



UNIwersytet warszawski
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSYTUT ZOOLOGII
ZAKŁAD CYTOLOGII



prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko
Prodziekan ds. organizacji badań Wydziału Biologii
Kierownik Zakładu Cytologii

Warszawa, 12 października 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

„Rola oksygenazy hemowej-1 w patogenezie mięsaka prążkowanokomórkowego”

autorstwa Pana mgr. Macieja Cieśli

Praca doktorska autorstwa Pana mgr. Macieja Cieśli została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Józkowicz. Przeprowadzone badania były kontynuacją wątków dotyczących oksygenazy hemowej-1 (HO-1), które od wielu już lat są realizowane przez zespół prof. Józkowicz, przyczyniając się do coraz lepszego poznania roli tego enzymu zarówno w fizjologii jak i patogenezie. Tym razem projekt koncentrował się na udziale oksygenazy hemowej w nowotworzeniu. Podjęte badania były nowatorskie i doprowadziły do scharakteryzowania roli HO-1, oraz oddziałujących czy zależnych od niej czynników, w mięskach prążkowanokomórkowych. Głównym celem badań poświęconych mechanizmom nowotworzenia oraz przerzutowania nowotworów jest opracowanie metod skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Aby było to możliwe konieczne jest zrozumienie podłoża molekularnego procesów zachodzących w komórkach nowotworowych. Praca mgr. Cieśli z całą pewnością dostarcza danych, które mogą być wykorzystane podczas opracowywania takich terapii.

Punktem wyjścia do podjętych doświadczeń była wcześniejsza obserwacja dokumentująca, że oksygenaza hemowa-1 ogranicza zdolności komórek miogenicznych do różnicowania, sprzyja natomiast ich podziałom komórkowym (Kozakowska, Cieśla i wsp., 2012). Bazując na uprzednio uzyskanych wynikach mgr. Cieśla podjął badania mające na celu określenie roli oksygenazy hemowej-1 w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego. Do analiz wybrał linie komórkowe wyprowadzone z dwóch rodzajów mięsaka – łagodnego (tzw. eRMS) oraz złośliwego (tzw. aRMS). Oprócz linii komórkowych analizował także próbki nowotworów

pobranym od pacjentów oraz komórki izolowane od myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego HO-1. Szczegółowe cele badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej obejmowały:

- określenie poziomu ekspresji HO-1 w obu rodzajach mięsaka;
- określenie zależności między mutacją będącą podłożem badanych nowotworów (Pax3/7-FoxO1) a HO-1;
- określenie zależności między HO-1 a różnicowaniem miogenicznym komórek mięsaka;
- określenie roli niszy w regulacji proliferacji i różnicowania komórek mięsaka i rzecz jasna próba powiązania potencjalnych różnic z HO-1;
- skorelowanie różnic w ekspresji HO-1 z rodzajem mięsaków.

Postawione cele mgr Cieśla zrealizował przeprowadzając szereg świetnie zaplanowanych, logicznie następujących po sobie badań. Podczas planowania doświadczeń doktorant wykorzystał dostępne dane literaturowe, oraz wyniki własnych, uprzednio prowadzonych badań, dzięki czemu dobór „celów” analiz związanych bezpośrednio lub pośrednio z oksygenazą hemową-1 okazał się niezwykle trafny.

Realizując swoje badania Doktorant wykorzystał szerokie spektrum technik inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, biochemii, biologii komórki czy analiz histologicznych. Wśród stosowanych metod znalazły się techniki hodowli komórek nowotworowych, ich manipulacji, przeszczepiania do myszy biorczyń oraz analiz luminescencyjnych i ultrasonograficznych tych zwierząt; przygotowywanie wektorów plazmidowych i lentiwirusowych, barwienia histologiczne, immunodetekcja antygenów, techniki mikroskopii, analizy Western blot, techniki pozyskiwania i analiz RNA, testy produkcji ATP, pomiary stężenie ROS i wiele innych. Wszystkie dane uzyskane z wykorzystaniem tych różnorodnych metod badawczych poddane zostały niezbędnym analizom statystycznym. Tak szerokokrojone i wielowątkowe podejście metodyczne doprowadziło do realizacji wszystkie celów. Biorąc pod uwagę nowatorstwo i jakość uzyskanych wyników jestem pewna, że zostaną one wkrótce opublikowane. W tym miejscu chciałabym nadmienić, że Doktorant już współtworzył 4 prace oryginalne dotyczące oksygenazy hemowej-1. Opublikowane zostały one w renomowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Rozprawa doktorska pana mgr. Cieśli poprzedzona jest bardzo dobrym Wstępem, wyczerpująco i precyzyjnie wprowadzającym w zagadnienia, którym poświęcona jest praca. Doktorant z dużą precyzją zaprezentował tło swoich badań przedstawiając zarówno problematykę związaną z powstawaniem i rozwojem mięsaka prątkowanokomórkowego, regulacją różnicowania miogenicznego, rolą oksygenazy hemowej-1 w różnych procesach fizjologicznych. Omówienie to zostało oparte o bardzo dobrze dobrane źródła literaturowe.

Schematy skutecznie uzupełniają Wstęp. Dzięki temu rozdziałowi, ale także i *Dyskusji*, czytelnik może ocenić obecny stan wiedzy, uzasadnienie podjęcia projektu oraz jak na tle dokonań innych grup badawczych „umiejscawiają się” badania prowadzone przez pana mgr. Cieślę.

Zarówno Wstęp jak i pozostałe części pracy przygotowane zostały w bardzo staranny sposób. Jasno opisują prezentowane zagadnienia i wyniki, nie budzą znaczących wątpliwości. Mgr Cieśla nie dał mi niestety, jako krytykowi, pola do popisu. Mam w sumie jedynie "nieistotne" uwagi. Przykładowo, jeżeli Doktorant planuje wykorzystać w przyszłości schemat 4.1 proponowałabym usunąć z części dotyczącej *miogenezy pourodzeniowej* miotuby pierwotne (charakterystyczne dla miogenezy zarodkowej) lub też inaczej zatytułować obie części schematu – żadna z nich nie dotyczy bowiem rozwoju zarodkowego.

Informacje zawarte w części pracy poświęconej *Materiałom i Metodam* zaprezentowane zostały w bardzo jasny sposób. Wyniki zawierają uporządkowany i jasny opis przeprowadzonych badań oraz uzyskanych rezultatów. Chciałabym to podkreślić. Nie jest bowiem regułą, że w pracach napisanych przez młodych naukowców każde zdanie jest zrozumiałe. Mgr Cieśla w sposób prosty tłumaczy skomplikowane procedury i uzyskane rezultaty. Zazwyczaj opis wyników poprzedzony jest wprowadzeniem oraz zakończony krótkim podsumowaniem.

We wstępie do *Wyników* przedstawione zostały doświadczenia mające na celu charakterystykę komórek dwóch rodzajów mięsaka prążkowanokomórkowego - eRMS i aRMS. Analizowano ekspresję genów związanych z progresją nowotworową czy tworzeniem naczyń. Określono także odpowiedź badanych komórek na wybrane cytostatyki. W tym fragmencie Doktorant stwierdza (str. 63), że w oparciu o uzyskane wyniki badane komórki charakteryzują się zbliżoną szybkością proliferacji – brakuje jednak danych eksperymentalnych popierających to stwierdzenie. Proliferacja w oparciu o test MTT po raz pierwszy w pracy przedstawiona została w opisie doświadczeń dotyczących zablokowania oksygenazy hemowej-1 w komórkach aRMS (str. 68).

Uzyskane na wstępie badań dane pozwoliły Doktorantowi stwierdzić, że dwa analizowane rodzaje komórek RMS różnią się od siebie poziomem ekspresji wybranych genów a różnice te zdecydowanie świadczą o większej agresywności oraz oporności na chemioterapeutyki linii aRMS. Korelacje wykazano także w przypadku poziomu mRNA kodującego HO-1 i mikroRNA związanych z regulacją jej ekspresji. W kolejnych etapach badań mgr Cieśla wykazał, że: 1) zahamowanie aktywności HO-1 obniża ekspresję genów związanych z proliferacją i migracją komórek aRMS; 2) nadekspresja onkogenu Pax3-FoxO1 w komórkach eRMS indukuje ekspresję genów docelowych w sposób zależny od HO-1; 3) linie eRMS i aRMS różnią się potencjałem do różnicowania miogenicznego – bardziej inwazyjną linię aRMS charakteryzuje niższa ekspresja genów

pozytywnie regulujących miogenezę; 4) komórki te różnią się również poziomem aktywnych izoform kinazy MAP p38. Dalsza dokładna analiza pozwoliła również na powiązanie mikroRNA 206 z fenotypem komórek aRMS. Określono także zależność między HO-1 na metabolizmem badanych komórek. *Last but not least* przeprowadzono analizy wzrostu guzów uzyskanych z RMS in vivo (przeszczepianie komórek nowotworowych do myszy), określono wpływ niszy na progresję RMS, oraz zanalizowano dostępny materiał kliniczny. Badania te potwierdziły, że zahamowanie aktywności HO-1 w komórkach nowotworowych promuje ich różnicowanie miogeniczne a tym samym ogranicza rozwój guzów. Wykazały także istotną rolę ekspresji HO-1 w komórkach podścieliska.


Przeprowadzając wielowątkowe badania mgr Cieśla dobitnie wykazał, że oksygenaza hemowa-1 pełni istotną rolę w rozwoju RMS. Wyniki doświadczeń pozwoliły także określić molekularne różnice między eRMS i aRMS. Wykazały, że działanie HO-1 związane jest z indukcją ekspresji miR-206 i przybliżyły „elementy” regulacyjnych zależności między tym enzymem a czynnikami które on reguluje i które regulują jego ekspresję i aktywność. Zahamowanie HO-1 ogranicza proliferację komórek RMS, ułatwia ich różnicowanie miogeniczne i, w przypadku uzyskanych eksperymentalnie guzów, ogranicza ich wzrost. Istotną rolę w rozwoju nowotworu odgrywa również nisza – brak HO-1 w komórkach podścieliska spowalnia rozwój guzów. Uzyskane wyniki niewątpliwie rzucają nowe światło na regulację proliferacji i różnicowania komórek mięsaka prążkowanokomórkowego i mogą okazać się kluczowe dla opracowania przyszłych terapii. Prezentowana rozprawa doktorska jest z całą pewnością ważką i nowatorską.

W bardzo dobrze przygotowanej *Dyskusji* wyniki własne zostały przedstawione na tle badań zarówno „macierzystego” zespołu jak innych grup zajmujących się podobną problematyką badawczą. Podobnie jak pozostałe części także ten fragment pracy został sprawnie napisany. Wszystkie główne wątki zostały fachowo przedyskutowane w oparciu o bardzo wiele prac oryginalnych (w całej pracy Autor zacytował ich ponad 200).

Rozprawa zawiera ponad 30 rycin. Co prawda nie zostały one wykonane w jednolitej stylistyce (np. wielkość czcionki czy rozmiary wykresów są różne), ale w większości przypadków doskonale dokumentują uzyskane wyniki. Niektóre z rycin są, niestety, nieczytelne – i to w moim odczuciu stanowi mankament, którego można było łatwo uniknąć. Ponadto, w analizie rycin nie zawsze pomagają opisy – czasem są bardzo zdawkowe. Niezbyt dobrym rozwiązaniem jest brak opisów zdjęć bezpośrednio pod nimi – często przenoszone są na następną stronę. Szczególny niedosyt czułam starając się zanalizować bardzo małe ilustracje (rycina 7.5B) czy też te zawierające zupełnie nieczytelne fotografie - ryciny 7.9C, 7.14E i G, 7.21A (czy zdjęcie pokazuje 4 kanały? jeżeli tak to co przedstawia każdy z nich?), 7.21C, 7.25C. Bardzo trudno jest określić

jakiegokolwiek różnice w ekspresji czy lokalizacji czynników prezentowanych na wymienionych zdjęciach - są bowiem niemal czarne. Zdjęcia niektórych preparatów histologicznych są również niskiej jakości – szkodzi im mały rozmiar – nie widać na nich szczegółów tkanek, komórek ich budujących. W większości przypadków uwagę przykuwa jedna pomarańczowa plama - czasem z niebieskimi naciekami (włókna tkanki łącznej) – ryc. 7.19D, 7.22A. Analiza zdjęć myszy na rycinie 7.19B niestety wymaga od recenzenta bardzo dobrego wzroku lub użycia lupy. Wszystkie ilustracje powinny być takich rozmiarów i jakości aby z łatwością można było na nich zlokalizować opisywane struktury czy sygnały immunolokalizacji. Co do innych aspektów formalnych pracy mam jedynie "pomijalne" zastrzeżenia. Jak już wspomniałam rozprawa napisana jest klarownie, poprawną polszczyzną, a mankamenty edytorskie czy stylistyczne są bardzo nieliczne.

Podsumowując, pan mgr Cieśla zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na rolę oksygenazy hemowej-1 w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego. Wnioski końcowe znajdują pełne poparcie w wynikach przedstawionych analiz i są bardzo dobrze umotywowane. Z całą pewnością można uznać przeprowadzone badania za nowatorskie. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Macieja Cieślę do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę jakość rozprawy doktorskiej zgłaszam wniosek o nagrodzenie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
KATEDRY CYTOLOGII INSTYTUTU ZOOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko