



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Simiczyjew pt. „Zróżnicowanie funkcjonalne izoform aktywności β i γ w procesie migracji komórek nowotworowych”

Jedną z najbardziej niebezpiecznych cech komórek nowotworowych jest bez wątpienia zdolność do tworzenia przerzutów. Ten wieloetapowy i złożony proces wymaga od biorących w nim udział komórek nabycia szeregu właściwości. Jedną z najważniejszych cech komórek nowotworowych, która pozwala im na tworzenie przerzutów jest zdolność do aktywnej migracji. Zdolność do kontrolowanego przemieszczania się komórek jest właściwością bez której trudno byłoby sobie wyobrazić prawidłowy przebieg tak fundamentalnych dla funkcjonowania organizmów wielokomórkowych procesów jak rozwój embrionalny, odpowiedź układu immunologicznego czy procesy gojenia się ran i ubytków tkankowych. Migracja prawidłowych komórek budujących organizmy wielokomórkowe jest jednak bardzo ściśle kontrolowana i dotyczy tylko określonych typów komórek, których los w organizmie jest jednoznacznie zdefiniowany. Z kolei nabycie zdolności do niekontrolowanej migracji przez komórki nowotworowe jest jedną z podstawowych właściwości umożliwiających nowotworom złośliwym naciekanie sąsiednich tkanek oraz tworzenie odległych przerzutów. Aktywność ta jest niezbędna w większości wyróżnionych etapów tego procesu 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. Nic zatem dziwnego, że poznanie mechanizmów leżących u podstaw zjawisk migracyjnych komórek wzbudza wielkie zainteresowanie licznych grup badawczych na całym świecie. Badania te, oprócz aspektu naukowego, są też bardzo ważne z przyczyn czysto praktycznych, ponieważ poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację tych procesów jest niewątpliwie warunkiem koniecznym do opracowania skutecznych terapii umożliwiających zahamowanie procesu tworzenia przerzutów. W ostatnich latach nasza wiedza o tych mechanizmach uległa znaczącemu rozwojowi, jednakże w dalszym ciągu dalecy jesteśmy od pełnego zrozumienia złożonych mechanizmów regulacji ruchu komórki. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Aleksandry

Simiczyjew dotyczy jednego z bardzo ciekawych aspektów regulacji migracji komórek nowotworowych jakim jest znaczenie proporcji β i γ aktyny w komórce dla jej aktywności ruchowej. W szczególności Doktorantka postawiła sobie za cel zweryfikowanie hipotezy, czy przyjęta strategia migracyjna komórek nowotworowych (ruch mezenchymalny vs ameboidalny) ma jakiś związek z podwyższoną ekspresją jednej ze wspomnianych wyżej izoform aktyny. Dodatkowym celem było określenie roli cytoplazmatycznych izoform aktyny w tworzeniu inwadopodiów, struktur bardzo istotnych dla wydajności procesu tworzenia przerzutów przez komórki poruszające się mezenchymalnie. Podjęcie tej tematyki jest jak najbardziej uzasadnione nie tylko ze względów czysto poznawczych ale również ze względu na konieczność opracowywania strategii ograniczających tworzenie przerzutów przez komórki nowotworowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Doroty Nowak. Praca została zatem przygotowana w Zespole który od wielu lat zajmuje się tematyką znaczenia zmian stopnia polimeryzacji i ekspresji różnych izoform aktyny oraz białek oddziałujących z aktyną w procesie wzrostu nowotworu i procesach tworzenia przerzutów.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 172 strony, jest więc opracowaniem dość obszernym. W tekście zamieszczono 82 ryciny, 6 tabel i cytowano 200 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani Aleksandry Simiczyjew ma układ typowy dla tego typu opracowań. W 35 stronicowym bogato ilustrowanym „Wstępie” Autorka przedstawiła obszerny zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W tym rozdziale doktorantka dokonuje omówienia roli aktywnej migracji komórek nowotworowych w procesach tworzenia przerzutów, znaczenia środowiska pozakomórkowego dla przebiegu tych procesów oraz przedstawia obszerną charakterystykę różnych strategii migracyjnych komórek. Drugą część Wstępu Doktorantka poświęca omówieniu budowy aktyny, ze szczególnym uwzględnieniem niemięśniowych aktyn cytoplazmatycznych oraz dokonuje przeglądu właściwości i proponowanych funkcji różnych izoform aktyny cytoplazmatycznej. Wstęp kończy podrozdział poświęcony białkom wiążącym aktynę. Wstęp do rozprawy w sposób logiczny prowadzi do jasnego sformułowania celu pracy. Cały rozdział napisany został przejrzysto i omówione zostały w nim najważniejsze zagadnienia związane z tematem pracy. Z drobnych nieścisłości należy zwrócić uwagę, że małe białka G z rodzin Rho to jak pisze wielokrotnie sama Autorka GTP-azy a nie kinazy (str 7, 20 i 23). Pewnym uproszczeniem jest również stwierdzenie, że profilina to białko zapobiegające polimeryzacji aktyny. Profilina wiąże co prawda monomery aktyny, jednak wiązanie to odbywa się od strony (+) monomeru. Ponieważ koniec (-) pozostaje wolny to taki monomer może przyłączać się do końca plus rosnącego filamentu.

Dodatkowo, profilina stymuluje wymianę ADP na ATP przez co również może wpływać stymulująco na polimeryzację aktyny.

W rozdziale „Materiały i metody” Autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. W swoich badaniach doktorantka wykorzystała szereg metod zarówno biochemicznych jak i biologicznych, które umożliwiały próbę rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Opis stosowanych metod jest bardzo jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań. Przyjęty model badawczy opierał się na wykorzystaniu dwóch linii komórkowych charakteryzujących się odmienną strategią migracyjną - komórek nowotworu piersi MDA-MB-231 poruszających się mezenchymalnie oraz komórek gruczolaka jelita grubego LS174T, poruszających się ameboidalnie. Pierwsze doświadczenia wykazały jednak, że w obu typach komórek poziom β i γ aktyny jest na takim samym poziomie. Pewne różnice występowały jednak na poziomie ekspresji białek oddziałujących z aktyną takich jak winkulina, żelsolina i kofilina. Poziom tych białek był znacząco wyższy w komórkach migrujących mezenchymalnie. Badania architektury szkieletu aktynowego potwierdziły, że obie izoformy występują w podobnych ilościach w obu typach komórek oraz że lokalizują się głównie w obszarze podbłonowym i wypustkach migracyjnych. Nie do końca są jednak jasne kryteria na podstawie, których Doktorantka klasyfikuje wypustki na rys 31 jako wypustki typu blebs. Nie wydaje mi się, żeby na podstawie takiego obrazu można to było jednoznacznie stwierdzić. Badania stopnia spolimeryzowania aktyny w obu typach komórek nie wykazały różnic istotnych statystycznie. Obie linie komórkowe odpowiadały również podobnie na stymulację EGF-em.

Interesujące wyniki przyniosło porównanie zdolności migracyjnych obu linii komórkowych. Trochę zaskakującym wynikiem jest znacznie mniejsza aktywność migracyjna komórek ameboidalnych, gdyż zwykle przypisuje się im szybszą migrację niż komórkę mezenchymalną. W tym doświadczeniu nie jest jednak jasne w jakich warunkach przeprowadzono eksperyment na podstawie którego sporządzono trajektorie ruchu. Czy chodzi tutaj o doświadczenie opisane w rozdziale IV.19. w części Materiały i Metody? Jeśli tak i są to trajektorie otrzymane w wyniku analizy filmu 48 godzinnego to trudno oprzeć się wrażeniu, że komórki ameboidalne praktycznie pozostawały nieruchome (dla większości trajektorii komórki nie przemieszczają się na odległość większa niż 20 μm , czyli dwie średnice komórki). Nie wydaje mi się również żeby najszcześliwszym

rozwiązaniem było określanie przedstawionych na rys 36 wyników mianem prędkości migracji. użytą tutaj jednostką są $\mu\text{m}^2/\text{min}$ i jest to raczej prędkość zarastania/zamykania rany, która zależy nie tylko aktywności migracyjnej ale w tak długim eksperymencie również od aktywności proliferacyjnej komórek. Jednak zdaję sobie sprawę, że taki termin może być w stosowanym używany w programie analizującym ruch.

Ponieważ przeprowadzone porównanie komórek nie pozwoliło na wykazanie różnic w ekspresji różnych izoform aktyny w komórkach migrujących w odmienny sposób, Autorka w kolejnych doświadczeniach postanowiła zbadać wpływ nadekspresji badanych izoform aktyny na aktywność ruchową komórek. Otrzymane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że podwyższona ekspresja obu izoform aktyny skutkuje wzrostem aktywności migracyjnej i inwazyjnej obu typów komórek. Podniesienie poziomu aktyny skutkuje również w obu liniach komórkowych zmianami właściwości adhezyjnych. W tej części pracy Doktorantka sprawdzała również wpływ nadekspresji β i γ aktyny na stopień spolimeryzowania aktyny. Ponieważ na prezentowanych na rys 46 wykresach widać istotny statystycznie spadek ilości zarówno F jak i G aktyny w komórkach LS174T z podniesionym poziomem β i γ aktyny chciałbym prosić o wyjaśnienie jak należy interpretować te wyniki w świetle rezultatów umieszczonych na rys 41 i 42, z których wynika, że poziom całkowitej aktyny endogennej pozostaje na poziomie niezmiennym a egzogennej wzrasta po transfekcji?

W ostatniej części pracy Autorka zajęła się określeniem roli β i γ aktyny w tworzeniu inwadopodiów. W tej części pracy Doktorantka bardzo elegancko wykazała, że obie badane izoformy aktyny są zaangażowane w tworzenie aktywnych proteolitycznie inwadopodiów. Wyniki te zostały otrzymane zarówno w układach 2D jak i 3D. Chciałbym tutaj prosić Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego jej zdaniem stosowany w jej pracy inhibitor proteiny MT1-MMP, GM6001 prowadził do zmniejszenia sygnału dla tego białka w obrębie inwadopodiów? Wydaje się zrozumiałe, że inhibitor ten wpływa na aktywność enzymatyczną proteazy ale dlaczego wpływa również na jej lokalizację, która jest monitorowana odpowiednim przeciwciałem? Nie wydaje mi się też najszczęśliwszym określenie lokalizacji inwadopodiów „centralna część komórki” i „okolica podbłonowa”. Siłą rzeczy w obu lokalizacjach mamy do czynienia z umiejscowieniem podbłonowym. W drugim przypadku mamy do czynienia z obrzeżem komórki oglądanej pod mikroskopem.

Podsumowując, Autorka otrzymała interesujące wyniki wpisujące się w nierozstrzygniętą dyskusję o roli różnych izoform aktyny w różnych procesach komórkowych. Podstawowym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest stwierdzenie, że obie cytoplazmatyczne izoformy aktyny

odgrywają równorzędną rolę w procesie migracji komórek nowotworowych bez względu na strategię ruchu reprezentowanego przez te komórki. Bardzo ważnym stwierdzeniem jest również wykazanie, że obie izoformy biorą udział w tworzeniu aktywnych proteolitycznie inwadopodiów.

W 12 stronicowym rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Rozprawę kończy rozdział „Wnioski”, w których 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 tego rodzaju i chyba nie ma potrzeby ich tutaj wymieniać.

Podsumowując, uważam, że praca zasługuje na jak najbardziej pozytywną ocenę. Otrzymane wyniki pozwoliły na jednoznaczną odpowiedź na pytanie przedstawione jako cel pracy i są również zachętą do stawiania wielu nowych pytań. Warto również wspomnieć, że Pani mgr Aleksandra Simiczyjew jest oprócz recenzowanej pracy doktorskiej współautorką czterech innych prac naukowych. W skład dorobku naukowego wchodzi 3 prace doświadczalne i jedna przeglądowa. W dwóch pracach doświadczalnych, które zawierają wyniki pracy doktorskiej, Doktorantka jest pierwszym autorem. Również praca przeglądowa, w której Doktorantka też jest pierwszym autorem, jest ściśle związana z tematyką doktoratu. Prace te były już 10-krotnie cytowane w literaturze światowej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską mgr Aleksandry Simiczyjew oceniam wysoko. W moim przekonaniu Autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi rozprawy doktorskiej i odpowiada warunkom Ustawy z dn. 18.03.2011 r. o stopniach i tytule naukowym a dorobek kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Uważam również, że oceniana rozprawa zasługuje na wyróżnienie. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Simiczyjew przez Wysoką Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


(Zbigniew Madeja)