

Szczecin, 21.09.2020

Prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk
Instytut Biologii
Uniwersytet Szczeciński

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Agnieszki Zaczek pt. " Udział białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium"

Podłoże molekularne raka endometrium, należącego do często diagnozowanych nowotworów, jest stosunkowo słabo poznane szczególnie u kobiet ze współistniejącą otyłością i rozwiniętą cukrzycą, co stwarza szereg problemów klinicznych dotyczących wyselekcjonowania specyficznych biomarkerów i opracowania skutecznych metod określania ryzyka wystąpienia choroby, jej wczesnego diagnozowania oraz oceny monitorowania efektów leczenia.

Dlatego też uważam, że cel pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Zaczek jest bardzo istotny nie tylko naukowo, ale również ma potencjalnie bardzo duże znaczenie kliniczne dla identyfikacji nowych celów terapeutycznych i opracowania skutecznych strategii leczenia pacjentek onkologicznych ze współtowarzyszącymi zaburzeniami metabolicznymi prowadzącymi do rozwoju cukrzycy. Celem pracy jest bowiem określenie roli białka BMI-1 w rozwoju raka endometrium oraz w wykształcaniu potencjału inwazyjnego i metastatycznego komórek tego nowotworu w warunkach hipoglikemii i hiperglikemii oraz towarzyszącej jej insulinooporności. Recenzowana praca doktorska została wykonana w Katedrze Cytobiochemii Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Anna Krześlak. Jest ona częścią kompleksowych badań prowadzonych przez Promotora rozprawy dotyczących biologii molekularnej nowotworów.

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Zaczek liczy 121 stron, zawiera 26 rycin i 9 tabel oraz spis literatury liczący 289 pozycji. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich.

We „Wstępie” Autorka rozprawy przedstawiła w sposób zwięzły charakterystykę białka BMI-1 należącego do grupy białek represyjnych Polycomb. Doktorantka omówiła strukturę tego czynnika, jego rolę w procesach komórkowych, jak również aktualny stan wiedzy na temat udziału BMI-1 w rozwoju różnych typów nowotworów. Bardzo

wartościowym elementem tego rozdziału jest przedstawienie znaczenia BMI-1 jako potencjalnego celu terapii przeciwnowotworowych. Ta część rozprawy świadczy o dobrej i szerokiej znajomości zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej. Chciałabym przy tym podkreślić znajomość najnowszej literatury, gdyż znacząca część cytowanych przez Doktorantkę pozycji pochodzi z okresu ostatnich 10 lat. Wśród nich znajdują się również prace najnowsze z lat 2015-2019. Wydaje się jednak, że sposób przedstawienia Rozdziału 2. „Rola białka BMI-1 w procesach komórkowych” i Rozdziału 3. „Udział białka BMI-1 w procesie nowotworzenia”, w których Doktorantka przytacza szereg danych eksperymentalnych dotyczących bardzo różnych typów nowotworów uzyskanych przez autorów cytowanych prac w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, jak również w badaniach klinicznych mógłby być zastąpiony bardziej syntetyczną formą przedstawienia tych zagadnień z uwzględnieniem schematów obrazujących udział BMI-1 w sygnalizacji komórkowej. Ułatwiłoby to bowiem znacząco lekturę dalszej części rozprawy doktorskiej. Warto też było w tym rozdziale poświęcić nieco więcej uwagi na przedstawienie dostępnych danych literaturowych na temat udziału BMI-1 w rozwoju raka endometrium.

Cel pracy oraz szczegółowe zadania badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i nie budzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Celem zasadniczym pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Zaczek było określenie roli białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w warunkach hipoglikemii i hiperglikemii w raku endometrium oraz jego wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek tego typu nowotworu. W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe raka endometrium, tj. linię HEC-1A charakteryzującą się obecnością funkcjonalnego białka PTEN oraz linię Ishikawa nie posiadającą aktywnej formy tego białka. Dokonano też analiz molekularnych materiału klinicznego obejmującego preparaty tkanki prawidłowej endometrium oraz preparaty raka błony śluzowej trzonu macicy o różnym stopniu zaawansowania, który pochodził od pacjentek Oddziału Klinicznego Ginekologii Onkologicznej Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej uzyskały pozytywną opinię Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego (UCHWAŁA NR18/KBBNUŁ/I/2017).

Opis materiałów i metod stosowanych w pracy jest wystarczający do interpretacji uzyskanych wyników, jak również do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. W rozprawie przedstawiono też metody analiz statystycznych zastosowane w pracy. Stwierdzam, że Doktorantka jest doświadczonym eksperymentatorem, bardzo dobrze znającym nowoczesne techniki badawcze z zakresu biologii molekularnej, biochemii i badań funkcjonalnych komórki. W pracy zastosowano m.in. technikę interferencji RNA (siRNA) do wyciszania

ekspresji genów, reakcję łańcuchowej polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym do określania poziomu mRNA, immunoprecypitację chromatyny do określania lokalizacji białka BMI-1 w miejscach promotorowych analizowanych genów, technikę Western blotting do oznaczania ilości białka, test biochemiczny MTT do oceny żywotności komórek oraz testy „Wound-healing” i „Transwell assay” do oceny migracji i potencjału inwazyjnego komórek.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych z użyciem komórek raka endometrium wyselekcjonowanych linii HEC-1A i Ishikawa zostały przedstawione na 19 rycinach, natomiast wyniki analiz materiału klinicznego zostały zaprezentowane na Ryc. 27 i zestawione w 3 zbiorczych tabelach. Mimo ogromu pracy włożonego w wykonanie badań eksperymentalnych i przedstawienie uzyskanych wyników w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej, mam jednak szereg uwag szczegółowych, zarówno o charakterze merytorycznym jak i redakcyjnym dotyczącym rozdziału „Wyniki”: i. Doktorantka bardzo dowolnie używa określeń „ekspresja genu” i „ekspresja białka”, co znacząco utrudnia śledzenie omawianych przez nią wyników, zważywszy dodatkowo na fakt, że nie zawsze stosuje przyjętą w literaturze naukowej zasadę, żeby nazwę genu podawać kursywą, a nazwę białka z zastosowaniem zwykłej czcionki (wskazany byłoby stosowanie w pracy określeń „ekspresja genu”, a w przypadku białka, będącego produktem ekspresji genu - „poziom białka”); ii. stosunkowo duża część przedstawionych wyników dotyczących analizy poziomu badanych białek nie zawiera ilościowych wyników analiz densytometrycznych (m.in. Ryc. 7, Ryc. 8, Ryc. 10B, Ryc. 12); iii. przy przedstawianiu wyników analiz statystycznych dotyczących przeprowadzonych badań *in vitro* (Ryc. 9, Ryc. 10A, Ryc. 11, Ryc. 13, Ryc. 14, Ryc. 16, Ryc. 18, Ryc. 20, Ryc. 21, Ryc. 23, Ryc. 24, Ryc. 25, Ryc. 26) nie podano liczby przeprowadzonych niezależnych serii pomiarowych, w przypadku części z nich podano jedynie lakoniczną informację, że: „Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń”; iv. w pierwszej części badań do obniżania poziomu białka BMI-1 w komórkach modelowych raka endometrium linii HEC-1A i Ishikawa zastosowano siRNA hamujący w sposób bardzo selektywny ekspresję genu kodującego to białko oraz inhibitor PTC-209, który wprawdzie również obniżał poziom białka BMI-1, ale przy jednoczesnym znaczącym podwyższaniu poziomu mRNA tego genu, co wskazuje na istnienie mechanizmu kompensacyjnego z zaangażowaniem dodatkowych czynników, które nie zostały zdefiniowane w pracy. Dlatego też dosyć nieoczekiwanym i nieskomentowanym przez Doktorantkę był wybór inhibitora PTC-209, o nie do końca zdefiniowanym mechanizmie działania na obniżanie poziomu BMI-1, w ważnej części przeprowadzonych badań dotyczących określenia udziału tego białka w funkcjonowaniu komórek HEC-1A i Ishikawa

[Faint blue stamp]

[Handwritten signature]

w warunkach hipoglikemii i hiperglikemii; v. przy prezentowaniu wyników badań preparatów tkanek prawidłowych i tkanek raka błony śluzowej trzonu macicy (Ryc. 27) nie zdefiniowano preparatu referencyjnego (R). Powyższe uwagi nie kwestionują wartości naukowej uzyskanych wyników, powinny być jednak wzięte pod uwagę przy przygotowywaniu publikacji do druku w specjalistycznych czasopismach.

Do istotnych wyników uzyskanych przez Doktorantkę było wykazanie, że BMI-1 może wpływać na fosforylację AKT w komórkach raka endometrium poprzez udział w regulacji ekspresji genów *PTEN*, *PHLPP1* i *PHLPP2*. Autorka rozprawy stwierdziła jednocześnie, że poziom białka BMI-1 jest zależny od stężenia glukozy i insuliny głównie w komórkach charakteryzujących się obecnością funkcjonalnej formy białka *PTEN* oraz wskazała, że BMI-1 może odgrywać rolę czynnika łączącego hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium, podkreślając, że jego działanie zależy od szerszego kontekstu molekularnego. Wykazała również, że BMI-1 wpływa stymulująco na proliferację, jak również nasila migrację i inwazję komórek raka endometrium oraz dostarczyła dowodów eksperymentalnych wskazujących na to, że wpływ BMI-1 na potencjał migracyjny komórek raka endometrium może być wynikiem regulacji ekspresji genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym, tj. *SNAIL*, *SLUG* i *CDH1*. Do bardzo znaczących wyników uzyskanych przez Doktorantkę z użyciem materiału klinicznego, obejmującego preparaty prawidłowej i nowotworowej tkanki endometrium było natomiast wykazanie, że zaawansowane stadia raka charakteryzują się zmniejszoną ilością białka BMI-1 i obniżonym poziomem fosforylacji kinazy AKT. Zaobserwowała również w preparatach prawidłowej tkanki endometrium, jak również w przypadku preparatów tkanki nowotworowej charakteryzujących się obecnością funkcjonalnego białka *PTEN* znaczącą odwrotną korelację pomiędzy poziomem BMI-1, a ekspresją genów kodujących fosfatazy *PHLPP*, szczególnie *PHLPP1*. Należy jednak spodziewać się, że zwiększenie liczby preparatów klinicznych w poszczególnych grupach, zgodnie z przyjętą klasyfikacją kliniczno-patologiczną, mogłoby doprowadzić do znalezienia większej liczby korelacji pomiędzy poszczególnymi elementami szlaku sygnalizacyjnego Akt w zależności od stopnia zaawansowania i agresywności raka błony śluzowej trzonu macicy.

Ostrożnie przeprowadzona dyskusja uzyskanych wyników na tle wyników innych autorów świadczy o dużej wiedzy nabytej przez Panią mgr Agnieszkę Zaczek z zakresu biologii molekularnej i biochemii nowotworów oraz o jej dojrzałości badawczej. Bardzo wartościową częścią tego rozdziału jest również fragment, w którym Doktorantka przedyskutowała w sposób przekonujący pozorną sprzeczność dotyczącą uzyskanych w pracy

wyników dla bardziej agresywnych stadiów raka endometrium, które wskazywały na obniżony poziom białka BMI-1 w tych nowotworach w porównaniu z wynikami uzyskanymi w badaniach *in vitro* przeprowadzonych z użyciem komórek modelowych raka endometrium linii HEC-1A oraz Ishikawa, wskazującymi, że zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływa na spadek potencjału migracyjnego i inwazyjnego tych komórek nowotworu endometrium. Wyjaśniła bowiem, że linie komórkowe HEC-1A i Ishikawa wyprowadzono z nowotworów endometrium dobrze zróżnicowanych, o niskim stopniu zaawansowania, które mogą być bardziej zależne od BMI-1, podczas gdy w komórkach nowotworów bardziej agresywnych może dochodzić do innych zmian molekularnych wpływających na wzrost ich potencjału metastatycznego. Weryfikacja tej hipotezy wymagałaby jednak rozszerzenia badań *in vitro* z wykorzystaniem dodatkowej linii komórkowej wyprowadzonej z zaawansowanego raka endometrium o niskim stopniu zróżnicowania i wysokim potencjale inwazyjnym i metastatycznym.

Wnioski zamieszczone w rozprawie zostały sformułowane w sposób odpowiedzialny i nie budzą żadnych zastrzeżeń merytorycznych. Cennym natomiast byłoby nieco szersze przedstawienie przez Autorkę rozprawy perspektyw dalszych badań mających na celu ocenę potencjału diagnostycznego i terapeutycznego białka BMI-1 jako potencjalnego czynnika łączącego hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium.

Rozprawa została zredagowana w sposób przejrzysty i na ogół poprawny stylistycznie, natomiast występują w niej dość licznie drobne błędy edytorskie, wskazujące na to, że Doktorantce zabrakło czasu na zrobienie starannej korekty finalnej wersji pracy. Rozprawa napisana jest zasadniczo poprawnym językiem naukowym, chociaż Autorce nie udało się również uniknąć w kilku miejscach pewnych nieścisłości nomenklaturowych i merytorycznych oraz niezręcznych i/lub niepoprawnych sformułowań, m.in.: i. „potrójnie skręcona β -kartka”; ii. „lipidowe kinazy”; iii. „przeciwiała drugorzędowe skompleksowane z peroksydazą chrzanu”; iv. „Pomiary dla poszczególnych próbek standaryzowano względem kontroli na odczynniki” v. „niższa fosforylacja kinazy Akt”. Nie zamieszczono też w pracy pełnych polskich nazw chemicznych inhibitorów PTC-028, PTC-209 i PTC-596 oraz w wielu przypadkach nie podano wartości temperatur, w których przeprowadzono określone wirowania próbek. Mam też kilka uwag o charakterze redakcyjnym. Uważam m.in., że niektóre treści przedstawione szczegółowo w Rozdziale 6. „Metody” zostały jeszcze raz niepotrzebnie powtórzone w Rozdziale 7. „Wyniki”, natomiast fragmenty przytaczające wyniki innych autorów powinny być przeniesione z Rozdziału 7. „Wyniki” do Rozdziału 8. „Dyskusja”. Uważam też, że w celu ułatwienia analizy wyników dotyczących materiału

klinicznego warto było przyjąć często stosowaną zasadę, że każda tabela powinna stanowić niezależną całość i w Tab. 7 i Tab. 8 podać (np. w nawiasach) liczbę badanych preparatów w każdej z analizowanych grup, zgodnie z dokonany podziałem kliniczno-patologicznym, zamiast odwoływać się każdorazowo do Tab. 1 zamieszczonej w Rozdziale 6. „Metody”. W Rozdziale 8. „Dyskusja” na str. 92 podano też omyłkowo, że „zahamowanie ekspresji BMI-1 wyraźnie zwiększa ekspresję SNAIL i SLUG oraz zmniejsza ekspresję E-kadheryny”, podczas gdy wyniki przedstawione w rozprawie na przytoczonej Ryc. 26 wskazują, że zahamowanie ekspresji BMI-1 obniża ekspresję *SNAIL* i *SLUG* oraz nasila ekspresję genu kodującego E-kadherynę”. Te drobne uwagi wymienione powyżej nie rzutują jednak na moją pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu oceny pracy stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem naukowym Doktorantki i jej Promotora zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione w rozprawie wyniki, dotyczące udziału białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium, są oryginalne i bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak również aplikacyjnym i mogą stanowić ważny punkt wyjścia do dalszych badań. Oceniana rozprawa świadczy również o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie biologii molekularnej nowotworów. Dowodzi także opanowania przez nią bogatego warsztatu metodycznego i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz rozwiązywania oryginalnych problemów naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Stwierdzam też, że zdobyta przez Doktorantkę ogólna wiedza teoretyczna oraz osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie uzasadniają nadanie jej stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauk biologicznych. Wnoszę zatem do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Zaczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk