

Dr hab. n.med. prof. uczelni Elżbieta Rębas

Zakład Neurochemii Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

### **Recenzja pracy doktorskiej**

**mgr Agnieszki Zaczek**

#### **„Udział białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa została wykonana w Katedrze Cytobiochemii Instytutu Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Anny Krześlak. Celem pracy była ocena udziału białka BMI-1 w regulacji kinazy AKT w warunkach hipo- i hiperglikemii w komórkach raka endometrium. Zbadano także wpływ oraz potencjalny mechanizm działania tego białka na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek. Dane literaturowe wskazują na udział białka BMI-1 w rozwoju wielu nowotworów nie było jednak dotychczas badań wyjaśniających działanie białka BMI-1 w komórkach raka endometrium. Wyjaśnienie tego działania jest o tyle pożądane, że jak wynika z dostępnych danych mechanizm działania BMI-1 jest zależny od rodzaju tkanki i w różnych komórkach może wykazywać różne cechy. Temat jest niezwykle ważny ponieważ rak trzonu macicy jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów u kobiet, a znając dokładnie kierunek działania białka BMI-1 oraz mechanizm tego działania w komórkach nowotworowych (w tym raka endometrium) można wykorzystać elementy szlaku sygnalizacyjnego, w którym uczestniczy to białko jako cele w terapii przeciwnowotworowej. Leczenie raka endometrium zależy od stopnia zaawansowania i klasyfikacji złośliwości, ale najczęściej polega na chirurgicznym usunięciu narządu oraz radioterapii czy chemioterapii (zależnie od potrzeb). Usunięcie macicy jest szczególnie traumatyczne dla młodych kobiet (co prawda nowotwór ten diagnozowany jest w większości u starszych pacjentek w okresie około- i postmenopauzalnym ale nie tylko), natomiast radio- i chemioterapia jest źle znoszona zarówno fizycznie jak i psychicznie u większości kobiet poddawanych tej terapii. Stworzenie lepszych

warunków leczenia w tak trudnym dla pacjenta okresie poprzez wykrycie nowych, efektywnych ale mniej uciążliwych terapii wydaje się być istotne w obecnych czasach, w których liczba przypadków zachorowań na raka endometrium wzrasta. Zastosowanie inhibitorów ekspresji białka BMI-1 w połączeniu z obecnie stosowanymi terapiami mogłoby zapewnić lepsze rezultaty leczenia, ale także mogłoby jednocześnie ograniczyć metody bardziej uciążliwe (np. krótszy czas lub mniejsze dawki co skutkowałoby ograniczeniem efektów ubocznych). Ponieważ czynnikami zwiększającymi ryzyko rozwoju raka endometrium jest otyłość i cukrzyca, Doktorantka przeprowadziła swoje doświadczenia również w warunkach niskiego i wysokiego poziomu glukozy oraz po stymulacji komórek insuliną. Obiecujące wyniki pracy Doktorantki mogą więc znaleźć w przyszłości praktyczne medyczne zastosowanie a samo podjęcie badań uważam za jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska jest monografią liczącą 121 stron i podzieloną klasycznie na Część teoretyczną (24 strony), Cel pracy (1 strona), Materiały i metody (16 stron), Wyniki (32 strony), Dyskusję (9 stron) oraz Wnioski (1 strona). Proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. Na końcu rozprawy zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim a całości dopełnia zamieszczony na początku rozprawy spis stosowanych skrótów oraz spis treści.

W części teoretycznej doktorantka wyczerpująco przedstawia dostępny w literaturze stan wiedzy na temat białka BMI-1 i jego roli w rozwoju nowotworów. Część ta podzielona została na krótki wstęp oraz trzy rozdziały. W pierwszej kolejności przedstawiona została ogólna charakterystyka białka BMI-1: struktura, synteza i jej regulacja. W drugiej części więcej miejsca Doktorantka poświęca roli białka BMI-1 w różnych procesach komórkowych np. w cyklu komórkowym, w regulacji szlaku kinazy AKT, w procesach apoptozy i autofagii komórek, w procesie starzenia się komórek. W ostatnim rozdziale Autorka przedstawia dostępne dane na temat udziału białka BMI-1 w procesie nowotworzenia, opisuje jego rolę w komórkach nowotworowych, zmiany w ekspresji BMI-1 w komórkach nowotworowych oraz potencjalne wykorzystanie BMI-1 jako celu w terapiach antynowotworowych. Cała część teoretyczna uzupełniona jest pięcioma ilustracjami i stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę pracy. Świadczy też o teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia prac doświadczalnych oraz o dobrej znajomości tematu. Warto podkreślić, że Doktorantka jest również pierwszym autorem

pracy przeglądowej opublikowanej w 2017 roku, zatytułowanej „Participation of BMI-1 protein in cancer”.

Na kolejnej stronie rozprawy jasno przedstawione zostały założenia i cel pracy. Celem głównym pracy było zbadanie roli białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w warunkach hipo- i hiperglikemii oraz jego wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych. Doktorantka przedstawiła także cele szczegółowe takie jak: ocena zahamowania ekspresji BMI-1 na fosforylację kinazy AKT i ekspresję fosfataz zaangażowanych w regulację jej aktywności, ocena stymulacji insuliną na w/w procesy, ocena zahamowania ekspresji BMI-1 na żywotność i proliferację w warunkach hipo- i hiperglikemii, ocena wpływu zahamowania ekspresji BMI-1 na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka endometrium i mechanizmu tego wpływu, porównanie ekspresji BMI-1 oraz stopnia fosforylacji kinazy AKT w komórkach prawidłowych i nowotworowych raka endometrium o różnym stopniu zaawansowania, naciekania i złośliwości.

Kolejne rozdziały to Materiały i Metody. Doktorantka użyła do doświadczeń dwóch linii komórkowych raka błony śluzowej trzonu macicy HEC-1A oraz Ishikawa różniące się ekspresją fosfatazy PTEN. Obie linie zostały trafnie dobrane do planowanych doświadczeń. Część doświadczeń została wykonana z wykorzystaniem materiału klinicznego uzyskanego od pacjentek leczonych z powodu raka endometrium. Preparaty różniły się stopniem zaawansowania, stopniem złośliwości, stopniem naciekania mięśniówki oraz zajęciem węzłów chłonnych. Autorka porównywała wyniki z preparatami tkanki prawidłowej. Zabrakło mi informacji o pochodzeniu tkanki prawidłowej, czy były to preparaty tzw. tkanki około nowotworowej czy też uzyskane od pacjentek poddanych zabiegowi z innego powodu.

Zwraca uwagę znajomość technik wykorzystywanych w biologii molekularnej stosowanych przez Doktorantkę. Wśród nich wymienić należy m.in. techniki z zakresu hodowli komórkowych, hamowanie ekspresji na poziomie RNA i białka, izolowanie RNA, Real Time PCR, Western blotting, testy na migrację i inwazję („wound-healing” i „Transwell-assay”) oraz na przeżywalność komórek czy immunoprecypitacja chromatyny. Sposób przeprowadzenia doświadczeń został opisany przez Doktorantkę bardzo dokładnie, krok po kroku. Doktorantka w doświadczeniach stosowała także gotowe zestawy do oznaczeń, zostały one jednak prawidłowo dobrane i również szczegółowo zostało opisane wykonanie doświadczeń z ich użyciem. Rozdział ten zawiera 5 tabel, w których Autorka przedstawiła liczbę komórek na płytkach hodowlanych, nazwy badanych genów z

numerami identyfikacyjnymi poszczególnych zestawów sond, sekwencje zaprojektowanych starterów dla badanych genów oraz stosowane I-rzędowe i II-rzędowe przeciwciała oraz jeden rysunek przedstawiający krzywą wzorcową do oznaczania zawartości białka. Różnorodność użytych metod wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do pracy doświadczalnej. Zabrakło mi w tej części opisanie warunków stymulowania komórek insuliną (str. 42), o tych warunkach dowiadujemy się dopiero przy omawianiu wyników (str. 65).

Do badania przeżywalności i proliferacji Doktorantka stosowała test MTT. Test ten opiera się na ocenie aktywności oksydacyjnej mitochondriów i może być też używany do określania żywotności komórek w populacjach komórek już nie dzielących się, ale aktywnych metabolicznie. Dlatego ostrożnie podchodziłabym do mówienia o badaniu procesu proliferacji przy zastosowaniu tego testu (bardziej odpowiedni byłby np. test BrdU). Pozostawiłabym jedynie ocenę przeżywalności.

Uzyskane wyniki przedstawiono przy użyciu 20 czytelnych i starannie wykonanych rycin oraz 3 tabel. W numeracji rycin opuszczono numer 15 (w związku z tym całej pracy znajduje się 26 a nie 27 rycin). Ta część rozprawy zawiera już elementy dyskusji, Doktorantka przed zamieszczeniem kolejnego wyniku uzasadnia cel wykonania doświadczenia i jego powiązania z wcześniej wykonanymi własnymi eksperymentami jak i z danymi literaturowymi. Dzięki temu całość łączy się w logiczną całość.

Z opisu ryciny 12 wynika, że powinien znajdować się na niej wynik analizy immunodetekcji białka BMI-1 jednak na rycinie ten wynik nie jest pokazany.

W opisach kilku rycin obrazujących zmiany w ekspresji genów (ryc. 10, 13, 14, 23) brakuje informacji o liczbie wykonanych powtórzeń. Ponieważ na pozostałych rycinach przedstawiono średnią z trzech powtórzeń można się jedynie domyślać, że ta liczba dotyczy też pozostałych. Brak też informacji o liczbie wykonanych niezależnych eksperymentów w opisie rycin przedstawiających poziom białka, przedstawiono jedynie reprezentatywne wyniki.

Dyskusja to 9 stron tekstu, na których Doktorantka szerzej omawia uzyskane wyniki i porównuje je z doniesieniami dostępnymi w literaturze światowej co pozwoliło Autorce na wyciągnięcie kilku wniosków, które zostały przedstawione w kolejnym rozdziale. Zabrakło mi graficznego podsumowania uzyskanych wyników np. w postaci schematu, na którym widoczne byłoby porównanie działania BMI-1 w warunkach niskiego i wysokiego stężenia glukozy.

Niewątpliwie wyniki uzyskane przez Doktorantkę wnoszą nowe, istotne informacje na temat udziału białka BMI-1 w patogenezie raka endometrium. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że białko to może odgrywać rolę czynnika łączącego hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem raka endometrium. Wynikiem zasługującym na podkreślenie jest także wykazanie, że działanie białka BMI-1 zależy od ekspresji fosfatazy PTEN. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę dostarczyły również informacji na temat mechanizmu działania BMI-1 na aktywność kinazy AKT oraz na migrację i przeżywalność komórek raka endometrium.

Używane skróty wyszczególnione zostały na początku pracy, w większości przypadków podane zostało pełne rozwinięcie w języku angielskim oraz używana nazwa polska. Zazwyczaj skróty rozwijane były także w tekście przy pierwszym użyciu, choć np. kilka razy użyty na stronie 14 skrót fosfatazy PTEN wyjaśniony został dopiero na stronie 22. W spisie skrótów użyta została potoczna forma Snail1 dla czynnika transkrypcyjnego, taka nazwa widnieje też na rycinach we wstępie, natomiast w dyskusji (str. 92) Doktorantka używa form SNAIL, SNAIL1, to samo dotyczy genu *Zeb1 / ZEB1* i czynnika *Twist1 / TWIST1*. Dobrze byłoby ujednoczyć.

Umieszczony na końcu spis literatury obejmuje 289 pozycji z szerokiego okresu od roku 1951 do najnowszych danych z 2019 roku. Jednak ok. 72 % prac cytowanych w rozprawie to artykuły opublikowane po roku 2011, a 30% pozycji literaturowych to artykuły z ostatnich sześciu lat. Co ważne, najnowsze artykuły zostały wykorzystane w rozdziale Dyskusja, a więc Doktorantka porównuje swoje wyniki z jak najbardziej aktualnymi doniesieniami.

Co warto podkreślić Autorka rozprawy jest współautorem trzech artykułów oryginalnych opublikowanych w liczących się czasopismach zagranicznych o zasięgu światowym ze współczynnikami IF: 4,48; 2,74; 3,46 (w jednej jest pierwszym autorem – IF 4,48) oraz współautorką artykułu przeglądowego wspomnianego wcześniej.

Praca przygotowana jest starannie pod względem edytorskim, napisana poprawnym językiem, znalazłam niewielką liczbę błędów stylistycznych i gramatycznych (str. 42 „próbówkę przenoszono do próbki” – powinno być „zawartość próbki...”; str. 60 „w miejscach promotorowych fosfataz” raczej powinno być „w miejscach promotorowych genów fosfataz”; str. 62 podpis pod ryc. 14 brak litery „i” pomiędzy „*BMI1*” i „genów”; w spisie treści tylko przy rozdziale 3 użyte zostało słowo „rozdział”, tak samo w części teoretycznej str. 28), oraz kilka tzw.

literówek (około 7), najczęstszym błędem był brak spacji pomiędzy wyrazami - 13, jedno zapożyczenie z języka angielskiego „worteksowano” zostało użyte kilka razy.

Podsumowując, praca zawiera elementy nowości, doświadczenia i model badawczy są przemyślane i zaplanowane prawidłowo, a uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę na temat potencjalnego zastosowania białka BMI-1 w terapii nowotworu trzonu macicy i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Opisane drobne uchybienia nie mają wpływu na ogólną pozytywną ocenę pracy. **Przedstawiona do recenzji praca w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim i uzasadnia nadanie Pani mgr Agnieszce Zaczek stopnia naukowego doktora. Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.).*

dr hab. n.med. prof. uczelni Elżbieta Rębas

Łódź, 10 września 2020 roku