fronsie inwazyjnym guzów *in vivo* i przez spadek potencjału inwazyjnego komórek *in vitro* po wyciszeniu ekspresji α -katuliny. Ponadto analizy immunohistochemiczne skrawków ksenograftów oraz wyniki analiz transkryptomicznych wskazują na powiązania między aktywnością promotora α -katuliny i zdolnością komórek do mimikry naczyniowej.

Na podstawie uzyskanych wyników, Autor sformułował szereg wniosków, które ujął w ostatniej części rozprawy. Według nich, α -katulina odgrywa kluczową rolę w interakcjach komórek nowotworowych z ich mikrośrodowiskiem, m.in. poprzez modulację właściwości adhezyjnych komórek. Zwiększona plastyczność biomechaniczna i fenotypowa komórek nowotworowych o wysokiej ekspresji α -katuliny jest kluczowa dla ich udziału w mimikrze naczyniopochodnej i w kaskadzie metastatycznej raka piersi. Ze swej strony chcę zaznaczyć, że opracowanie systemu reporterowego opartego o transfekcję komórek raka piersi genem kodującym GFP pod kontrolą promotora α -katuliny jest znaczącym osiągnięciem metodycznym rozprawy. Dzięki niemu uzyskano bowiem możliwość śledzenia i izolacji najbardziej inwazyjnych komórek raka piersi, oraz transkryptomicznych analiz tych komórek. Pozwolił on nie tylko na identyfikację sub-populacji inwazyjnych komórek nowotworowych o wysokiej ekspresji α -katuliny, ale także umożliwił wykrycie udziału α -katuliny w regulacji inwazyjności komórek raka piersi. Z kolei powiązania między obecnością α -katuliny a zdolnością komórek do współtworzenia struktur przypominających naczynia krwionośne znacząco rozszerzają wiedzę na temat biologicznego znaczenia tego białka. Z drugiej strony, lektura i publikacji tworzących jej podstawę merytoryczną nasunęła mi też kilka pytań:

- jak już wspomniałem fakt, iż dana komórka inicjuje rozwój guza wtórnego nie musi oznaczać, że w momencie inicjacji ma ona fenotyp komórki macierzystej. Co więcej, stosunkowo wysokie poziomy CD44 dało się zaobserwować praktycznie we wszystkich komórkach z biopsji guzów (Sci. Rep.; Ryc. 7). Czy nie kłóci się to z koncepcją zakładającą, że CD44 jest markerem CSC w badanym układzie?
- na ile heterogenność komórek raka piersi pod względem ekspresji α -katuliny jest wynikiem rozwoju dyskretnych sub-populacji, wykazujących stabilne (choć różne) fenotypy, a na ile może być efektem krótkotrwałych zmian, którym podlegają komórki (np. związanych z fazami cyklu komórkowego)?

- o ile przyczynowy związek między obecnością α -katuliny a inwazyjnością komórek nowotworowych jest niezaprzeczalny, mechanizm molekularny łączący te dwie cechy fenotypowe pozostaje niejasny. W rozprawie brakuje bardziej syntetycznego ujęcia wątku wynikających z uzyskanych wyników nowych kierunków badawczych. Artykuły stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy, ze względu na niewątpliwą wagę zamieszczonych w nich wyników i ich spójność tematyczną, bez wątpienia na taką syntezę zasługują. Na przykład: czy obecność α -katuliny może wpływać na transkryptom komórek poprzez wpływ na biomechanikę cytoszkieletu i jądra komórkowego?

Podsumowując, całość rozprawy udowadnia kompetencje Doktoranta zarówno na polu metodyki badań funkcji pojedynczych białek, jak i interpretacji wyników tych badań w świetle dostępnych danych literaturowych. Ocena ta jest wspomagana faktem Jego uczestnictwa w innych publikacjach dotyczących poruszanej w rozprawie tematyki. Analizy, które stanowiły wkład Doktoranta w powstanie publikacji stanowiących podstawę rozprawy, z pewnością były żmudne i czasochłonne. Wymagają one umiejętności, doświadczenia, jak również intuicji badawczej. W pełni zgadzam się również z ogólną tezą Doktoranta, wskazującą na potencjał rozwojowy podjętej tematyki badawczej. Podsumowując, rozprawa spełnia wszelkie ustawowe wymogi rozprawy doktorskiej określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pana mgr Mateusza Gielaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę potencjał przedstawionych w rozprawie wyników i jej bogactwo metodyczne, a także dotychczasowy dorobek naukowy Autora, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Jarosław Czyż

