

Warszawa, 11 października 2015

Ocena pracy doktorskiej magistra Macieja Cieśli

pt. „Rola oksygenazy hemowej-1 w patogenezie mięsaka prążkowanokomórkowego”

Przedstawiona do oceny praca, wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Alicji Józkowicz, w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego zrobiła na mnie olbrzymie wrażenie swoim rozmachem, dogłębną, rzetelnością i sumienną wypracowaną precyzją prezentacji samych wyników i doskonałym umieszczeniem ich w kontekście istniejącego stanu wiedzy. Nie ma wątpliwości, że praca została wykonana w jednym z czołowych ośrodków badawczych w Polsce, wśród których zespół Zakładu Biotechnologii Medycznej UJ bezsprzecznie wysuwa się na prowadzenie.

Tytuł pracy, jak i główny cel pracy, czyli wyjaśnienie znaczenia oksygenazy hemowej-1 (HO-1) w progresji mięsaka prążkowanokomórkowego, mogą sprawiać wrażenie zbyt ogólnych. Nic bardziej mylnego – Doktorant zaczął ambitnie, po czym rozłożył swój cel na cele pośrednie i wszystkie, punkt po punkcie, osiągnął. W toku doświadczeń obiecał zbadać poziom ekspresji HO-1 w łagodnym (embrionalnym) i złośliwym (pęcherzykowym) typie rhabdomyosarcoma, potwierdzić związek pomiędzy przekazem sygnału zależnym od białka fuzyjnego Pax3/7-FoxO1, charakterystycznego dla pęcherzykowego rhabdomyosarcoma, a ekspresją HO-1, spróbować zmodyfikować działanie Pax3/7-FoxO1 poprzez zahamowanie aktywności HO-1, sprawdzić czy mechanizmy odpowiedzialne za zahamowanie miogenezy w mioblastach o

wymuszonej genetycznie nadekspresji HO-1 są aktywne również w komórkach rabdomyosarcoma, oraz określić wpływ HO-1 ulegającej ekspresji w komórkach podścieliska na proliferację i różnicowanie komórek rabdomyosarcoma. Doktorant swoje obietnice spełnił dzięki całej serii eksperymentów z wykorzystaniem sześciu stabilnych linii komórkowych ludzkiego rabdomyosarcoma, ponadto zwierzęcych modeli wzrostu guzów nowotworowych, w końcu próbek klinicznych pochodzących od pacjentów z rabdomyosarcoma. Doktorant indukował różnicowanie mięśniowe komórek, hamował aktywność enzymatyczną oksygenazy hemowej, hamował aktywność deacetylaz histonowych, nadwyrażał Pax3-FoxO1, hamował HO-1, indukował i wyciszał pre-miR-206, wykorzystał pełną gamę możliwości najnowocześniejszej biologii molekularnej, transfekował plazmidami i drobnocząsteczkowymi RNA, transdukował wektorami lentiwirusowymi, wykorzystał luminescencję do przyżyciowego śledzenia wzrostu guzów u myszy, wykonywał barwienia histologiczne, immunohisto- i cytochemiczne 11 białek, ilościowy RT-PCR w czasie rzeczywistym dla mRNA i microRNA, western blot, testy immunoenzymatyczne typu ELISA, oceniał wewnątrzkomórkową lokalizację HO-1 łącząc cytometrię przepływową z analizą mikroskopową, oceniał żywotność komórek po zastosowaniu chemioterapeutyków w teście redukcji MTT, analizował zmiany metaboliczne zachodzące wewnątrz komórek rabdomyosarcoma mierząc konsumpcję tlenu, zmiany pH, produkcję ATP, oceniał całkowitą zdolność utleniającą komórek, kontrolował stężenie reaktywnych form tlenu (ROS), oceniał wpływ komórek podścieliska na migrację i proliferację komórek rabdomyosarcoma wykorzystując macierz fibrynową i test fibrynowy, nie pominął też analiz poziomu wydzielanych metaloproteinaz... wszystko w sposób przykładowo bezbłądny.

Dzięki temu, Doktorant mógł wyciągnąć wniosek, że HO-1 wpływa na rozwój rabdomyosarcoma, a zahamowanie jej aktywności zwiększa zdolność komórek tego mięsaka do indukcji różnicowania miogennego. W wyniku pracy Doktoranta wiemy, że HO-1 ulega wyższej ekspresji w rabdomyosarcoma o wyższej agresywności klinicznej (typu pęcherzykowego), towarzyszy temu wyższy poziom ekspresji genów kodujących CXCR4 i SDF-1 oraz cMET i HGF; zwiększona ekspresja HO-1 jest związana z obecnością onkogenu fuzyjnego Pax3/7-FoxO1, a zahamowanie aktywności HO-1 zmniejsza efekty działania tego onkogenu; zablokowanie aktywności HO-1 w rabdomyosarcoma prowadzi do zmniejszenia proliferacji oraz zwiększenia stopnia zróżnicowania komórek mięsaka; w czym pośredniczy nadekspresja miR-206 i prawdopodobnie zmniejszenie aktywności szlaków cMET/HGF oraz

CXCR4/SDF-1; ekspresja miR-206 ulega obniżeniu przez HO-1 prawdopodobnie poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego, co prowadzi do sekwestracji deacetylazy histonowej HDAC4 w jądrze komórkowym; HDAC4 w obecności aktywnej HO-1 nie ulega utlenieniu i nie jest przenoszony do cytoplazmy. Być może najważniejszym osiągnięciem Doktoranta jest udokumentowanie, że zahamowanie aktywności HO-1 in vivo prowadzi do spowolnienia wzrostu guzów nowotworowych tworzonych przez komórki raka mięśni szkieletowych, ich większego zróżnicowania, mniejszego unaczynienia i nasilonego zwłóknienia; brak HO-1 w komórkach podścieliska ułatwia różnicowanie raka mięśni szkieletowych oraz zmniejsza wzrost i migrację komórek.

Mimo starań, nie potrafię wskazać słabych stron Rozprawy. Śledzenie kolejnych etapów zaprojektowanego badania sprawia prawdziwą przyjemność i jest bardzo pouczające. Pragnę Doktorantowi, ale również promotorowi – p. Prof. Alicji Józkowicz – serdecznie pogratulować doskonale wykonanej pracy.

W podsumowaniu recenzji mam przyjemność stwierdzić, że recenzowana rozprawa ma charakter nowatorski i stanowi znaczący wkład w reprezentowaną dziedzinę nauki; spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk. Stawiam wniosek o dopuszczenie magistra Macieja Cieśli do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie wnioskując o wyróżnienie Jego pracy doktorskiej.

Laboratorium Genetyki Nowotworów Człowieka
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski

Prof. dr hab. n. med. Krystian Jażdżewski
Kierownik Laboratorium