



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

Zakład Neurochemii Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Aleksandry Szustki

„Udział białek Polycomb w regulacji procesu autofagii w komórkach raka 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 białek kompleksu PRC1, BMI-1 i RING1A/B na proces autofagii oraz określenie efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów tego kompleksu w kombinacji z innymi efektorami autofagii w komórkach raka endometrium linii HEC-1A oraz Ishikawa. Badania wykonywano zarówno w warunkach standardowego oraz obniżonego stężenia glukozy (hipoglikemii). Dane literaturowe wskazują na udział kompleksów represyjnych Polycomb w regulacji autofagii, który to proces jest postrzegany jako mogący odgrywać istotną rolę w patogenezie nowotworów i jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowych. Jednakże mechanizmy regulacji autofagii w komórkach nowotworowych nie zostały dokładnie poznane. Szczegółowe poznanie udziału procesu autofagii w patogenezie nowotworu trzonu macicy jest o tyle pożądane, że jak wynika z dostępnych danych, mechanizm działania białek kompleksu PRC1 zależy od rodzaju tkanki i w różnych komórkach może wykazywać różne cechy. Podjęcie takiej pracy jest jak najbardziej uzasadnione i ważne ponieważ rak trzonu macicy jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów u kobiet i ciągle poszukuje się nowych strategii terapeutycznych, mniej inwazyjnych i mniej obciążających organizm. Leczenie raka endometrium zależy od stopnia zaawansowania i klasyfikacji złośliwości, ale najczęściej polega na chirurgicznym usunięciu narządu oraz radioterapii czy chemioterapii (zależnie od potrzeb). Już samo usunięcie macicy jest szczególnie traumatyczne nie tylko dla młodych kobiet a radio- i chemioterapia jest źle znoszona zarówno fizycznie jak i psychicznie przez większość kobiet poddanych tej terapii i obie terapie są obciążone

wieloma wczesnymi i późnymi skutkami ubocznymi. Poszukiwane są bardziej efektywne i mniej uciążliwe terapie z zastosowaniem związków mających wpływ na elementy szlaków sygnalizacyjnych procesów uczestniczących w patogenezie nowotworów. Do takich procesów należy m.in. proces autofagii. Problemem w poszukiwaniu nowych terapii bywa odporność komórek na potencjalne leki stosowane pojedynczo ale rozwiązaniem może być stosowanie kombinacji różnych związków, szczególnie o synergistycznym działaniu. Takie badania podjęła Doktorantka. 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 118 stron i podzieloną klasycznie na Część teoretyczną (22 strony), Cel pracy (2 strony), Metody (11 stron), Wyniki (32 strony), Dyskusję (10 stron) oraz Podsumowanie i Wnioski (2 strony). Proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. Na końcu rozprawy zamieszczono Streszczenia w języku polskim i angielskim, Bibliografię oraz Dorobek naukowy – spis publikacji oryginalnych i przeglądowych oraz doniesień konferencyjnych, w których Doktorantka jest współautorem a także projekty badawcze, dzięki którym uzyskano środki finansowe na prowadzenie badań. Na początku rozprawy zamieszczono spis treści oraz spis stosowanych skrótów.

W części teoretycznej doktorantka wyczerpująco przedstawia dostępny w literaturze stan wiedzy na temat procesu autofagii oraz kompleksu Polycomb 1 (PRC1). Część ta podzielona została na krótki wstęp oraz trzy rozdziały. W pierwszej części Doktorantka przedstawiła rodzaje autofagii, mechanizm molekularny tego procesu wraz ze ścieżkami sygnałowymi zaangażowanymi w ten proces oraz rolę autofagii w procesie nowotworzenia. W drugiej części więcej miejsca Doktorantka poświęca strukturze i roli kompleksu represyjnego Polycomb 1 a w szczególności opisuje białka BMI-1, RING1A i RING1B. Opisany jest także krótko udział tych (i innych białek kompleksu PRC1) w procesie autofagii. W trzeciej części Autorka przedstawia możliwości wykorzystania autofagii w terapiach nowotworowych skupiając się na inhibitorach szlaku mTOR, aktywatorach szlaku AMPK dostępne (oba szlaki uczestniczą w regulacji autofagii i są ze sobą powiązane). Więcej miejsca poświęca na opisanie działania inhibitorów wczesnego i późnego etapu autofagii. Zrozumienie tej części ułatwiają trzy schematy przedstawiające mechanizm autofagii, budowę kompleksu PRC1 oraz potencjalne działanie modulatorów autofagii w leczeniu nowotworów. Cała część teoretyczna



stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę pracy i świadczy o teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia prac doświadczalnych oraz o dobrej znajomości tematu.

Na kolejnych stronach rozprawy przedstawione zostały założenia i cel pracy. Celem głównym pracy było określenie wpływu białek BMI-1 i RING1A/B na proces autofagii oraz zbadanie ewentualnego działania przeciwnowotworowego inhibitorów kompleksu PRC1 w kombinacji z innymi modulatorami autofagii w komórkach raka endometrium. Pomocne w pracy było postawienie kilku celów szczegółowych takich jak: ocena wpływu wyciszenia ekspresji białek RING1A, RING1B oraz BMI-1 na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii, ocena wpływu inhibitorów BMI-1 i RING1A/B (PTC-209 i PRT4165) na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii w warunkach normalnych oraz hipoglikemii, określenie wpływu inhibitorów BMI-1 i RING1A/B stosowanych pojedynczo lub w kombinacji z aktywatorami lub inhibitorami autofagii na żywotność komórek, ocena wpływu inhibitorów białek kompleksu PRC1 stosowanych pojedynczo lub w kombinacji z inhibitorem lizosomów na apoptozę i nekrotozę w badanych komórkach.

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 są powszechnie używane w badaniach nad nowotworami gruczołakoraka endometrium i zostały trafnie dobrane do planowanych doświadczeń.

Doktorantka wykazała się znajomością szeregu technik wykorzystywanych w biologii molekularnej m.in. techniki z zakresu hodowli komórkowych, hamowanie ekspresji na poziomie RNA i białka, izolowanie RNA, Real Time PCR, Western blotting, testy na żywotność komórek (MTT), cytometria przepływowa czy analiza ilościowa i immunodetekcja białek. Sposób przeprowadzenia doświadczeń został opisany przez Doktorantkę bardzo dokładnie, krok po kroku. Doktorantka w doświadczeniach stosowała także komercyjne gotowe zestawy do oznaczeń, zostały one jednak prawidłowo dobrane i również szczegółowo zostało opisane wykonanie doświadczeń z ich użyciem. Liczba komórek na płytkach hodowlanych, sekwencje nukleotydowe zaprojektowanych starterów dla badanych genów, wykaz i charakterystyka stosowanych przeciwciał I-rzędowych i II-rzędowych oraz wartości współczynnika CI i typ oddziaływania na siebie związków stosowanych w kombinacjach zostały przedstawione w postaci 4 tabel. Rozdział zawiera także jeden rysunek przedstawiający krzywą wzorcową do oznaczania zawartości białka. Różnorodność użytych metod wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do pracy doświadczalnej.



Uzyskane wyniki przedstawiono przy użyciu 19 czytelnych, starannie wykonanych i chronologicznie ułożonych rycin oraz 4 tabel. 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.

W opisie rycin przedstawiających poziom białka (np. ryc. 5, 6, 7, 8, 9, 10 ...) zabrakło informacji o liczbie wykonanych niezależnych eksperymentów dla których wykonano analizę statystyczną, przedstawiono jedynie reprezentatywne wyniki z dwóch powtórzeń.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka szerzej omawia uzyskane wyniki i porównuje je z najnowszymi doniesieniami dostępnymi w literaturze światowej. Po podsumowaniu otrzymanych wyników w kilku punktach (rozdział 9 Podsumowanie) Doktorantka wyciągnęła i przedstawiła wnioski z wykonanych badań. W związku z dużą liczbą otrzymanych wyników z doświadczeń z użyciem wielu związków w różnych kombinacjach i w różnych warunkach graficzne przedstawienie podsumowania uzyskanych wyników znacznie ułatwiłoby ich interpretację i zrozumienie. Schemat taki został np. zamieszczony w jednej z opublikowanych prac, w której Doktorantka jest współautorem: „Glucose and Cell Context-Dependent Impact of BMI-1 Inhibitor PTC-209 on AKT Pathway in Endometrial Cancer Cells” Zaczek A, Szustka A, Krześlak A. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(23):5947.

Jak sama Doktorantka przyznaje konieczne wydaje się przeprowadzenie dalszych badań nad rolą badanych związków jako modulatorów procesu autofagii i ich zastosowaniem w leczeniu raka endometrium. Niemniej wyniki uzyskane przez Doktorantkę wnoszą nowe, istotne informacje na temat udziału białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii i apoptozy w wybranych do badań komórkach raka endometrium. Stwierdzono m.in. że zahamowanie aktywności RING1A/B odmiennie wpływa na procesy autofagii i apoptozy w obu badanych typach komórek raka endometrium oraz że ekspresja genów zaangażowanych w proces autofagii jest zależna od stężenia glukozy. Zależny od stężenia glukozy okazał się także wpływ inhibitorów białek kompleksu PRC1 na zmiany w ekspresji genów związanych z autofagią. Istotną obserwacją było również obniżenie żywotności komórek nowotworowych w obecności inhibitorów kompleksu PRC1. Niestety nie stwierdzono wzrostu efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów kompleksu PRC1 w połączeniu z innymi modulatorami autofagii, co sugeruje że stosowane w pracy kombinacje związków nie stanowią obiecującej strategii w terapii raka endometrium.



Używane w pracy skróty wyszczególnione zostały na początku pracy, w większości przypadków podane zostało pełne rozwinięcie w języku angielskim oraz używana nazwa polska.

Umieszczony na końcu spis literatury obejmuje 267 pozycji z szerokiego okresu od roku 1922 do najnowszych publikacji z 2022 roku. Jednak większość prac cytowanych w rozprawie to artykuły opublikowane po roku 2013, a 24% pozycji literaturowych to artykuły z ostatnich pięciu 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 czterech artykułów oryginalnych opublikowanych w liczących się czasopismach zagranicznych o zasięgu światowym ze współczynnikami IF: 6,57; 5,22; 6,21; 3,43 oraz współautorką dwóch artykułów przeglądowych, z czego jedna opublikowana została w czasopiśmie o IF 6,21.

Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne przygotowanie pracy pod względem edytorskim, tekst bardzo dobrze się czyta, praca napisana jest poprawnym językiem, znalazłam niewielką liczbę tzw. literówek (około 8) np. brak zamknięcia nawiasu str. 23, jedno zapożyczenie z języka angielskiego „worteksowano”.

Podsumowując, praca zawiera elementy nowości, doświadczenia i model badawczy są przemyślane i zaplanowane prawidłowo, a uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę na temat potencjalnego zastosowania białek kompleksu PRC1 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 Aleksandrze Szustce 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, 12 maja 2023