

dr hab., prof. UG
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 17.12.2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Kusienickiej

pt.: „Rola oksygenazy hemowej-1 w biologii komórek inicjujących czerniaka i melanogenezie”

wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Medycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

(promotor: prof. dr hab. Alicja Józkowicz)

Bohaterem przedstawionej mi do recenzji dysertacji jest enzym o nazwie oksygenaza hemowa-1 (HO-1). Białko to odgrywa ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patofizjologicznych. HO-1 katalizuje degradację hemu do tlenku węgla, jonów żelaza (II) i biliwerdyny. Ekspresja HO-1 jest indukowana nie tylko przez jej substrat hem, ale także przez promieniowanie UVA, reaktywne formy tlenu, metale ciężkie itd. Ważnym elementem indukcji tego białka jest stres oksydacyjny, przez co białko to aktywuje w komórce procesy cytoprotekcyjne oraz wpływa na angiogenezę i na odpowiedź układu odpornościowego. Udowodniono, że białko HO-1 w niejednolity sposób wpływa na aktywność różnych komórek nowotworowych. W swoich pracach Doktorantka skupiła się na badaniu roli HO-1 w czerniaku, jednym z najczęstszych i wysoce agresywnych nowotworów. Wiadomo, że w czerniaku wysoka ekspresja HO-1 zwiększa agresywność guzów nowotworowych i ich oporność na terapię. Jednak brakuje w literaturze informacji na temat roli HO-1 w melanogenezie czerniaka, a także w różnicowaniu i melanogenezie w komórkach inicjujących wzrost czerniaka (MIC). Doktorantka w swojej pracy doktorskiej postanowiła więc sprawdzić czy białko to wpływa na działanie komórek MIC oraz w jaki sposób wpływa na proces melanogenezy. Ponieważ białko HO-1 posiada bardzo wiele różnych funkcji biologicznych a komórki w których Doktorantka postanowiła zbadać jego działanie są słabo poznane to prace Doktorantki wydają się zbliżone do pracy detektywa na miarę XXII wieku. Choć zawód detektywa, kojarzy się ze starszym panem z laseczką i melonikiem, to w przypadku mgr Anny Kusienickiej przybrał on szatę białego fartucha. Doktorantka wykorzystując techniki biologii molekularnej tropiła swojego bohatera, czyli białko HO-1, na różnych szlakach komórkowych.

Rozprawa doktorska została wykonana w grupie prof. dr hab. Alicji Józkowicz na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Część prac eksperymentalnych Doktorantka wykonała podczas sześciomiesięcznego stażu na Uniwersytecie Medycznym w Wiedniu w ramach stypendium uzyskanego z NCN (projekt ETIUDA pt.: „Rola oksygenazy hemowej-1 w biologii komórek inicjujących czerniaka i melanogenezie”). Ponieważ tytuł pracy doktorskiej pokrywa się z tytułem projektu ETIUDA to trudno jest wywnioskować, która część badań została wykonana na Uniwersytecie Medycznym w Wiedniu.

Praca doktorska mgr Kusienickiej posiada układ typowy dla prac z zakresu nauk przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 162 strony maszynopisu i podzielona jest na 7 głównych rozdziałów (tj. wstęp czyli część literaturowa, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusje, podsumowanie i literaturę). Rozdziały te poprzedzone są streszczeniem w języku angielskim i polskim, podziękowaniami i informacjami na temat finansowania badań zawartych w pracy doktorskiej. Spis piśmiennictwa obejmuje 361 pozycji literaturowych a odnośniki literaturowe w zdecydowanej większości pochodzą z XXI wieku, co świadczy o aktualności podjętego tematu. Pod względem edycyjnym praca została dobrze przygotowana a zamieszczone rysunki, schematy tabele i zdjęcia bardzo pomagają w zrozumieniu uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Warto nadmienić, iż dysertacja jest napisana poprawną i przystępną angielszczyzną. W pracy znalazłam **nieliczne** błędy edycyjne i językowe (np. różna czcionka w symbolach rysunków, niska rozdzielczość schematów wektorów, za mała czcionka na niektórych wykresach, podpisy tabel znajdują się pod a nie nad tabelą). Chociaż nie jestem zwolenniczką stosowania tabeli używanych skrótów to w przypadku tej dokładnie pracy doktorskiej, ze względu na dużą ilość skrótów, tabela taka z pewnością przydałaby się. Zdaję sobie jednak sprawę że mieściłaby się ona na kilku stronach. Uwagi te w żaden sposób nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny formalnej pracy doktorskiej p. Anny Kusienickiej.

Pierwszy rozdział pracy doktorskiej to „Wstęp”, w którym Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę choroby jaką jest czerniak, czyli wywodzącego się z melanocytów nowotworu skóry, błon śluzowych i błony naczyniowej oka. Na początku przedstawiła przerażające statystyki dotyczące śmiertelności ludzi chorych na czerniaka. Następnie opisała genetyczne odmiany tego nowotworu oraz sposoby jego klasyfikacji i diagnozy. Dalej wymieniła wady i zalety stosowanych obecnie metod terapeutycznych, wskazując jednocześnie potencjalny kierunek przyszłych terapii. W kolejnym fragmencie wyjaśniła, że oporność czerniaka na terapie jest w dużej mierze związana z jego wysoką heterogennością, do której mogą prawdopodobnie przyczyniać się nowotworowe komórki macierzyste (CSC). W kolejnych podrozdziałach wyjaśniła również, że czynnikiem nasilającym powstawanie i progresję nowotworów mogą być komórki inicjujące wzrost czerniaka (MIC). Ponieważ komórki te są przedmiotem badań Doktorantki dlatego też scharakteryzowała znane markery tych komórek. W rozdziale 1.4 mgr Anna Kusienicka bardzo szczegółowo opisała funkcje biologiczne białka HO-1 oraz jego rolę w powstawaniu lub hamowaniu różnych nowotworów. Z wielkim zainteresowaniem przeczytałam rozdział o roli tego białka w indukowaniu agresywności i oporności na czerniaka pod wpływem różnych metod terapeutycznych. Nie znalazłam w tym rozdziale informacji na temat możliwego wpływu terapii z wykorzystaniem immunocheckpointów na aktywność białka HO-1 lub wpływu białka HO-1 na poziom ekspresji przez komórki czerniaka białek, tzw. punktów kontrolnych, co byłoby ciekawe w świetle stosowanych immunoterapii czerniaka. W ostatnim podrozdziale „Wstępu” Doktorantka opisała melanogenezę oraz ścieżki sygnałowe uczestniczące w tym procesie. Przedstawiła znaną rolę białka HO-1 podczas melanogenezy w zdrowych komórkach, udowadniając również, że nie ma danych na temat roli HO-1 w melanogenezie czerniaka, a także w różnicowaniu i melanogenezie komórek MIC. Lukę wiedzy w tym zakresie postanowiła wypełnić w ramach realizacji swojej pracy doktorskiej. Tą część rozprawy doktorskiej („Wstęp”) oceniam bardzo wysoko, gdyż w sposób bardzo przejrzysty wprowadza czytelnika w problematykę dysertacji. Przegląd literaturowy został dokonany niezwykle starannie. Warto dodać, że „Wstęp” recenzowanej dysertacji obejmuje aż 230 pozycji literaturowych, co świadczy o ogromie wiedzy umieszczonej na zaledwie 22 stronach. Tak doskonała kompresja danych literaturowych, połączona z prawidłowo przedstawioną hipotezą badawczą, godna jest jedynie doświadczonego detektywa molekularnego.

W kolejnej części pracy („Cel pracy”) mgr Kusienicka przedstawiła cel główny swojej pracy doktorskiej, którym była **ocena wpływu białka HO-1 na biologię komórek inicjujących czerniaka (MIC) oraz wpływu na różnicowanie i melanogenezę komórek czerniaka i melanocytów**. Do osiągnięcia zamierzonego celu wyznaczyła zadania cząstkowe, do których należało:

- (1) Ocena częstości występowania komórek MIC, zidentyfikowaną na podstawie markerów powierzchniowych i czynnościowych, w mysiej linii komórkowej czerniaka B16-F10,
- (2) Analiza wpływu HO-1 na funkcję i potencjał klonogenny komórek MIC z mysiej linii komórkowej czerniaka B16-F10 hodowanych *in vitro*,
- (3) Ocena wpływu HO-1 na rakotwórczy potencjał *in vivo* komórek MIC z mysiej linii komórkowej czerniaka B16-F10 przy użyciu seryjnych przeszczepów do syngenicznych immunokompetentnych dawców,
- (4) Zbadanie wpływu HO-1 na różnicowanie i pigmentację komórek MIC oraz ogólnej populacji komórek czerniaka B16-F10, melanocytów i indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) zróżnicowanych w kierunku melanocytów.

Kolejny rozdział pracy, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktorantkę podzielony na 42(!) części (26 stron), nie licząc podrozdziałów, które w pełni oddają olbrzymią ilość i różnorodność technik badawczych zastosowanych w recenzowanej dysertacji. Pani mgr Kusienicka zastosowała w mojej opinii właściwe metody i procedury wymagane od detektywa molekularnego do których należały, w dużym uproszczeniu: (i) wytwarzanie stabilnych linii komórkowych zawierających świecący gen GFP i/lub lucyferazy oraz linii komórkowych bez lub z nadekspresją białka HO-1; (ii) przeprowadzenie testów proliferacji i żywotności linii komórkowych; (iii) wykonanie testów obciążeniowych; (iv) wykrywanie markerów powierzchniowych komórek za pomocą cytometrii przepływowej; (v) sprawdzanie aktywności enzymatycznej i metabolicznej komórek; (vi) analiza cyklu komórkowego; (vii) przeprowadzenie analizy ekspresji genów; (viii) wykonanie testów klonogenności i otrzymywanie linii komórkowych z pojedynczych klonów; (ix) przeprowadzenie niezbędnych doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem wcześniej uzyskanych linii komórkowych; (x) analizowanie materiału biologicznego *post mortem* tj.: sprawdzenie obecności i aktywności określonych białek w tym HO-1, (xi) różnicowanie adipogeniczne i osteogenne linii komórkowych, (xii) izolacja, oczyszczanie, barwienie oraz prowadzenie wspólnej hodowli różnych komórek, (xiii) wygenerowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) oraz ich pełna charakterystyka; (xiv) przeprowadzenie różnicowania komórek iPSC w kierunku melanocytów i ich barwienie; (xv) wykonanie analiz statystycznych dla przeprowadzonych eksperymentów. Wszystkie czynności zostały dokładnie opisane i na pewno będą służyły młodszym koleżankom i kolegom jako źródło „przepisów” w ich badaniach. Zabrakło jedynie pełnych informacji na temat procedury przeprowadzenia eksperymentu EPR.

W następnym rozdziale zatytułowanym „Wyniki” pani Anna Kusienicka przedstawiła najważniejsze rezultaty swojej pracy wraz z ich interpretacją. Wyniki podzieliła na dziewięć głównych podrozdziałów, w których pokazała, że: (i) linia komórek mysiego czerniaka B16-F10 zawiera zarówno komórki wykazujące ekspresję charakterystycznych markerów powierzchniowych komórek MIC (CD20, CD133, CD24, ABCB1, ABCB5, Sca-1) jak i komórki z funkcjonalnymi cechami CSC (wysoka aktywność retencji znaczników ALDH i PKH26), (ii) ekspresja białka HO-1 nie zmieniała się istotnie w podzbiorach komórek MIC, ale jej aktywność jest ważna dla nieadherentnego wzrostu komórek czerniaka, charakterystycznego dla CSC, (iii) białko HO-1 ma większy wpływ na klonogenność komórek czerniaka niż ekspresja markerów MIC, a wysoki poziom HO-1 w pojedynczych komórkach czerniaka jest niekorzystny dla inicjacji proliferacji klonalnej *in vitro*, (iv) nadekspresja białka HO-1 *in vivo* zmniejsza nowotworzenie u biorców wtórnych i trzeciorzędowych w teście przeszczepów seryjnych u myszy, (v) ekspresja markerów komórek MIC nie powoduje selekcji komórek CSC-podobnych w mysim czerniaku, (vi) komórki MIC⁻ i MIC⁺ wykazują podobną klonogenność *in vitro* i rakotwórczość *in vivo*, (vii) brak białka HO-1 wpływa na pigmentację komórek czerniaka B16-F10 poprzez zmniejszoną aktywność tyrozynazy, niezależnie od ekspresji genów melanogenezy. Jednocześnie HO-1 jest zbędny do różnicowania i pigmentacji melanocytów.

Ta część pracy zawiera pokaźną ilość rysunków, schematów, wykresów i zdjęć, które doskonale dokumentują uzyskane wyniki. Jestem pod ogromnym wrażeniem ilości przeprowadzonych eksperymentów, zastosowanych rodzajów komórek i ich modyfikacji, ilości i jakości przeprowadzonych eksperymentów na zwierzętach. Podkreślić należy, że wszystkie uzyskane wyniki zostały poddane rygorystycznej analizie statystycznej i bardzo krytycznej ocenie.

Po lekturze tej części pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania.

- (1) Na str. 66 Doktorantka napisała, że odsetek markerów powierzchniowych oraz komórek z wysokim poziomem ALDH może się różnić w zależności od eksperymentów. Skąd mogą wynikać te różnice?
- (2) Rozdział 4.2.2. Czemu służył test z użyciem DMSO?
- (3) Rozdział 4.4.2. Jakie może być wytłumaczenie faktu, że trzeciorzędowe przeszczepy komórek nowotworowych nie dały przerzutów do śledziony i płuc? Czy ma to związek (jaki?) z malejącą frakcją komórek z wysokim poziomem ALDH?
- (4) Badania nad rolą białka HO-1 Doktorantka przeprowadziła głównie z wykorzystaniem linii komórkowych. Czy są zwierzęce modele, w których gen oksygenazy hemowej jest albo zmutowany albo ulega podwyższonej ekspresji. Jakie objawy mogą mieć te zwierzęta? Być może testy w takim modelu a nie z wykorzystaniem komórek mogłyby rzucić dodatkowe światło na aspekt ewentualnego wykorzystania tego enzymu w aspekcie terapii czerniaka.

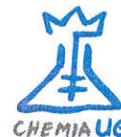
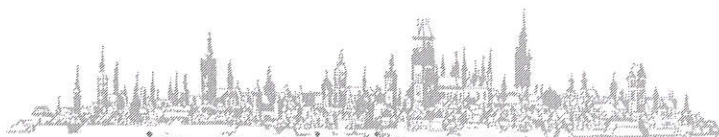
Po przeczytaniu rozdziału opisującego wyniki odniosłam wrażenie, że Doktorantka, podejmując się roli detektywa w poszukiwaniu roli białka HO-1 w biologii komórek inicjujących czerniaka i melanogenezie, zdobyła bardzo dużo informacji („dowodów”), czasami pozornie sprzecznych. Wyniki jej badań pokazały na przykład, że białko HO-1 może mieć dwoisty wpływ na rozwój czerniaka tj. z jednej strony promuje rozwój istniejących guzów ale też jednocześnie może obniżać ryzyko inicjacji nowotworzenia. Dlatego z niecierpliwością przeczytałam kolejny rozdział, zatytułowany „Dyskusje”, gdyż byłam ciekawa jak Doktorantka umieści uzyskane wyniki w szerszym kontekście danych literaturowych. Lektura „Dyskusji” wskazała na dużą dojrzałość naukową mgr Anny Kusienickiej.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski swojej pracy doktorskiej. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam **pełną charakterystykę fenotypową i funkcjonalną komórek MIC, określenie roli białka HO-1 w biologii komórek MIC oraz zbadanie wpływu białka HO-1 na różnicowanie i melanogenezę komórek czerniaka i melanocytów.** Wyniki jej pracy wskazują, że potencjalne inhibitory HO-1 zastosowane w leczeniu czerniaka mogą mieć inny wpływ na wzrost guza niż na jego inicjację. Na szczególną uwagę zasługuje fakt doskonałego zaplanowania wieloetapowych badań oraz ich przeprowadzenie z wykorzystaniem modeli komórkowych i zwierzęcych a także dojrzałą analizę przeprowadzonych eksperymentów i umiejętność współpracy z wieloma osobami. Tym samym, stwierdzam, że przeprowadzone „śledztwo” molekularne w pełni się powiodło.

Uważam, że tematyka pracy doktorskiej mgr Anny Kusienickiej jest interesująca i bardzo potrzebna w świetle poszukiwań nowych celów molekularnych i nowych terapii przeciwnowotworowych. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zostały zinterpretowane poprawnie. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr Anny Kusienickiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 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 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu



UNIwersYTET GDAŃSKI



wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o dopuszczenie mgr Anny Kusienickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w uzyskanie tak wielu ważnych informacji na temat roli białka HO-1 we wzroście i w nowotworzeniu czerniaka, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Sylwia Radziemska-Helmska