



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Sochackiej

Tytuł rozprawy: „Rola neuromedyny U (NMU) w regulacji potencjału migracyjnego komórek raka jelita grubego”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Eweliny Sochackiej pt. „Rola neuromedyny U (NMU) w regulacji potencjału migracyjnego komórek raka jelita grubego” została zrealizowana w Pracowni Sygnalizacji Komórkowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. Joanny Bonceli, prof. IBM PAN. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Patrycja Przygodzka. Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Sonata Bis pt. „Neuromedyna U jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita grubego i odbytnicy”, nr 2016/22/E/NZ3/00341, przyznanego dr Patrycji Przygodzkiej. Rozprawa stanowi kontynuację prowadzonych z powodzeniem od kilku lat badań nad rolą neuromedyny U (NMU) w rozwoju i progresji nowotworowej.

Warto podkreślić, że wszystkie prezentowane w rozprawie wyniki badań zostały opublikowane w 2021 roku w czasopiśmie Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, a Doktorantka razem z promotorem pomocniczym jest pierwszym autorem tej publikacji.

Problem naukowy rozprawy

Pani mgr Ewelina Sochacka w swojej rozprawie doktorskiej podjęła się zbadania wpływu białka wydzielniczego, NMU na komórki różnych linii raka jelita grubego. Doktorantka, w pierwszej części rozprawy scharakteryzowała badane linie pod względem ekspresji NMU i jej receptorów, sprawdziła poziom tego białka w lizatach komórkowych, a także jego wydzielanie do środowiska, zbadła również jego zdolność do aktywacji szlaku kinaz ERK. W drugiej części pracy, Doktorantka sprawdziła wpływ

NMU na funkcje komórek raka jelita grubego z nadekspresją NMU. Zbadala zdolność komórek do formowania kolonii, aktywację kinaz ERK, oceniła poziom powierzchniowych podjednostek integrynowych i sprawdziła zdolności do migracji i inwazji wykorzystując metodę opierającą się na zmodyfikowanych komorach Boydena, gdzie komórki migrują przez filtry poliwęglanowe w kierunku chemoatraktanta.

Układ rozprawy i zastosowanie piśmiennictwa

Rozprawę stanowi opublikowane w języku polskim opracowanie liczące 109 stron maszynopisu. Praca zawiera 19 rycin, 11 tabel oraz 126 pozycji literatury a układ pracy jest charakterystyczny dla prac doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych. Praca podzielona jest na części obejmujące Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję i Wnioski. Na końcu pracy umieszczono Streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię oraz wykaz skrótów, rycin i tabel umieszczonych w pracy. Zawartość poszczególnych części pracy jest prawidłowa, a spis treści dobrze przygotowany. Praca napisana jest starannie, poprawną polszczyzną a błędów i literówek jest niewiele.

W rozdziale **Wstęp** Doktorantka w przejrzysty i uporządkowany sposób omawia zagadnienia mające związek z przedmiotem pracy. Autorka przedstawia molekularny mechanizm rozwoju raka jelita grubego i szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w ten proces. Opisuje również proces przejścia epithelialno-mezenchymalnego i typy migracji komórek a także charakterystykę Neuromedyny U i jej receptorów. Autorka wskazuje na metody diagnostyczne i klasyfikacje służące do oceny stopnia zaawansowania raka jelita grubego. Stosunkowo dużo miejsca we wstępie Autorka poświęciła na opis terapii przeciwnowotworowych w raku jelita grubego. Tę część pracy czyta się z przyjemnością.

Moje krytyczne uwagi do tej części dotyczą przede wszystkim wykorzystanych pozycji literatury. Zazwyczaj Autorka podaje cytacje na końcu akapitu lub podrozdziału, często cytując prace przeglądowe. Jest to zrozumiałe dla ogólnego opisu procesu jak to ma miejsce w podrozdziale 1.2. „Proces nowotworzenia” lub np. w rozdziale 1.1. gdzie zacytowana praca przeglądowa (Pino i Chung, 2010) podaje przykłady genów supresorowych wymienionych w tym rozdziale. Jednak przy opisach mechanizmów czy konkretnych procesów brakuje odniesień do prac oryginalnych. Pozycje te powinny znaleźć się po zdaniu opisującym dane zjawisko.

We wstępie zabrakło mi także dokładniejszego opisu białek zaangażowanych w migrację i sposobów regulacji potencjału migracyjnego (podrozdział 1.4.).

Cele pracy i metodyka badawcza

Celem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie roli neuromedyny U w progresji raka jelita grubego a zwłaszcza jej wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych. Szczegółowe cele obrane przez Doktorantkę obejmowały analizę poziomu neuromedyny U oraz jej receptorów w wybranych liniach komórkowych raka jelita grubego oraz medium pochodzonym, analizy wpływu poziomu NMU na aktywację szlaku sygnalizacyjnego kinaz MAP/ERK oraz ocenę wpływu nadekspresji NMU na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka jelita grubego. Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie, jednak pomimo tego faktu, brakuje precyzyjnych metod diagnostycznych pozwalających na identyfikację choroby we wczesnym stadium. Neuromedyna U to białko wydzielnicze, którego rola w procesie nowotworzenia nie jest dobrze udokumentowana. W kontekście poszukiwania nowych czynników diagnostycznych lub prognostycznych NMU może stanowić nowy cel badawczy i podjęcie takiej tematyki pracy było jak najbardziej zasadne.

Część **Materiały i metody** opisana jest poprawnie a załączone tabele ułatwiają prześledzenie użytych materiałów i wykorzystanych w pracy metod. Zastosowane metody doświadczalne były adekwatne do celu postawionego w projekcie i umożliwiały jego uzyskanie. Spektrum wykorzystanych metod świadczy o dobrym przygotowaniu doktorantki do pracy doświadczalnej.

Moje krytyczne uwagi tej części pracy dotyczą nieścisłości w opisach, używania żargonu laboratoryjnego lub zwrotów anglojęzycznych, np. „odczynniki używane do doświadczeń charakteryzowały się najwyższym możliwym stopniem czystości”, „komórki odklejono od podłoża hodowlanego” czy „konfluencji” zamiast gęstości, „osad” zamiast pelet komórek. Chciałam także poprosić o wyjaśnienie na jakiej podstawie dokonano wyboru genu referencyjnego do analizy PCR w czasie rzeczywistym i czy w przedstawionych analizach wykorzystywano dwa podane geny, GAPDH i βaktynę? W przedstawionej metodyce Autorka podaje, że amplifikacja obejmowała 45 cykli reakcji, chciałam zapytać w którym cyklu obserwowano poszczególne produkty? Nie znalazłam również informacji na jakiej podstawie wybrano stężenia agonisty receptorów NMU 1 i NMU 2, które w teście mobilizacji wapnia wynoszą odpowiednio 40 nM i 200 nM. Co więcej, nie jest dla mnie jasne, dlaczego w badaniu aktywacji kinaz białkowych agonista receptora NMU 2 został użyty w końcowym stężeniu 250 nM, a nie 200 mM jak w teście mobilizacji wapnia. Nie znalazłam także informacji o stężeniu użytego inhibitora kinaz MAPK, PD98059.

Uzyskane wyniki i ich interpretacja

W części **Wyniki** Doktorantka przedstawia charakterystykę 6 linii komórkowych raka jelita grubego, pod względem poziomu transkryptów i białek dla NMU i jej receptorów a także receptora alternatywnego. Charakteryzuje poziom NMU wydzielanego do medium hodowlanego. Wskazano również, że ekspresja receptorów NMU jest regulowana przez proces metylacji. W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła wyniki wykonane na komórkach z nadekspresją NMU i obejmujące m.in. badanie wpływu NMU na potencjał migracyjny komórek. Wyniki przedstawione są przejrzysto i dobrze opisane. Jednak ta część pracy pozostawia pewien niedosyt i skłania do zadania kilku pytań.

Z uwagi na fakt, że praca dotyczy roli NMU w regulacji potencjału migracyjnego komórek raka jelita grubego, w przedstawionych w pracy wynikach zabrakło mi pokazania wpływu NMU na poziom białek zaangażowanych w aktywację migracji, m.in. białek Ras, kinazy SRC, kinazy płytek przylegania (ang. focal adhesion kinase, FAK) czy kinazy AKT oraz pokazania zmian w cytoszkieletcie aktywnym. W pracy poddano analizie aktywację kinaz ERK, które należą do rodziny kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK). MAPK są kluczowymi szlakami sygnałowymi, które regulują różnorodne procesy komórkowe, w tym proliferację, różnicowanie, apoptozę i reakcje na stres. Doktorantka wskazuje na ścieżkę sygnałową kinaz ERK 1/2 jako odpowiedzialną za potencjał migracyjny komórek raka jelita grubego. Tu prosiłabym o wyjaśnienie, o który element szlaku chodziło Doktorantce i w jaki sposób kinazy ERK mogą regulować migrację komórek.

Kolejną kwestią, którą chciałabym wyjaśnić, to przeprowadzenie doświadczeń i interpretacja wyników uzyskanych w teście migracji komórek przez filtry poliwęglanowe. Z pracy wynika, że w tych doświadczeniach komórki były inkubowane w gradiencie stężeń surowicy. Nie do końca rozumiem wykorzystanie surowicy jako chemoatraktanta w sytuacji, kiedy NMU to białko wydzielnicze i ono było przedmiotem badań. W teście chemotaksji przez filtry surowica zazwyczaj stanowi kontrolę pozytywną. Dlatego, w mojej opinii, w teście badającym zdolności migracyjne komórek pod wpływem NMU, komórki powinny migrować w kierunku medium pohodowlanego z komórek z nadekspresją NMU lub w kierunku chemoatraktantów: gradientu NMU syntetycznej, lub agonisty względem NMUR2 – SBL-NMU-17, który aktywuje zmiany poziomu wapna i fosforylację kinaz ERK. Co więcej, zahamowanie ścieżki kinaz MAP w przypadku zastosowania surowicy jako chemoatraktanta nie wskazuje jednoznacznie, że kinazy te odpowiadają za migrację aktywowaną NMU. Surowica może aktywować szereg ścieżek sygnalizacyjnych (w tym szlak kinaz MAP) i tym samym wpływać na aktywność migracyjną komórek. Zaobserwowano także, że komórki z nadekspresją NMU migrują

efektywniej przez Matrigel. Czy sprawdzano poziom metaloproteinaz w komórkach z nadekspresją NMU?

Prosiłabym także o wyjaśnienie celu doświadczeń immunoprecypitacji, których wyniki prezentowane są na Ryc. 13. Z opisu metody wynika, że medium było bardzo zagęszczone (w mojej opinii zastosowanie 5 ml medium na butelkę 75 cm² i 48 godziną inkubacją to zbyt mało, aby komórki nie podeschły), a do analiz użyto połowę medium zebranego z komórek. W wypadku wykorzystania metody immunoprecypitacji można mówić raczej o detekcji danego białka, a nie jak napisano w pracy o ocenie poziomu białka. Do oceny poziomu wydzielanego białka najlepsza byłaby metoda ELISA lub metoda western blot. Czy wykorzystanie metody immunoprecypitacji spowodowane było faktem, że komórki pomimo nadekspresji NMU i wykazanego wysokiego poziomu endogennego białka, przedstawionego na Ryc. 12, nie wydzielają go efektywnie do medium? Co może regulować poziom wydzielanego białka?

W opisie analiz statystycznych podano, że wyniki uzyskano w minimum 3 niezależnych eksperymentach. W opisie rycin brakuje informacji, ile powtórzeń wykorzystano w danej analizie, czy były to trzy powtórzenia czy więcej. Chciałam także dopytać o brak istotności statystycznej na Ryc. 13 na wykresach przedstawiających analizy densytometryczne. Dla tej samej ryciny w opublikowanej pracy w czasopiśmie Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (Fig. 6A) wyniki te wskazują na istotny statystycznie wzrost poziomu NMU w medium pohodowlanym.

Praca zakończona jest **Dyskusją**, która stanowi bardzo dobre podsumowanie otrzymanych wyników. Dyskusja przeprowadzona jest bardzo sprawnie, świadczy o dobrej znajomości tematu i czyta się ją z przyjemnością. W dyskusji Doktorantka odnosi się do własnych wyników, ale też bardzo szeroko dyskutuje możliwości prowadzenia dalszych badań. W tej części pracy zabrakło mi jednak lepszego przedyskutowania roli NMU w regulacji potencjału migracyjnego, zwłaszcza, że to było nadrzędnym celem pracy. Nie znalazłam w pracy wytłumaczenia jaki jest mechanizm aktywacji potencjału migracyjnego komórek przez wpływ na fosforylację kinaz ERK 1/2.

Pracę kończą dobrze napisane **Wnioski końcowe**, jednak stwierdzenie, że „NMU uruchamia procesy podobne do tych zachodzących podczas EMT” jest w mojej opinii zbyt daleko idące. Nie znalazłam w pracy wyników, które by potwierdzały wpływ NMU na proces EMT.

Pomimo tych zastrzeżeń chciałabym podkreślić, że w pracy uzyskano wiele interesujących wyników, które dostarczyły nowych danych na temat roli NMU i z pewnością są to wyniki, które skłaniają do kontynuowania badań. Tematyka badań podjęta w pracy jest istotna i aktualna. Wykonane analizy pokazują opanowanie szerokiego wachlarza metod badawczych.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego, wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w swojej dyscyplinie naukowej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. W mojej opinii, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668). W związku z tym przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniossek o dopuszczenie pani mgr Eweliny Sochackiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Katarzyna Miękus