



Poznań, 15.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamili Soboskiej pt. "Neuromedyna U (NMU) jako regulator aktywności komórek mikrośrodowiska raka jelita grubego"

Każdego roku w Polsce wykrywa się ponad 18 tysięcy zachorowań na raka jelita grubego. Jest on trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym, na który zapadają mężczyźni, i drugim, na który chorują kobiety. Co niepokojące, od kilku lat zachorowalność i umieralność na raka jelita grubego wzrasta. Powszechnie znanym jest fakt, iż patogenezą, stopień agresywności, jak i zdolność przerzutowania nowotworów jest regulowana przez szereg bioaktywnych peptydów. Peptydy te na drodze auto, para lub endokrynowej działają bezpośrednio na komórki nowotworowe, lub też pośrednio, poprzez komórki mikrośrodowiska guza. Badania ostatnich lat wskazują na znaczącą rolę peptydu sekrecyjnego neuromedyny U (NMU) oraz jej receptorów (NMUR1 i NMUR2) w patogenezie wielu typów nowotworów. Ekspresja NMU koreluje z inwazyjnością komórek nowotworowych oraz nabywaniem chemooporności i może być rozpatrywana jako potencjalny marker diagnostyczny lub prognostyczny w raku płuc, piersi, nerek, macicy. Ekspresję receptorów NMU wykazano także w makrofagach i komórkach śródbłonki naczyń oraz zaobserwowano, że NMU stymuluje makrofagi do wydzielania IL-6. Przynieszone obserwacje stanowiły punkt wyjścia dla recenzowanej pracy, w której Doktorantka postanowiła sprawdzić, jaka jest rola NMU w interakcji między komórkami raka jelita grubego a komórkami mikrośrodowiska guza. Podjęta tematyka badawcza wpisuje się w nurt aktualnych i niezwykle istotnych badań o bardzo dużym potencjale publikacyjnym oraz aplikacyjnym.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma strukturę typową dla prac doktorskich przygotowanych na zasadzie monografii. Obejmuje łącznie 113 stron maszynopisu, w skład którego wchodzi: wykaz źródeł finansowania, wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, literatura.

Warto zaznaczyć, że przedstawione badania były finansowane z grantu „Sonata Bis” przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem jest Pani dr Patrycja Przygodzka – promotor pomocniczy ocenianej rozprawy. Już sam fakt uzyskania finansowania w ramach programu NCN świadczy o tym, że badania będą przeprowadzone na wysokim poziomie, których wyniki znacznie przyczynią się do rozwoju wiedzy naukowej z zakresu poruszanego tematu.

Wstęp pracy liczy dwanaście stron i stanowi doskonale wprowadzenie do analizowanego problemu badawczego. Pierwszy podrozdział wstępu przedstawia mechanizmy molekularne patogenezы raka jelita grubego. Opisuje między innymi udział genu APC, TP53 oraz niestabilności mikrosatelitarnej w procesie transformacji nowotworowej. W kolejnym podrozdziale doktorantka opisuje rolę mikrośrodowiska guza w procesie powstawania i rozwoju nowotworu. Szczegółowo skupia się na charakterystyce makrofagów oraz komórek śródbłónka naczyń. Wskazuje, że rola makrofagów w patogenezie raka jelita grubego jest niejednoznaczna i wymaga dalszych badań – fakt ten stanowi silne uzasadnienie badań podjętych w ocenianej rozprawie.

Kolejny podrozdział rozprawy zawiera krótką charakterystykę peptydu NMU oraz jej receptorów (NMUR1, MNUR2). Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na jeden szczegół. Autorka opisuje NMU jako małe białko, jednakże ze względu na fakt, iż dojrzała neuromedyna U jest zbudowana z 25, 23 lub 8 aminokwasów to myślę, że bardziej trafnym byłoby określać ją jako peptyd.

W dalszej części podrozdziału doktorantka przedstawia proces biosyntezy NMU, który w konsekwencji prowadzi do powstania wielu izoform NMU o różnym stopniu aktywności biologicznej. Następnie Doktorantka opisuje strukturę oraz mechanizm przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego poprzez oddziaływanie NMU z jej receptorami. Chciałbym docenić fakt, iż prezentowane ryciny w tym podrozdziale zostały w całości wykonane przez Doktorantkę i nie są zaczerpnięte z innych publikacji. Ryciny te są czytelne i bardzo przejrzyste co zasługuje na uznanie.

Kolejny podrozdział skrótowo przedstawia klasyczną rolę NMU w procesach fizjologicznych, jaką jest regulacja skurczu mięśni gładkich. Następnie Doktorantka opisała udział NMU w patogenezie chorób nowotworowych. Jak Doktorantka zauważyła, udział NMU w chorobach nowotworowych został zbadany głównie w odniesieniu do raka piersi i endometrium jednakże istnieją publikacje sugerujące istotną rolę NMU w przebiegu raka jelita grubego. W odniesieniu do roli NMU w patogenezie raka jelita grubego, poza publikacjami wykorzystujące dane z bazy TCGA, Doktorantka odnosi się do dwóch prac, w których wiodącą rolę pełni

Promotor ocenianej rozprawy prof. Joanna Boncela oraz promotor pomocniczy dr Patrycja Przygodzka, a Doktorantka jest także współautorką ostatniej pracy ([1] P. Przygodzka, E. Sochacka, K. Soboska, M. Pacholczyk, I. Papiewska-Pajak, T. Przygodzki, P. Plocinski, S. Ballet, A. De Prins, J. Boncela, Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor, J Exp Clin Cancer Res, 40 (2021) 283.

[2] P. Przygodzka, I. Papiewska-Pajak, H. Bogusz, J. Kryczka, K. Sobierajska, M.A. Kowalska, J. Boncela, Neuromedin U is upregulated by Snail at early stages of EMT in HT29 colon cancer cells, Biochim Biophys Acta, 1860 (2016) 2445-2453.)

Wspominane publikacje cieszą się sporym zainteresowaniem innych badaczy, i tak też praca z 2016 roku jest obecnie już 24 razy cytowana. W pracy tej, do której również odnosi się Doktorantka, wykazano, że w linii komórkowej komórek raka jelita grubego HT29 z nadekspresją genu Snail – głównego regulatora przejścia nabłonkowo-epelialnego, ekspresja NMU znacząco wzrasta, a sama NMU ulegała intensywnemu wydzielaniu. Publikacje te, jak i cały wstęp pracy stanowią doskonałą oraz logiczną podstawę do postawienia głównej hipotezy badawczej

Głównym celem pracy była weryfikacja hipotezy, że NMU wydzielana przez komórki nowotworowe raka jelita grubego reguluje aktywność komórek mikrośrodowiska guza, stymulując proces nowotworzenia. Główną hipotezę badawczą Doktorantka zweryfikowała poprzez realizację kilku bardzo ambitnych celów szczegółowych. Doktorantka scharakteryzowała kilka linii komórkowych raka jelita grubego pod względem ekspresji NMU. Opracowała metody różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów wraz z określeniem ekspresji markerów powierzchniowych charakterystycznych dla poszczególnych fenotypów, jak również pod względem ekspresji genów i białek NMU i jej receptorów. Zbadala aktywację receptorów NMU w makrofagach oraz komórkach śródbłonka naczyniowego. Ocenila wpływ NMU na zmiany fenotypowe, jak i funkcjonalne makrofagów oraz komórek śródbłonka naczyń. Zbadala wpływ czynników wydzielanych przez makrofagi stymulowane NMU na migrację komórek raka jelita grubego.

Rozdział materiały i metody poprzedza kolejna doskonała rycina przedstawiająca schemat badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Rycina znacznie ułatwia podążanie za logicznym ciągiem ambitnych prac badawczych wykonanych w ramach doktoratu. W pierwszym podpunkcie rozdziału materiały i metody wymieniono odczynniki wykorzystane w pracy wraz z podaniem wyjściowych stężeń oraz producenta. Następnie Doktorantka przedstawiła charakterystykę sześciu linii komórkowych: CCD 841 CoN, HT29, Caco-2, HCT116, SW480, SW620, HCT15. Wykorzystane linie komórkowe stanowiły zarówno prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego, jak i linie nowotworowe o fenotypie nabłonkowym

lub mezenchymalnym. Jako model komórek śródbłonna naczyń wykorzystano komórki linii HMEC-1. Jako model monocytów użyto komórki linii THP-1. Szczegółowo opisano warunki hodowlane poszczególnych typów komórek, proces pasażowania, metody liczenia komórek oraz ocenę żywotności. Hodowle komórek testowano także na obecność mikoplazmy oraz potwierdzano autentyczność wykorzystanych linii komórkowych poprzez analizę profilu STR. W mojej ocenie analizy STR nie są rutynową procedurą wykonywaną we wielu laboratoriach, jednakże ich wykonanie potwierdza, że uzyskane wyniki stanowią rzeczywistą reakcję właściwych, pożądaných komórek na dany czynnik. Fakt, iż Doktorantka wykonywała badania profilu STR, świadczy o profesjonalnym podejściu do procedur hodowli komórkowej oraz bardzo uwiarygadnia uzyskane wyniki.

W kolejnej części rozdziału materiały i metody Doktorantka szczegółowo opisuje sposób przygotowania wektora ekspresyjnego, opis transfekcji komórek HT29 wraz z selekcją klonalną, opis izolacji monocytów, procedurę różnicowania monocytów i polaryzację makrofagów do fenotypów M1, M2a, M2c, wyciszanie ekspresji receptora MNUR1 w linii komórkowej monocytów THP-1, przygotowanie medium pohodowlanego, izolację RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji, reakcję QPCR czasie rzeczywistym, izolację białka wraz z analizą western blotting, immunoprecypitacja NMU z medium hodowlanego, analizę panelu cytokin w medium hodowlanym, barwienie immunofluorescencyjne wraz z mikroskopią konfokalną, cytometrię przepływową, analizę aktywacji ścieżki MAPK, ocenie zmian fenotypu, analizę chemotaksji oraz migracji, ocenę tworzenia struktur pseudokapilarnych. Muszę przyznać, że jestem pod ogromnym wrażeniem zakresu wykorzystanych procedur i metod w ocenianej rozprawie. Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych metod hodowli komórkowej, biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej. Wszystkie metody zostały opisane szczegółowo w taki sposób, że czytając doktorat, istnieje możliwość ich odtworzenia – co stanowi sedno tego rozdziału.

Ogrom otrzymanych danych został przeanalizowany odpowiednimi testami statystycznymi. Doktorantka oceniła normalność rozkładu z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka i na podstawie otrzymanych wyników wykorzystwała testy parametryczne – t studenta lub ANOVA z odpowiednim testem posthoc. W przypadku braku rozkładu normalnego wykorzystano nieparametryczne odpowiedniki wyżej wymienionych testów t.j. test U Manna-Whitneya oraz test Kruskala-Wallisa wraz z odpowiednim testem posthoc. Różnice pomiędzy danymi zależnymi oceniono poprzez wykorzystanie odpowiednio sparowanego testu t-Studenta dla wyników zgodnych z rozkładem normalnym lub nieparametrycznego testu rang Wilcoxon.

Po analizie rozdziału nasuwa mi się kilka pytań, które mają głównie charakter dyskusyjny i w żaden sposób nie wpływają na mój bardzo dobry odbiór recenzowanej pracy:

Obecnie wiadomo, że NMU charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania, wynoszącym mniej niż 5 min po wstrzyknięciu podskórnym. W przedstawionej do oceny pracy Doktorantka badała wpływ NMU na aktywność fizjologiczną makrofagów oraz komórek śródbłonka w systemie *in vitro*. W doświadczeniach tych badane komórki poddano inkubacji z NMU9 w czasie 48 godzin. Czy w przeprowadzonych badaniach został arbitralnie określony optymalny czas działania peptydu, czy też zastosowano standardową procedurę w tego typu eksperymentach?

Reakcje QPCR przeprowadzono w odniesieniu do genu beta aktyny lub GAPDH. Wiemy, że gen referencyjny powinien cechować się stałą nieregulowaną ekspresją, jednakże obecnie wiemy także, że nie ma idealnego genu referencyjnego, którego ekspresja nie byłaby regulowana we wszystkich układach badawczych. Czy przed wykonaniem właściwych pomiarów ekspresji podjęto się analizy profili ekspresji genów referencyjnych np. z wykorzystaniem oprogramowania genorm lub też poprzez analizę baz transkryptomicznych z podobnych eksperymentów?

Według bazy sekwencji DNA NCBI obecnie jest opisanych sześć wariantów splicingowych genu prekursorowego NMU, w związku z czym czy para starterów wykorzystanych do reakcji PCR była zaprojektowana tak, aby amplifikować wszystkie warianty splicingowe genu? Czy też są to primery specyficzne dla jednego typu transkryptu NMU?

W pracy zastosowano metodę western blot do oceny poziomu białek wydzielonych. Dlaczego nie wykorzystano metody ELISA? Metoda ta wydaje się bardziej odpowiednia dla analizy ilościowej białek w surowicy/medium hodowlanym.

Rozdział wyniki przedstawiony jest w logiczny sposób w odniesieniu do opisu metodycznego wcześniejszego rozdziału oraz załączonego schematu badawczego. Wyniki przedstawiono jako surowe dane w postaci prążków lub sygnałów barwnych na membranach/żelach wraz z wynikami przedstawionymi w formie liczbowej, głównie jako wykresy wykonane w programie Graphpad. Wykresy generowane w tym programie są bardzo czytelne i w przedstawionej formie nadają się do ostatecznej publikacji w wysoko punktowanym czasopiśmie naukowym.

Zgodnie ze schematem badawczym oceniono ekspresję NMU w różnych liniach raka jelita grubego zarówno na poziomie mRNA, wewnątrzkomórkowego oraz wydzielonego peptydu. Mam pytanie do ryciny 8 – w opisie ryciny Doktorantka piszę, że istotność statyczną różnic poziomu ekspresji oszacowano testem Wilcoxon. Czy na pewno wykorzystano ten test? Test

Wilcoxon jest odpowiedni dla prób zależnych, a tu każda osobna linia komórkowa nie tworzy takiego układu.

Na podstawie porównań poszczególnych linii komórkowych wykazano, NMU ulega najsilniejszej ekspresji w linii HCT116, natomiast linia HT29 cechuje się niskim poziomem ekspresji NMU i w związku z czym wykorzystano tę linię do przeprowadzenia transfekcji wcześniej przygotowanym wektorem ekspresyjnym kodującym NMU. Doktorantka przedstawiła szczegółowo sposób przygotowania wektora do transfekcji wraz z selekcją klonalną i identyfikacją klonów wydzielających NMU. W wyniku przeprowadzonej procedury wyselekcjonowano osiem klonów linii HT29, w których ekspresja NMU była istotnie statystycznie podwyższona, z czego dwa klony intensywnie wydelały dojrzałą NMU do medium hodowlanego. Do dalszych badań wybrano jeden klon, w którym oceniono zmiany profilu cytokin z wykorzystaniem Proteome Profiler Human Cytokine Array. Zaobserwowano wyższy poziom cytokin CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra i IL-8 oraz niższy poziom CXCL-12 w stosunku do medium pochodzącego z klonu kontrolnego. Kolejna spora część pracy dotyczyła opracowania optymalnej metody różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów. Efektywność stosowanych procedur różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów zweryfikowano poprzez identyfikację markerów powierzchniowych charakterystycznych dla poszczególnych fenotypów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, a następnie wykazano, że ekspresja NMU w monocytach oraz poszczególnych fenotypach makrofagów jest relatywnie niska, a nawet na poziomie białka była ona poniżej progu detekcji. Wykazano, że NMUR1 ulega ekspresji w monocytach oraz różnicowanych makrofagów, nie wykazano natomiast ekspresji NMUR2. Obecność NMUR1 potwierdzono także za pomocą metod immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał. Najwyższy poziom ekspresji NMUR1 wykazano w niespolaryzowanych makrofagach, które przeznaczono do dalszych badań. Czy w odniesieniu do ryciny 22 oraz komórek PBM nie powinna być mniejsza skala? Wydaje się, że zdjęcia tych komórek są robione na mniejszym powiększeniu. Analogiczne analizy ekspresji przeprowadzono w odniesieniu do komórek HMEC-1, które wykorzystano jako model śródbłonna naczyniowego. Ekspresja NMU była tu niewielka, ale mierzalna na poziomie RNA, jednakże brak było jakiegokolwiek ekspresji na poziomie białka. W komórkach HMEC-1 wykazano, że receptor NMUR1 ulega znacznej ekspresji. Mam pytanie o opis ryciny. W opisie ryciny 24,27 Doktorantka pisze, że istotność statystyczną szacowano testem Wilcoxon, ale w przedstawionym wykresie mamy tylko jedną grupę.

W kolejnej części pracy za pomocą metody western blotting wykazano aktywację przez NMU ścieżki sygnałowej MAPK wyrażonej przez zwiększenie fosforylacji kinaz ERK 1/2. Na

podstawie analizy efektów działania NMU na makrofagi stwierdzono, że promuje ona zmianę fenotypu makrofagów w pronowotworowy fenotyp M2. NMU działała również chemotaktycznie względem makrofagów, a także zwiększała ich zdolności migracyjne i wpływała na profil cytokin wydzielanych przez te komórki (poprzez zwiększenie wydzielania CCL-2 i CXCL-12). Dodatkowo stwierdzono stymulujący wpływ medium z makrofagów traktowanych NMU na migrację komórek raka jelita grubego. Otrzymane wyniki świadczą więc o możliwości wykorzystania NMU przez komórki nowotworowe do regulowania fenotypu makrofagów sąsiadujących z nimi w niszy guza na potrzeby rozwoju nowotworu.

Uzyskane wyniki Autorka przedyskutowała w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. W mojej ocenie dyskusja jest trafna, rzetelna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników. Rozdział ten świadczy o znajomości badanej problematyki, a także dojrzałości Autorki dysertacji w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Wnioski są zdefiniowane prawidłowo, jasno wynikają ze stawianych celów rozprawy i znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach pracy. Dodatkowo wnioski podsumowane są schematem działania NMU w mikrośrodkowisku raka jelita grubego. Schemat ten stanowi doskonale podsumowanie rozprawy i bezpośrednio wynika z przeprowadzonych eksperymentów.

Reasumując, jestem pod ogromnym wrażeniem jakości przeprowadzonych badań, złożonością technik badawczych wykorzystanych w doktoracie, jak również uzyskanymi wynikami. Z pewnością stanowią one istotny wkład w poszerzenie wiedzy z zakresu regulacji procesu nowotworzenia przez bioaktywne peptydy. Jestem także przekonany, że uzyskane wyniki będą wkrótce opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim wskaźniku IF. Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione przed sobą ambitne cele badawcze. Zaprezentowane badania, poza aspektem poznawczym, cechują się sporym potencjałem aplikacyjnym. Praca napisana jest starannie, w dobrym stylu. Jest ona również doskonała od strony wizualnej.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Marcin Ruciński



prof. dr hab. Marcin Ruciński