



Akceptuję
Kob

Prof. dr hab. Anna Żaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 04.04.2023

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Mateusza Gielaty pt. „Charakterystyka inwazyjnych komórek raka piersi z wykorzystaniem nowatorskiego systemu reporterowego alfa katuliny” wykonanej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Kobielał, prof. ucz.

Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania były finansowane z projektów Narodowego Centrum Nauki: Preludium 19 (2020/37/N/NZ5/03069) pt. „Charakterystyka wolno krążących komórek nowotworowych raka piersi z wykorzystaniem sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek” kierowanego przez mgr Mateusza Gielatę oraz Opus 19 (2020/37/B/NZ5/03950) pt. „Transkrypcyjna i funkcjonalna charakterystyka inwazyjnych komórek raka piersi izolowanych przy użyciu nowatorskiego systemu reporterowego *in vivo*” kierowanego przez dr hab. Agnieszkę Kobielał, prof. uczelni.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy analizy roli mało poznanej do tej pory białka alfa-katuliny w potrójnie negatywnym raku piersi (TNBC). Założenia pracy opierają się na wynikach wcześniej prowadzonych w zespole badań dotyczących badania alfa-katuliny w nowotworach głowy i szyi (HNSCC). Podjęcie tematu uważam za jak najbardziej uzasadnione. Alfa-katulina jest białkiem cytoszkieletowym, które może wpływać na migrację komórek nowotworowych, a tym samym ich inwazyjność. Potrójnie negatywny rak piersi wciąż stanowi wyzwanie terapeutyczne i wiąże się z niekorzystnym rokowaniem, lepsze poznanie ścieżek molekularnych związanych z jego inwazyjnością może przyczynić się do znalezienia nowych celów terapeutycznych.

Zaplanowane badania są więc aktualne i istotne z poznawczego punktu widzenia, jak również w odległej perspektywie posiadają potencjalny wymiar aplikacyjny w kontekście nowych strategii terapeutycznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje dwie publikacje opublikowane w następujących czasopismach naukowych: *Int J Mol* (IF 6,208, punktacja ministerialna 140 pkt.), *Sci Rep* (IF=4,997, punktacja ministerialna 140 pkt.). Tekst pracy liczy 66 stron, w tym 11

stron tekstu pełniącego rolę przewodnika po publikacjach. Praca obejmuje: spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, wykaz skrótów, streszczenie i jego tłumaczenie na język angielski, wstęp, założenia i cele pracy, kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie i wnioski, oświadczenia współautorów, analizę bibliometryczną oraz piśmiennictwo. W strukturze pracy zabrakło mi części dedykowanej omówieniu publikacji wchodzących w skład rozprawy. Przydatne by było pokazanie dodatkowych informacji (*Supplementary information*) dołączonych do drugiej pracy.

Oceniając przedłożoną pracę, pierwszym elementem oceny jest rozważenie indywidualnego wkładu Doktoranta w badania przedstawione w dwóch publikacjach wchodzących w skład rozprawy, w aspekcie faktu, że pracuje on w wieloosobowym zespole badawczym oraz, że obie publikacje są wieloautorskie. W obu publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. Do wszystkich prac dołączone są oświadczenia współautorów, natomiast zabrakło mi oświadczeń samego Doktoranta lub opisu jego wkładu w powstanie prac. Według oświadczeń współautorów wkład Doktoranta był dominujący: 70% w przypadku pierwszej publikacji, 70-80% (zależnie od współautora) w przypadku drugiej pracy. Co ciekawe, łączny wkład procentowy autorów drugiej pracy przekracza 100%, wynosi 110-120%, zależnie od tego, które wartości deklarowane, przez którego ze współautorów zsumujemy. Z przedstawionych oświadczeń wynika, że w przypadku pierwszej publikacji Doktorant wykonał kompletny przegląd literatury, napisał większość tekstu i stworzył wszystkie ryciny zawarte w publikacji. Taka treść oświadczeń odbiega od tych zawartych w samej publikacji. W przypadku drugiej publikacji, według współautorów, rola Doktoranta to: analiza większości wyników, napisanie tekstu publikacji, stworzenie wszystkich figur, pomysły na większość eksperymentów. Druga praca jest pracą doświadczalną, jednak żaden ze współautorów ani sam Doktorant nie deklaruje udziału w wykonaniu badań przez Doktoranta. Dziwi to trochę i zaskakuje, zwyczajowo Doktorant osobiście wykonuje większość prac eksperymentalnych we własnym doktoracie i publikacji, jeśli jest wymieniany na pierwszym miejscu. Domniemuję, że wynika to po prostu z przeoczenia i że deklarowany znaczący udział Doktoranta w pracach obejmuje również pracę doświadczalną.

Przechodząc do oceny merytorycznej pracy, pracę oceniam pozytywnie.

Wstęp liczący trochę ponad 5 stron jest napisany bardzo syntetycznie. Wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Autor przedstawia kolejno ogólną charakterystykę nowotworów piersi, rolę EMT w rozwoju, regeneracji i progresji nowotworów, unaczynienie nowotworów i zjawisko mimikry naczyńopodobnej, a na końcu alfa-katulinę i uzasadnienie połączenia publikacji w jeden cykl. Część dotycząca charakterystyki klinicznej raków piersi przedstawiona jest bardzo pobieżnie, pewnie stąd wynikają niezbyt precyzyjne, a czasami nieprawdziwe stwierdzenia, np. że „w ocenie histopatologicznej ocenia się czy dany nowotwór jest luminalny czy bazalny” lub że „potrójnie ujemny rak piersi pokrywa się z typem bazalnym”. Nie jest również prawdą, według mojej wiedzy, że nie ma żadnej dostępnej terapii ukierunkowanej molekularnie dla TNBC. Już w 2020 FDA zatwierdziła sacituzumab govitecan

dla TNBC. Warto by również wspomnieć o inhibitorach PARP (Talazoparib) czy lekach immunomodulujących (tzw. immune checkpoint inhibitors) w tym kontekście.

Kolejny rozdział „**Założenia i cele pracy**” przedstawia cel główny oraz cele szczegółowe pracy, natomiast założeń deklarowanych w tytule rozdziału nie udało mi się znaleźć. Celem głównym badań była charakterystyka alfa-katuliny na podstawie przeglądu literatury, a następnie wykorzystanie ekspresji tego białka jako markera komórek inwazyjnych potrójnie ujemnego nowotworu piersi w celu wyizolowania tych komórek w systemie in vivo i analizy ich heterogenności, transkryptomu a także ich udziału w procesie mimikry naczyniopodobnej. Cel został jasno przedstawiony, a następnie uzupełniony celami szczegółowymi. W moim odczuciu brakuje sformułowania hipotezy badawczej.

Kolejna część pracy obejmuje **teksty obu publikacji**. Praca przeglądowa przedstawia charakterystykę alfa-katuliny i jej właściwości strukturalnych, omawia białka wchodzące w interakcję z katuliną, udział katuliny w rozwoju zarodkowym, homeostazie organizmu, a także w procesach nowotworzenia. Nie udało mi się znaleźć w opisie samej pracy zastosowanej „metody badawczej”, np. tego jakie były kryteria przeglądu literatury. W mojej opinii szczególnie ciekawa jest praca oryginalna prezentująca, z wykorzystaniem systemu reporterowego katuliny heterogenność inwazyjnych komórek nowotworowych, ich plastyczność i udział w mimikrze naczyniopodobnej. W pracy tej stworzono ciekawy system reporterowy wyznakowujący poprzez ekspresję GFP z promotora genu CTNNAL1 inwazyjne komórki ludzkich linii TNBC. W ramach badań stosowano szerokie spektrum technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej, w tym metody hodowli komórkowej w modelu 3D i modele in vivo z wykorzystaniem mysiego modelu ksenograftów (myszy Nod.Scid), metody stabilnej modyfikacji komórek, ocenę ekspresji genów metodami RT-qPCR i Western blot, barwienie immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne, sekwencjonowanie RNA nowej generacji oraz szereg testów funkcjonalnych, takich jak: testy oceniające migrację, potencjał inwazyjności i potencjał macierzystości czy tworzenie struktur naczyniopodobnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja alfa-katuliny występuje w ludzkich tkankach raka piersi, a jej poziom koreluje ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej. Poziom alfa-katuliny wpływa na właściwości adhezyjne i migracyjne komórek nowotworowych in vitro. Komórki najwyżej ekspresyjujące alfa-katulinę lokalizują się na brzegu inwazyjnym sfery w modelu 3D, a ekspresja GFP pokrywa się z ekspresją wimentyny (markera EMT). Podobnie w modelu ksenograftów alfa-katulina występowała w komórkach na inwazyjnym froncie guzów, komórki te jednocześnie wykazywały ekspresję CD44 i wimentyny. Wyniki NGS pokazały, że wysoka ekspresja alfa-katuliny koreluje z ekspresją genów zaangażowanych w migrację komórkową, modulację właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych i ich interakcję z naczyniami krwionośnymi. Dodatkowo, wyniki sekwencjonowania RNA potwierdzono barwieniem immunofluorescencyjnym guzów ksenograftów, pokazując, że komórki z wysoką ekspresją alfa-katuliny również ekspresyjują MCAM, tworząc jednocześnie struktury naczyniopodobne.

Lektura tej części pracy nasunęła mi kilka pytań:

1. Wykazano, że „w ludzkich tkankach z nowotworów piersi wzrastający poziom alfa-katuliny koreluje ze wzrastającym stopniem zaawansowania choroby nowotworowej”. Czy korelacje te były znamienne statystycznie? Jakie były liczebności grup przedstawionych na Fig.1b' publikacji w Scientific Reports? Czy wśród analizowanych próbek były przypadki TNBC? Czy taką samą zależność zauważono w przypadku tego podtypu?
2. Jak wykonywano analizę barwienia IHC alfa-katuliny w materiale klinicznym? Jakie były kryteria wyniku pozytywnego? Co posłużyło za kontrolę pozytywną?
3. Czy poziom alfa-katuliny ma znaczenie prognostyczne w raku piersi, w szczególności w TNBC? Czy można takie dane pokazać na podstawie bazy TCGA lub KM-plotter (<https://kmplot.com/analysis/>)?
4. W pracy pojawia się kilkakrotnie określenie „najbardziej inwazyjne komórki nowotworowe. Które komórki i według jakich kryteriów uznano za najbardziej inwazyjne?
5. Poproszę o ustosunkowanie się do wyboru markera epitelialnego; w tej roli występuje czasem beta-katenina, czasem CD44.

Pracę kończą **Podsumowanie i Wnioski** zawarte na 3 stronach. Z perspektywy recenzenta muszę stwierdzić, że brak dyskusji pozostawia pewien niedosyt. Nawet krótkie przedyskutowanie wyników mogłoby pokazać znajomość tematyki związanej z prowadzonymi badaniami i umiejętność krytycznego spojrzenia na wygenerowane dane w kontekście danych literaturowych. Bibliografia obejmuje listę 42 pozycji związanych z tematem pracy, większość cytowanych prac została opublikowana w ostatnim czasie.

Podsumowując, uważam, że cele pracy zostały z powodzeniem zrealizowane. Metodyka była różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań. Uzyskane wyniki w sposób znaczący poszerzyły wiedzę o roli alfa-katuliny w TNBC. Według mnie, wyniki te stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autor rozwiązał zdefiniowany problem badawczy i potrafił przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazał się, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biologii komórki i biologii molekularnej oraz umiejętnością prezentacji i interpretacji wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)”. Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana Mateusza Gielaty do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Zakład Onkologii Translacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab.  Żaczek

Kierownik