



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Department of Pharmaceutical Biochemistry
and Molecular Diagnostics
with Laboratory of Molecular Diagnostics
& Pharmacogenomics

Zakład Biochemii Farmaceutycznej
i Diagnostyki Molekularnej
z Pracownią Diagnostyki Molekularnej
i Farmakogenomiki

tel/fax: +48 42 677-91-26
e-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Łódź, 15 lipca 2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr analityki medycznej Sylwii Lewoniewskiej pt.: „The role of estrogenne receptor status in prolinę dehydrogenase/prolinę oxidase – dependent apoptosis in breast cancer cells”

Doktorantka ukończyła Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w 2018 r.. W tym samym roku rozpoczęła międzynarodowe studia doktoranckie w dziedzinie nauk medycznych i nauk farmaceutycznych. Uczestniczyła w szkoleniach organizowanych w Stanach Zjednoczonych i Europie, w dwóch stażach na Uniwersytecie w Coimbrze w Portugalii. Podczas studiów doktoranckich, będąc uczestnikiem PhD International Summer School nawiązała współpracę z prof. Antonellą Forlino z Uniwersytetu w Pawii we Włoszech. W sumie odbyła 10 szkoleń w placówkach zagranicznych w tym kilka online i 9 szkoleń krajowych.

Jest współautorką 16 publikacji w tym 2 stanowiących dysertację, jednej jeszcze procedowanej oraz 8 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach zagranicznych i 5-ciu na konferencjach krajowych, z których dwie prezentacje zostały wyróżnione. Łączny IF prac które nie weszły do prezentowanej rozprawy doktorskiej wynosi 9.320 a ich punktacja MNiSW 460 pkt. Podsumowując dane bibliometryczne mgr Sylwia Lewoniewska jest współautorem prac o łącznym IF wynoszącym 18,641 i całkowitej punktacji MNiSW równej 700. Jest wykonawcą w grantie NCN realizowanym do 2022 r. i była liderem trzyletniego grantu naukowego finansowane ze środków Unii Europejskiej, liderem i wykonawcom dwuletnich projektów statutowych finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

Przedstawiona do oceny praca doktorska zatytułowana „The role of estrogen receptor status in prolinę dehydrogenase/prolinę oxidase – dependent apoptosis in breast cancer cells” została wykonana w Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Zakładzie Medycyny Molekularnej Uniwersytetu w Pawii we Włoszech. Promotarami rozprawy są prof. Jerzy Pałka i prof. Antonella Forlino. Dysertację stanowi cykl 2 publikacji, (jednej poglądowej, *Biology* 2021, 10, 1314 o IF=5.079 i jednej eksperymentalnej, *J. Clin. Med.* 2021, 10, 4641 o IF=4.242, wraz z dostępnym, obszernym materiałem uzupełniającym *J. Clin. Med.* 2021, 10, 4641), który został opublikowane w 2021 r. Łączny IF prac stanowiących dysertację wynosi 9.321 i w punktacji MNiSW 240pkt. Współautorem pracy poglądowej jest Promotor prof. Antonella Forlino, Promotor prof. Jerzy

Pałka jest współautorem i liderem zespołu badawczego w prezentowanych w doktoracie pracach, zarówno pogładowej jak i eksperymentalnej. Prof. J. Pałka od lat zajmuje się problematyką badawczą związaną z metabolizmem kolagenu, aktywnością prolidazy czy dehydrogenazy prolinowej, natomiast prof. Antonella Forlino jest m.in. ekspertem w dziedzinie badań zmutowanych kolagenów, macierzy zewnątrzkomórkowej, niedoborów prolidazy w chorobach skóry i pozyskiwania ludzkiej rekombinowanej prolidazy w celu opracowania nowych, enzymatycznych terapii zastępczych. Nawiązana kooperacja pomiędzy wymienionymi zespołami zaczyna przynosić wymierne efekty w postaci wspólnych publikacji (Frontiers in Molecular Biosciences www.frontiersin.org 2 March 2022, Volume 9, Article 876348) i z pewnością mgr Sylwia Lewoniewska pracując pod kierunkiem tych Promotorów mogła przygotować bardzo ambitną pracę doktorską. Co więcej Promotorzy zapewнили Doktorantce finansowanie badań z kilku źródeł takich jak Narodowe Centrum Nauki i dwa granty Unijne (Program Operacyjny grant 06/IMSD/G/2019 i program ramowy "Horyzont 2020").

Zamieszczony cykl publikacji poprzedza spis treści, wykaz źródeł finansowania, spis artykułów stanowiących podstawę dysertacji wraz z tabelarycznym wykazem dorobku naukowego Doktorantki, wykaz skrótów. Następnie Doktorantka zamieszcza 7-stronicowe wprowadzenie (str. 9-16), cel pracy (str. 17), zwięzłe, jednostronicowe podsumowanie zastosowanych materiałów i metod, wyselekcjonowane, najbardziej istotne wyniki (str. 19-28), odniesienie do dyskusji (str. 29) oraz konkluzje str. 30). Następnie zamieszcza artykuły będące podstawą dysertacji, pierwszy pogładowy

P1. Lewoniewska, S., Oscilowska, I., Forlino, A., Palka, J. Understanding the Role of Estrogen Receptor Status in PRODH/POX-Dependent Apoptosis/Survival in Breast Cancer Cells. *Biology*, 2021, 10, 1314. MNiSW: 100 points, Impact Factor ISI: 5.079. DOI: 10.3390/biology10121314.

i drugi eksperymentalny

P2. Lewoniewska, S., Oscilowska, I., Huynh, T.Y.L., Prokop, I., Baszanowska, W., Bielawska, K., Palka, J. Troglitazone- Induced PRODH/POX- Dependent Apoptosis Occurs in the Absence of Estradiol or ER β in ER-Negative Breast Cancer Cells. *J. Clin. Med.*, 2021, 10, 4641. MNiSW: 140 points, Impact Factor ISI: 4.242. DOI: 10.3390/jcm10204641.

Kolejnym elementem pracy doktorskiej jest opublikowany w *J. Clin. Med.* 2021, 10, 4641 bogaty materiał uzupełniający.

Dysertacja zawiera również streszczenie w języku angielskim i polskim, piśmiennictwo liczące 61 pozycji oraz oświadczenia współautorów prac prezentujące udział w ich przygotowaniu oraz zgodę na ich wykorzystanie w dysertacji. Pracę doktorską zamykają wykazy osiągnięć naukowych Doktorantki, wykaz projektów badawczych, wykaz odbytych szkoleń i wykaz zamieszczonych rycin.

Praca doktorska dotyczy wpływu estrogenów na mechanizm zależnej od PRODH/POX aktywacji apoptozy/przeżycia komórek raka piersi. Oksydaza prolinowa (POX) znana również jako dehydrogenaza prolinowa (PRODH, GenBankTM NM_016335) jest mitochondrialnym enzymem zależnym od nukleotydów flawinowych przekształcającym prolinę w kwas pirolidyno-5-karboksylowy (P5C). Proces ten generuje ATP służące przeżyciowej autofagii lub reaktywne formy tlenu (ROS), które indukują apoptozę. Głównym źródłem proliny w organizmie jest kolagen, który nie tylko pełni funkcje podporowe, może także modulować integrynowe szlaki sygnałowe. Te z kolei regulują ekspresję genów, wzrost i różnicowanie

komórek, metabolizm białek, węglowodanów i lipidów. W komórkach nowotworowych, mechanizm ten jest zakłócony i dochodzi do degradacji kolagenu, endocytozy produktów degradacji kolagenu i ich hydrolizy do aminokwasów. Ważnym enzymem w tym łańcuchu metabolicznym jest prolidaza, która uwalnia prolinę, substrat dla PRODH/POX, z imidodi- i imidotripeptydów. Prolina może być wykorzystana w procesie biosyntezy kolagenu lub może być przekształcana przez mitochondrialny enzym PRODH/POX generując ATP służące przeżyciowej autofagii lub reaktywne formy tlenu (ROS), które indukują apoptozę.

Estrogeny, jak sugeruje Doktorantka mogą stymulować biosyntezę kolagenu, która wykorzystuje duże ilości wolnej proliny, ograniczając jej dostępność dla PRODH/POX.

Doktorantka zwraca uwagę, że troglitazon (TGZ), ligand receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR- γ), posiada zdolność stymulacji ekspresji PRODH/POX jak również inhibicji biosyntezy kolagenu może wchodzić w interakcję z receptorem estrogenowym (ER).

Doktorantka w swojej rozprawie sugeruje możliwy mechanizm zależnej od estrogenów i PRODH/POX regulacji apoptozy wykazując, że w zależności od metabolizmu proliny PRODH/POX może generować ROS lub ATP determinujący fenotyp apoptotyczny lub przeżywalności komórek raka piersi. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka postuluje, że skojarzone leczenie troglitazonem (TGZ) i antyestrogenem może być nowym kierunkiem w poszukiwaniu nowych strategii farmakoterapii raka piersi.

Wstęp dobrze wprowadza w realizowane w pracy zagadnienie. Doktorantka krótko opisuje metaboliczną rolę PRODH/POX w regulacji apoptozy i autofagii wyjaśniając na schematach złożone mechanizmy regulacyjne łączące cykle prolinowy, mocznikowy, TCA, szlak pentozofosforanowy i metabolizm kolagenu z apoptozą/przeżyciem zależnych od PRODH/POX. Następnie wyjaśnia rolę PPAR- γ i jego agonisty troglitazonu (TGZ) w stymulowaniu ekspresji PRODH/POX i przedstawia w sposób syntetyczny potencjalny wpływ modulatorów receptora estrogenowego na funkcje zależne od PRODH/POX. Podkreśla znaczący wpływ statusu receptora estrogenowego (ER) na wzrost i formowanie przerzutów komórek raka piersi. Zwraca uwagę na różnice w budowie, rozmieszczeniu w tkankach i narządach oraz różną aktywność biologiczną receptorów estrogenowych alfa (ER α) i beta (ER β), podkreślając, że ER α bierze udział w regulacji proliferacji komórek, natomiast ER β bierze udział w procesach antyproliferacyjnych i tworzy proapoptotyczny fenotyp komórek nowotworowych. Zwraca uwagę na fitoestrogeny z grupy izoflawonów (biochanina A, genisteina i ekwol), które w wyższych stężeniach podobnie do metabolitu 2-metoksyestradiolu (2-MOE) - 17 β -estradiolu wykazują działanie inhibitorowe biosyntezy kolagenu.

Następnie przedstawia cel swoich badań w którym chciałaby uzyskać odpowiedzi na pytania czy estrogeny mogą stymulować biosyntezę kolagenu, która wykorzystuje duże ilości wolnej proliny, ograniczając jej dostępność dla PRODH/POX oraz czy status ER i jego ligandy wpływają na apoptozę/przeżycie zależne od PRODH/POX.

Na podkreślenie zasługuje model eksperymentalny, który w swojej dysertacji wykorzystywała mgr S. Lewoniewska, a który został wypracowany w kierowanym przez Promotora pracy Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Cell Physiol. Biochem. 2017, 43, 670-684). Wiadomym jest, że komórkom raka piersi linia MCF-7 przypisywany jest status komórek ER pozytywnych, w których obecne są receptory ER α i

ER β , podczas gdy komórki linii MDA-MB-231 mają status komórek ER negatywnych i w których obecny jest jedynie ER β . W konsekwencji komórki MCF-7 są wrażliwe na terapie przeciwnowotworowe, charakteryzują się niskim potencjałem do przerzutowania a estrogeny modulują ich proliferację. W przeciwieństwie komórki MDA-MB-231 wykazują stały potencjał metastatyczny. Wygenerowano linię komórkową raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231 z wyciszonym genem kodującym PRODH/POX (MCF-7shPRODH/POX, MDA-MB-231shPRODH/POX) za pomocą krótkich, jednoniciowych oligonukleotydów DNA których sekwencje wyselekcjonowano za pomocą narzędzia internetowego AsiDesigner. Komórki MCF-7 i MDA-MB-231 typu dzikiego otrzymano z ATCC.

Doktorantka w dysertacji wykorzystuje także techniki radiometryczne, kolorymetryczne, immunologiczne, fluorescencyjne czy technikę HPLC sprzężoną ze spektrometrem masowym LC-MS.

Wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej mgr analityki medycznej Sylwi Lewoniewskiej prace zostały już ocenione przez niezależnych ekspertów danego czasopisma. Ich dobór jest trafny, a podjęta tematyka wpisuje się w aktualne kierunki badań w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Omówienie zaprezentowanego cyklu prac kończy podsumowanie i wnioski końcowe, które podkreślają najważniejsze osiągnięcia zawarte w publikacjach. Doktorantka wykazała, że komórki raka piersi linia MCF-7 i linia MDA-MB-231 po wyciszeniu genu kodującego PRODH/POX za pomocą shRNA są dobrym modelem do prowadzenia analiz wyjaśniających znaczenie funkcjonalne PRODH/POX w apoptozie/przeżyciu w komórkach raka piersi.

Udowadnia, po raz pierwszy, że Troglitazon (TGZ), ligand receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR- γ), indukuje ekspresję dehydrogenazy prolinowej (PRODH)/oksydazy prolinowej (POX) - PRODH/POX i hamuje biosyntezę kolagenu w komórkach raka piersi oraz silnie indukuje apoptozę zależną od PRODH/POX w komórkach MDA-MB-231 hodowanych bez estradiolu lub pozbawionych ER β .

Apoptoza jest indukowana poprzez generację reaktywnych form tlenu (ROS), a proces ich powstawania jest zależny od PRODH/POX. Jest on wspomagany dostępnością proliny dla PRODH/POX przez zależne od troglitazonu (TGZ) hamowanie biosyntezy kolagenu.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka postuluje, że skojarzone leczenie troglitazonem (TGZ) i antyestrogenem może być nowym kierunkiem w poszukiwaniu nowych strategii farmakoterapii ER-ujemnych raków piersi.

Tematyka podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w aktualne kierunki badawcze w dziedzinie nauk farmaceutycznych. Badania zostały przeprowadzone z dużym rozmachem, wykorzystano 4 linie komórkowe MCF-7 i MDA-MB-231 typ dziki oraz MCF-7 i MDA-MB-231 z wyciszonym genem *PRODH/POX* za pomocą shRNA. Doktorantka wyselekcjonowała z 3 wybranych klonów komórek klon 2, który w analizie techniką Western blot ujawniał znikomą reakcję z przeciwciałem rozpoznającym białko PRODH/POX o m.cz. 85kDa.

Komórki traktowano troglitazonem (TGZ), estradiolem, związkiem eliminującym ER β (ICI-182-780). Analizy dotyczyły szeregu czynników związanych z aktywacją procesu apoptozy za pomocą techniki Western blot (kaspaza 3, kaspaza 3, 9 i PARP po cięciu proteolitycznym, P53, AMPK alfa, PRODH/POX i produkt białkowy genu *GADPH* jako białko referencyjne), biosyntezy DNA i kolagenu techniką radiometryczną z użyciem odpowiednio trytowanej

tymidyny/proliny, oznaczeniem ROS techniką fluorescencyjną, badania aktywności prolidazy techniką kolorymetryczną, stężenia proliny techniką LC-MS.

Tak szerokie badania były możliwe dzięki uzyskanemu finansowaniu z NCN i EU (dwa granty). Eksperymenty przeprowadzone zostały na poziomie białka z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych. Doktorantkę charakteryzuje łatwość nawiązywania kontaktów naukowych jak również chęć poszerzania warsztatu badawczego (liczne kursy krajowe i zagraniczne).

Tematyka realizowana w pracy doktorskiej stanowi kontynuację wieloletnich badań prowadzonych i rozwijanych przez prof. Jerzego Pałkę Promotora rozprawy. Mgr S. Lewoniewska czerpie z wieloletniego doświadczenia Lidera i kierowanego przez Niego zespołu wnosząc jednocześnie elementy nowości naukowej w zakresie przedstawionej tematyki badawczej.

Rozprawa jest przygotowana bardzo starannie i jestem ciekaw, czy Autorka będzie kontynuować swoje badania, ponieważ wyniki uzyskane *in vitro* są bardzo obiecujące, a jeśli tak, to które kierunki potraktuje jako priorytetowe.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr analityki medycznej Sylwii Lewoniewskiej pt.: „The role of estrogen receptor status in proline dehydrogenase/proline oxidase – dependent apoptosis in breast cancer cells” spełnia wymagania ustawowe dotyczące rozpraw doktorskich, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r., poz. 574). W związku z powyższym, wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Sylwii Lewoniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski