

Prof. dr hab. n. med.

Katowice, lipiec 31, 2020 r.

Aleksander L. Sieroń, Prof. zw. SUM

Wydział Nauk Medycznych w Katowicach

Śląski Uniwersytet Medyczny

w Katowicach

ul. Medyków 18

40-752 Katowice

Tel.: 32-2088394

e-mail: alsieron@sum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
magister Edyty Andrulewicz-Botulińskiej
na temat:

”Ocena zależności między ekspresją integryn ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$), kolagenu typu I, MMP-2, MMP-9 a migracją komórek glejaka wielopostaciowego mózgu”

Rozprawa doktorska mgr Edyty Andrulewicz-Botulińskiej dotyczy poznania mechanizmów leżących u podstaw migracji komórek jednej z postaci glejaków mózgu, a mianowicie glejaka wielopostaciowego. Glejaki są nowotworami, które w większości przypadków bardzo źle rokują. Interwencje chirurgiczne w przypadku badanego tutaj glejaka wielopostaciowego nie są w 100% skuteczne i po dłuższym lub krótszym czasie dochodzi do wznowy tego nowotworu. Problemem jest również heterogenność jego składu komórkowego i morfologii samego guza.

Przegląd światowego piśmiennictwa dla słów kluczowych glioblastoma multiforme, extracellular matrix, i migration, pokazał na dzień przygotowania opinii tej pracy, raptem 253 dokumenty. Najstarsza publikacji pochodzi z roku 1990, a 220 publikacji ukazało się po roku 2000. Zatem sama problematyka jest stosunkowo aktualna i w tym znaczeniu wybrany przez Kandydatkę problem badawczy do rozwiązania pod kierunkiem, światowej renomy, badaczki biologii macierzy pozakomórkowej, pani prof. Anny Galickiej, jest również nowatorski.

Rozprawa doktorska jest wydrukiem komputerowym, liczącym 153 strony, o podziale typowym dla tego rodzaju opracowań. Składa się ono z 9 rozdziałów, podzielonych na podrozdziały, a w razie uznania autorki na jeszcze bardziej szczegółowe sekcje. Właściwą część rozprawy poprzedza szczegółowy wykaz skrótów stosowanych w opracowaniu.

Wstęp zajmuje 39 stron i szczegółowo wprowadza czytelnika w tematykę badań. Zaczyna się wyodrębnionymi podrozdziałami, w których znajduje się ogólny opis glejaków; ich etiologii i klasyfikacji. Następnie Kandydatka opisała szczegółowo glejaka wielopostaciowego mózgu (GBM), posiłkując się bogatym wykazem specjalistycznego piśmiennictwa. Pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska przedstawiła w kolejnym podrozdziale znane aspekty podłoża molekularnego i oparte o tę wiedzę wykorzystywane testy diagnostyczne. W tym miejscu pojawia się rycina 1 pokazująca obraz MR GBM. Z jej opisu nie wynika jednak wprost, czy fotografie zostały pozyskane ze zbiorów badaczy, z którymi Kandydatka współpracuje, czy też zapożyczone z innych źródeł. W wielu schematach ideowych Kandydatka powołuje się na źródła, z których korzystała do ich opracowania, stosując komentarz „z własną modyfikacją”. Proszę wyjaśnić, czy modyfikacje zmieniły tak bardzo oryginały, że nie było potrzeby uzyskania zgód wydawców na ich wykorzystanie.

W kolejnych podrozdziałach pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska opisała znaczenie macierzy zewnątrzkomórkowej dla migracji komórek. Kandydatka przedstawiła wystarczająco szczegółowo budujące ją różnorodne składniki oraz ich struktury, kluczowe dla funkcji macierzy, jako podłoża służącego migracji komórek. W następnej sekcji znajduje się opis samej migracji komórki i jej etapów oraz uczestniczących w niej znanych czynników, głównie białkowych.

W tytule rozprawy, autorka wymieniła czynniki, które były przedmiotem jej badań w kontekście migracji komórek GBM, dlatego kolejne sekcje wstępu odnoszą się do szczegółowego opisu, kolagenu, z uwzględnieniem jego budowy, biosyntezy i znanego znaczenia dla nowotworów. W podobny sposób Kandydatka przedstawiła opis metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), ze szczególną uwagą poświęconą MMP-2 i MMP-9. W tej części rozprawy znajduje się również opis obecnego stanu wiedzy o roli integryn w nowotworach, a szczególną uwagę poświęciła pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska trzem integrynom wymienionym w tytule rozprawy, a mianowicie, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$. Integryny nie tylko służą kotwiczeniu komórek do składników ECM ale, jak słusznie przedstawiła to Kandydatka, pełnią również funkcje receptorowe inicjując sygnały w ścieżkach wewnątrzkomórkowych. Dla, co najmniej, dwóch takich ścieżek wykazano ich istotne powiązanie z kinazą ERK/MAPK. To ogniwo było również przedmiotem badań pani magister Edyty Andrulewicz-Botulińskiej.

Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego możliwości farmakologicznego leczenia GBM wynika, że zainteresowanie badaczy zwróciło się na dezintegryny. Są to nieenzymatyczne białka izolowane z jadu węży i oddziałują one z określonymi integrynami, hamując ich

działanie. Na dwóch kolejnych stronach Kandydatka opisała charakterystykę tych białek w kontekście klasyfikacji strukturalnej i zależnej od ich funkcji.

Wstęp został napisany klarownie, a układ podrozdziałów jest sensowny i prowadzi wprost do sformułowania głównego celu pracy i wyznaczenia zadań szczegółowych.

W rozdziale Cel pracy, pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska, najpierw skrótowo przedstawiła jakie problemy nurtują dzisiaj badaczy i praktyków zajmujących się badaniem i leczeniem GBM. Wyrażone przez Kandydatkę w tym miejscu sformułowania można uznać za rodzaj hipotezy badawczej, zakładającej że „mikrośrodowisko ECM GBM różni się od prawidłowego mózgu i to ten zmieniony skład wpływa na migrację i inwazję komórek tego nowotworu”. Celem nadrzędnym było więc poznanie współzależności pomiędzy ekspresją głównego składnika ECM (kolagenu I) metaloproteinaz MMP-2 i -9 i trzech integrzyn: $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ oraz wpływu zmian tej ekspresji wywołanych określonymi czynnikami regulatorowymi na migrację komórek otrzymanych z GBM różnych dawców.

Cele szczegółowe dotyczyły:

1. Porównania ekspresji prokolagenu I, MMP-2 i -9 oraz podjednostek integrzyn $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ w komórkach GBM w trzech liniach komórek, na poziomie, zarówno mRNA, jak i białka.
2. Oceny zależności pomiędzy ekspresją integrzyn $\alpha 9\beta 1$, a innymi składnikami ECM i integrzynami.
3. Oceny zmian ekspresji prokolagenu I, MMP-2 i -9 oraz podjednostek integrzyn ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$) pod wpływem:
 - kwasu askorbinowego, który jest niezbędny dla potranslacyjnej modyfikacji prolin i lizyn w procesie ich hydroksylacji.
 - $\alpha\alpha'$ -dipirydołu, który blokuje aktywność MMP.
 - dezintegrzyn VOL4 i VOL 5, które wiążą odpowiednio podjednostki $\alpha 5$ i $\alpha 9$ integrzyn.
 - 12-mirystynianu 13 octanu forbolu (PMA), który jest aktywatorem MMP-9 i kinaz ERK1/2.
 - inhibitorów kinaz ERK1/2 i p38 (U0126, SB202190)i określenia zależności między zmianą ekspresji tych białek a migracją trzech wybranych linii komórek GBM.
4. Porównania migracji komórek GBM pod wpływem wybranych czynników na płytkach pokrytych kolagenem.

Rozdział „Materiał i Metody” zajmuje 12 stron i w części dotyczącej materiału Kandydatka podała linie komórkowe oraz związki i odczynniki używane w badaniach, w tym gotowe zestawy testowe, z podaniem ich producentów.

Linie komórkowe pochodzące z GBMów zostały zakupione w ATCC (LN18 i LN229) lub otrzymane grzecznościowo jako dar ze zbiorów własnych profesora Cezarego Marcinkiewicza (LBC3, LBC3a9 i LN18a9) z Department of Neuroscience, Temple University, Philadelphia, PA, USA. Pan profesor przekazał również w darze wyizolowane przez siebie z jadu węża *Vipera lebetina* dezintegryny VOL4 i VOL5.

O ile metody badawcze zostały dobrane bardzo dobrze i opisane wystarczająco dokładnie, to brak szczegółowej wstępnej charakterystyki użytych linii komórkowych stanowi poważne uchybienie. Na przykład, Kandydatka ograniczyła się wyłącznie do podania genów w których wykryto mutacje w komórkach LN18 i LN229. Nie wiadomo jednak, czy mutacje te były dziedziczne, czy somatyczne. Wiadomo, że dziedziczne mutacje genu *MGMT* predysponują ich nosicieli do częstszego występowania niektórych nowotworów. Mutacje w genie *P53T* towarzyszą większości nowotworów i zazwyczaj są somatyczne. Nic natomiast nie napisano o defektach genetycznych w linii LBC3. Wnosząc z użycia linii transfekowanej genem/cDNA kodującym podjednostkę $\alpha 9$ integryny można wnioskować, że ta linia cechowała się mutacją w tym genie. Dlatego potrzebna byłaby informacja o liczbie kopii genu/cDNA kodujących tę podjednostkę, co się przekłada na natężenie ekspresji kodowanego białka.

Brak również podstawowych informacji o przeżywalności komórek i co za tym idzie ile żywych komórek znajdowało się na początku każdego doświadczenia. Kandydatka pisze o otrzymaniu 80% konfluencji, ale nie podaje jak badane linie komórkowe zachowują się w hodowli *in vitro*. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do tego, czy tempo proliferacji komórek różnych linii było takie samo. Na przedstawionych fotografiach obrazów mikroskopowych widać, że komórki różniły się wielkością i kształtem, co mogło decydować o różnej liczbie komórek w hodowli, która uzyskiwała 80% pokrycia powierzchni hodowlanej. Wiąże się z tym liczba podziałów komórek, jaka zaszła do osiągnięcia zadanej konfluencji. W pod-podrozdziale 3.2.4 nie podano z jakich krzywych wzorcowych korzystano dla testu MTT.

W pod-pod-podrozdziale 3.2.6.1. nie podano z jakiej liczby komórek izolowano całkowity RNA i czy dla każdej linii była to ta sama liczba komórek. Proszę podać uzasadnienie dlaczego jako kontrolę wewnętrzną dla obliczeń wyników ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, wybrano *GAPDH* a nie inny produkt ekspresji genów reprezentatywny dla badanych linii GBM. W tabeli 2 dobrze byłoby podać wartości T_m dla każdego startera i

jaką temperaturę przyłączania wybrano dla każdej pary starterów. W pod-podrozdziale 3.2.8. nie podano jak wykluczono, że zapełnienie „rany” było wynikiem migracji komórek, a nie ich proliferacji, tym bardziej, że nie wiadomo jaki jest czas podwojenie dla każdej badanej linii w hodowli.

Ważne jest również, czy w trakcie podziałów dochodziło do uszkodzeń DNA, szczególnie po dodaniu do hodowli różnych odczynników, które mogą mieć działanie genotoksyczne. Przy ograniczonych zdolnościach naprawy DNA, wynikających z zaburzeń kontroli cyklu komórkowego, można się spodziewać heterogenności genetycznej takich populacji komórek, co może wpływać na ich odpowiedź na parametry mierzone w warunkach hodowli. Więcej szczegółów o potencjalnych pułapkach, w interpretacji otrzymanych wyników, znajduje się w dalszej części tej oceny, w komentarzu do rozdziału Wyniki.

W opisie metod wirowania należy podawać siłę w $\times g$, a jeżeli podawane są obroty to trzeba podać typ rotora i jego producenta. Podobnie jeżeli używane są wytrząsarki to trzeba podać zastosowaną częstotliwość z jaką wytrząsano próbkę.

W pod-podrozdziale 3.2.9. nie ma odniesienia, czy sprawdzano rozkłady otrzymanych danych, przed wyborem odpowiednich testów statystycznych i na jakiej podstawie wybrano określoną liczbę powtórzeń dla celów obliczeń statystycznych.

Wyniki wykonanych badań Kandydatka zaprezentowała na 54 stronach w postaci 32 rycin na których przedstawiła fotografie: hodowli komórkowych, wyników western blot i żeli po zymografii, a także dane liczbowe w formie histogramów i wykresów liniowych. Ryciny są czytelne i zostały wykonane starannie. Pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska przyjęła jako kontrole wewnętrzne: dla pomiarów natężenia ekspresji genów i pomiarów densytometrycznych standardowo; odpowiednio *GAPDH* i β -aktynę. Bardziej dokładne jest znalezienie jako odniesienia genów, których ekspresja jest stała w badanych komórkach i białek, których stężenie nie zmienia się w komórkach ze zmianami warunków doświadczenia.

Omawiając ekspresję kolagenu I, Kandydatka pisze o ekspresji genu tego kolagenu, co zapewne jest skrótem myślowym. Badana, była bowiem ekspresja genów *COL1A1* lub *COL1A2* lub obu genów, które kodują łańcuchy prokolagenu, odpowiednio *proa1* i *proa2*. Ta sama uwaga dotyczy opisów wyników ekspresji na rycinach i w tekście. W odniesieniu do wykrywania białka nie ma jasności czy metodą western blot wykrywano prokolagen czy kolagen oraz, który z dwóch łańcuchów alfa.

Na rycinie 20 pokazano zdjęcia wykonane po zastosowaniu fluorescencyjnie wyznakowanych przeciwciał, które ujawniły heterogenną morfologię badanych komórek, a brak kreski skali powiększenia (podano tylko obiektyw, bez powiększenia okularu i skali

wydruku) nie pozwala ocenić, czy różnice wielkości między badanymi liniami komórek rzeczywiście wynikają z ich naturalnych cech.

Porównanie danych ilościowych przedstawionych w postaci histogramów wymaga od czytelnika szczególnego skupienia, gdyż zastosowano różne zakresy wartości na osiach rzędnych (Ryc. 27 wiersz ITGA9/GAPDH i kolumna LN229 od maksimum na osi Y 2,5 dla 3 i 4 wykresu od góry tej kolumny, do 12 na dwóch pierwszych wykresach od góry tej kolumny).

Test blizny jest trudnym do przeprowadzenia testem, a jego wyniki mogą być mylące, jeżeli nie został on wcześniej odpowiednio wystandaryzowany. Zarastanie wolnej powierzchni naczynia hodowlanego może wynikać, zarówno z migracji komórek znajdujących się na granicy warstwy i wolnej powierzchni, jak i proliferacji komórek, której z natury towarzyszy ich migracja. Ponieważ nie podano jakie są czasy podwajania liczby badanych linii komórkowych trudno jednoznacznie interpretować otrzymane wyniki, tym bardziej, że nie wiadomo ile razy podzieliły się komórki w ciągu 48 godzin badania. W warunkach bez dodania testowanych odczynników (kontrola) linie LBC3 i LN229 nie zamknęły blizny nawet po 48 godzinach. Brak kresek skali nie daje pewności, że szerokość blizn na początku była zawsze jednakowa (Ryc. 30A blizna wydaje się znacznie szersza w czasie 0 dla DP (0,5 mM) niż dla (-) w tym samym czasie. Analogicznie na rycinie 30C).

Badanie wpływu wybranych przez Kandydatkę dezintegryn nastręczyło trudności w doborze warunków stężenia za względu na fakt, że komórki linii LBC3 i LN18 traciły przyczepność przy znacznie niższych stężeniach VLO4 niż linia LN229. Kandydatka podjęła słuszną decyzję o wyborze takich zakresów stężeń, przy których komórki wykazywały zbliżony procent przeżywalności, czyli około 80%. Ta trudność rzutowała na całą serię doświadczeń, w których badano komórki w obecności dezintegryn VLO4 i VLO5.

Szczegółowe omówienie przedstawionych w rozprawie wyników miało na celu wykazanie, jak złożone problemy związane z migracją komórek glejaka wielopostaciowego mózgu podjęła się rozwiązać magister Edyta Andrulowicz-Botulińska. Zawsze można wykonać więcej testów lub pomiarów większej liczby parametrów, takich jak test inwazyjności w naczyniach Boydena (Boyden Chambers), czy ekspresję genów kodujących czynniki regulujące cykl komórkowy i umieranie komórek, a także aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych tych procesów.

Biorąc jednak pod uwagę, że był to zapewne pierwszy tak duży projekt badawczy pani magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej należy podkreślić, że wykonała ona bardzo dobrą pracę badawczą, co z pewnością jest również zasługą Pani promotor.

Dyskusja przedstawionych wyników znajduje się w oddzielnym rozdziale rozprawy i zajmuje 18 stron. Jest ona wyważona, a w kilku fragmentach nawiązuje do wyników przedstawionych przez innych badaczy, opublikowanych w fachowych czasopismach naukowych. Niektóre fragmenty dyskusji nawiązują do wiadomości przedstawionych przez Kandydatkę we wstępie do rozprawy (str. 109 ostatni akapit do 110 koniec tego akapitu). Drobną uwagę w tym miejscu, a mianowicie, raz zaktywowana MMP-2 nie może powrócić do pro-MMP-2 (str. 116 zdanie od 11 linijki od dołu strony do końca akapitu), tak jak na stronie 121, 3 akapit od góry, to domena w fibronektynie jest ligandem dla integryny $\alpha 5\beta 1$, a nie odwrotnie, jak to napisała Kandydatka.

Na stronie 121 pani magister Edyta Andrulowicz-Botulińska dyskutuje problematykę niektórych nowotworów w kontekście mutacji genów, w tym genu kodującego P53T. Aby lepiej wytłumaczyć zależności powiązania tego czynnika z biologią nowotworów bardzo pomogłaby wiedza, czy mutacje tego genu w liniach LB18 i LN229 były odziedziczone przez pacjentów-dawców komórek, czy też nabyte. Dotyczy to także linii LBC3, czy brak ekspresji łańcucha $\alpha 9$ integryny był wrodzony, czy była to mutacja somatyczna, a także jaki był genetyczny status dawcy komórek w odniesieniu do genu *P53T*. W ostatnim zdaniu pierwszego akapitu na stronie 121 Kandydatka stwierdza, że „Trudno jest ocenić wpływ $\alpha 2\beta 1$ na migrację badanych linii GBM, ponieważ w przeprowadzonych badaniach nie zastosowano czynnika specyficznie działającego na ten receptor.”. To zdanie świadczy o krytycznym spojrzeniu pani magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej na swoje badania. Widzi ona nie tylko mocne ale również słabe strony wykonanej przez siebie pracy badawczej. Takie nastawienie skłoniło Kandydatkę do zakończenia dyskusji stwierdzeniem, że problematyka podjęta w rozprawie doktorskiej wymaga dalszych badań, które być może pozwolą opracować skuteczniejsze metody terapii GBM.

Rozdział Wnioski zawiera 10 punktów, które luźno nawiązują do postawionych na wstępie 4 celów szczegółowych i zdaniem oceniającego wymagają dopracowania na etapie przygotowania maszynopisu publikacji do druku.

Rozprawa jest opatrzona streszczeniami po polsku i po angielsku, które dobrze oddają jej treść.

Wykaz piśmiennictwa zawiera 281 pozycji, z których 48% to prace opublikowane po roku 2010. Znajomość zagadnienia migracji GBM jest więc ugruntowana, w oparciu o wiedzę znajdującą się w piśmiennictwie fachowym, z zaznaczeniem kluczowych opracowań pochodzących z polskich laboratoriów.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy oryginalnych badań wykonanych w laboratorium znanym z osiągnięć w badaniach tkanki łącznej, pod kierunkiem doświadczonej badaczki o renomie międzynarodowej, współpracującej z laboratoriami w Europie i Stanach Zjednoczonych AP.

Magister Edyta Andrulowicz-Botulińska wykazała się opanowaniem warsztatu w zakresie metod biologii molekularnej i biochemii, zdolnością do syntetycznego opracowania uzyskanych wyników oraz umiejętnością ich właściwej analizy.

Podsumowując dysertację magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej, pod względem edytorskim, została ona przygotowana starannie i przejrzysto, a Autorka popełniła jedynie nieliczne pomyłki redakcyjne. Mimo uwag krytycznych sformułowanych z obowiązku oceniającego, uważam że praca jest napisana dobrze, co powoduje, że jest dostępna nawet dla czytelnika nie będącego fachowcem w dziedzinie biologii molekularnej.

Przedstawione w recenzji uwagi krytyczne nie pomniejszają mojej wysoce pozytywnej oceny pracy pani magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej. Przedstawione mi do oceny opracowanie spełnia wymagania ustawy o tytule i stopniach naukowych, stawiane rozprawom doktorskim. Mam więc zaszczyt wnioskować do wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pani magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, pragnę podkreślić różnorodność dobrze zaplanowanych i wykonanych nowatorskich badań naukowych, a także wysoce nowatorski ich charakter. Dlatego, z pełnym przekonaniem, wnioskuję do Wysokiego Senatu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani magister Edyty Andrulowicz-Botulińskiej.

Z wyrazami szacunku

KIEROWNIK
Katedry Biologii Molekularnej i Genetyki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Aleksander L. Sieroń