

Lublin, 15 sierpnia 2020 r.

Prof. dr hab. Ryszard Szyszka
profesor zwyczajny
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1i
20-708 Lublin
e-mail: szyszkar@kul.pl
tel: +48 81 4545 450

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Edyty Andrulewicz-Botulińskiej
**„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”**

1. Aktualność tematyki badań

Glejak wielopostaciowy (GBM) to najbardziej złośliwa postać pierwotnego nowotworu ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzująca się wysoką heterogennością i inwazyjnością. GBM ma najbardziej agresywny przebieg – rośnie bardzo szybko, nacieka i niszczy przylegające tkanki. Choroba postępuje niezwykle szybko. Mimo postępu technik zabiegowych, radioterapii i chemioterapii, nie ma skutecznej metody leczenia, co utrudnia całkowite chirurgiczne usunięcie guza. Interwencje chirurgiczne w przypadku GBM nie charakteryzują się wysoką skutecznością i po pewnym czasie dochodzi do wznowień nowotworu. Standardowe leczenie obejmuje chemio- i radioterapię, a najczęściej stosowanym chemioterapeutycznym jest TMZ, którego metabolity wykazują działanie alkilujące powodując chemiczną modyfikację makrocząsteczek biologicznych, w szczególności DNA. Alkilacja uszkadza strukturę DNA, zaburza syntezę DNA i RNA oraz białek prowadząc do śmierci komórki.

Z powodu dużej i wciąż rosnącej częstości występowania oraz złego rokowania GBM stanowi główny temat zainteresowań badaczy zajmujących się biologią molekularną glejaków. Postępy w tej dziedzinie przyczyniają się

do częściowego zrozumienia mechanizmów prowadzących do kancerogenezy oraz progresji stopnia złośliwości glejaków w trakcie przebiegu choroby. Najprawdopodobniej obecność niektórych zjawisk molekularnych może być pomocna w określeniu rokowania różnych nowotworów wywodzących się z gleju.

Poznano już bardzo wiele różnorodnych zmian molekularnych dotyczących szlaków przekazywania sygnału, procesów proliferacji, kontroli cyklu komórkowego, które prowadzą do zmian nowotworowych w tym nowotworów wywodzących się z gleju. Należą do nich np. nieprawidłowości dotyczące szlaku przewodzenia sygnału z receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), której towarzyszy często utrata czynności genu supresorowego PTEN, nieprawidłowości kompleksu tworzonego przez białko supresorowe TP53 czy też kompleksu związanego z białkiem RB1.

Skutkiem tych zmian dochodzi do indukcji procesów proliferacji i migracji komórek śródbłonna, zwiększenia aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, inaktywacji genów supresorowych, aktywacji onkogenów i uwalniania czynników wzrostu prowadząc do onkogenezy.

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM), pełniąca funkcję integrującą tkanki, jest mieszaniną białek (m.in. kolagenów, lamininy, fibronektyny i elastyny) oraz proteoglikanów wydzielanych przez obecne w zrębie fibroblasty. Zwiększająca się zdolność komórek do migracji jest wynikiem zmian strukturalnych ECM. Patologiczna macierz nowotworów charakteryzuje się wysoką utratą lamininy, kolagenu typu IV i kadheryny E oraz znacznie podwyższoną depozycją kolagenu typu I i III. Stwierdzono, że komórki glejaka mogą zmienić otaczający mięsz mózgu i indukować ekspresję nowych cząsteczek, niezbędnych do ich migracji i inwazji. Zrozumienie mechanizmów migracji i inwazji, w których pośredniczą białka i receptory macierzy kluczowe w rozwoju glejaka, może mieć fundamentalne znaczenie w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w celu zmniejszenia inwazji i nawrotu nowotworu, i jest to tematem ocenianej rozprawy doktorskiej.

2. **Charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska mgr Edyty Andrulewicz-Botulińskiej (153 strony) przedstawia wyniki badań oszacowania zależności między ekspresją integryn, kolagenu typu 1, metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (2 i 9) a migracją komórek glejaka wielopostaciowego mózgu. Recenzowana rozprawa ma układ klasyczny i proporcje pomiędzy częściami rozprawy, liczące odpowiednio: Wstęp – 35; Cel pracy – 2; Materiały i metody – 12; Wyniki badań – 53 i Dyskusja – 17 stron. Cel pracy jest jasno sformułowany, a całość rozprawy zamknięta jest Wnioskami, Podsumowaniem, Streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwem obejmującym 281 pozycji, z których przeważająca część to publikacje dotyczące tematu z ostatnich 10 lat.

Rozprawę rozpoczyna przegląd literatury opisujący aktualny stan wiedzy dotyczący opisu glejaków, ich etiologii i klasyfikacji kierując szczególną uwagę wielopostaciowemu glejakowi mózgu (GBM). Kolejne podrozdziały poświęcone są znaczeniu macierzy zewnątrzkomórkowej dla migracji komórek. Ta część wstępu zawiera szczegółowy opis budujących ją kluczowych składników oraz ich struktury i funkcji. Kolejne sekcje wstępu zawierają szczegółowy opis struktury i znaczenia kolagenu, jego biosyntezę i znane znaczenie w przebiegu procesu nowotworzenia. Kolejnym elementem tej części wstępu jest opis metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej uwzględniający ich ogólną charakterystykę, regulację aktywności i udział w nowotworach. W tym podrozdziale szczególną uwagę autorka poświęciła MMP-2 i MMP-9, które są jednym z elementów badawczych tej rozprawy. Ostatnie dwa podrozdziały wstępu pracy zawierają informacje dotyczące integryn i dezintegryn. Szczególną uwagę poświęciła Pani magister Edyta Andrulewicz-Botulińska wymienionym w tytule rozprawy trzem integrynom: $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$. Integryny, należące do przezbłonowych białek receptorowych, odpowiadają za kontakt komórki z ECM (m.in. z kolagenem) i z innymi komórkami. Są złożone ze związanych niekowalencyjnie podjednostek α i β . Powinowactwo odpowiednich ligandów do receptorów integrynowych jest regulowane przez kaskady sygnałów zarówno zewnątrzkomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych, które odpowiednio

pobudzają lub hamują aktywność heterodimerów $\alpha\beta$. Wewnątrzkomórkowe funkcje receptorowe integryn związane są z kilkoma kaskadami sygnałowymi, między innymi kaskady MAPK/Erk, której elementy są również przedmiotem badań przedstawionych w tej pracy. Wykazano, że zaburzenie wytwarzania integryn w komórkach nowotworowych jest jedną z istotnych przyczyn nabywania przez nie zdolności do metastazy.

Ostatni podrozdział wstępu poświęcony jest rodzinie niskocząsteczkowych bogatych w cysteinę białek nieenzymatycznych występujących w jadach węży i posiadających zdolność do interakcji i hamowania aktywności integryn. Białka te zostały scharakteryzowane z punktu widzenia ich struktury i funkcji.

Ogólny układ całości wstępu jest przejrzysty i sensowny prowadząc do celu pracy. Wstęp zilustrowany jest 15 rysunkami pomocnymi w przedstawieniu opisywanych struktur białkowych czy też w zrozumieniu przebiegu omawianych procesów i jedną tabelą.

Celem nadrzędnym przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej była ocena korelacji pomiędzy ekspresją kolagenu 1 będącego głównym komponentem ECM, metaloproteinaz 2 i 9, trzech integryn $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ oraz wpływu zmian tej ekspresji na migrację komórek otrzymanych z GBM dawców.

Szczegółowe cele dotyczyły:

1. Porównania ekspresji prokolagenu I, MMP-2 i -9 oraz podjednostek integryn $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ w komórkach GBM w trzech liniach komórek, na poziomie, zarówno mRNA, jak i białka.
2. Oceny zależności pomiędzy ekspresją integryny $\alpha 9\beta 1$, a innymi składnikami ECM i integrynami.
3. Oceny zmian ekspresji prokolagenu I, MMP-2 i -9 oraz podjednostek integryn ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$) pod wpływem:
 - kwasu askorbinowego niezbędnego dla potranslacyjnej modyfikacji prolin i lizyn w procesie ich hydroksylacji.
 - $\alpha\alpha'$ -dipirydolu inhibitora aktywności MMP.
 - dezintegryn VOL4 i VOL5, wiążących odpowiednio podjednostki $\alpha 5$ i $\alpha 9$ integryn.

- 12-mirystynianu 13 octanu forbolu (PMA), aktywatora MMP-9 i kinaz ERK1/2.
 - inhibitorów kinaz ERK1/2 i p38 (U0126, SB202190) i określenia relacji 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.

Kolejną częścią rozprawy jest 12 stronicowy rozdział opisujący stosowane w części doświadczalnej „Materiały i metody”. Przedstawione tu zostały związki i odczynniki (w tym gotowe zestawy testowe) wykorzystane w pracy oraz zastosowane procedury i techniki badawcze. Metody badawcze stosowane do osiągnięcia celu badawczego rozprawy zostały starannie dobrane i opisane wystarczająco dokładnie.

3. **Główne wyniki pracy doktorskiej**

Wszystkie uzyskane wyniki zostały przedstawione na 54 stronach i opracowane w postaci 32 rycin. Przedstawiają one fotografie: hodowli komórkowych, wyników z analiz western blot i żeli po zymografii, a także dane liczbowe w formie histogramów i wykresów liniowych. Ryciny są czytelne i zostały wykonane starannie.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wysnucie następujących wniosków nawiązujących do postawionych celów pracy:

1. W komórkach GBM linii LN229 oraz LBC3 i LN18 transfekowanych integryną $\alpha 9\beta 1$ wykazano zależności pomiędzy ekspresją badanych białek. Ekspresja tej integryny ma związek z hamowaniem ekspresji MMP-9, kolagenu typu I i integryn $\alpha 2\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$.
2. Synteza kolagenu typu I w komórkach GBM jest zależna od aktywności ERK1/2 oraz ekspresji NF- κ B i białka CTHRC1.
3. Zmiany w syntezie kolagenu typu I (obniżenie w LBC3 i LN18 oraz zwiększenie w LN229) pod wpływem kwasu askorbinowego korelują pozytywnie z migracją komórek, niezależnie od indukcji aktywności MMP-2 i MMP-9.

4. Hamowanie aktywności MMP-2 i MMP-9 pod wpływem luteoliny wiąże się z hamowaniem migracji komórek, niezależnie od zmian w ekspresji kolagenu typu I i integryn oraz aktywności ERK1/2.
5. Komórki linii LN229 ($\alpha 9\beta 1$ -pozytywne) charakteryzują się znacznie większą opornością na działanie luteoliny i dezintegryny VLO4 oraz hamowanie migracji pod wpływem różnych czynników niż komórki linii LN18 i LBC3 ($\alpha 9\beta 1$ -negatywne). Hamowanie migracji LN229 pod wpływem dezintegryny VLO5, PMA i U0126 spowodowane jest zahamowaniem ekspresji tej integryny.
6. Wiązanie podjednostki $\alpha 5$ przez dezintegrynę VLO4 hamujące migrację komórek LN18 na samej płytce i opłaszczonej kolagenem typu I koreluje z silnym hamowaniem aktywności MMP-9 i ERK1/2.
7. Zwiększona adhezja komórek LBC3 i LN18, traktowanych dezintegryną VLO4, do podłoża z kolagenem typu I oraz zwiększona migracja komórek wszystkich linii pod wpływem inhibitora kinazy p38 na podłożu z kolagenem mogą być spowodowane zmianami w ekspresji integryn.
8. Zahamowanie aktywności ERK1/2 pod wpływem inhibitora U0126, α, α' -dipirydyłu, VLO4 i luteoliny, niezależnie od zmian w ekspresji kolagenu typu I i 127 integryn, koreluje z hamowaniem aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz obniżeniem migracji komórek.
9. Zastosowanie inhibitora kinazy p38 hamuje aktywność MMP-9 w linii LN18 i migrację komórek, natomiast aktywuje MMP-2 i zwiększa migrację komórek LN229.
10. Indukcja MMP-9 przez ester forbolu PMA w komórkach LBC3, pomimo silnego hamowania aktywności MMP-2, koreluje ze zwiększeniem migracji komórek, natomiast hamowanie aktywności MMP-2 i ekspresji integryny $\alpha 9$ w komórkach LN229 powoduje hamowanie ich migracji.

4. Uwagi

- 4.1. Wstęp rozprawy ilustrowany jest 15 rycinami i 1 tabelą. Z ich opisu nie wynika wprost, czy zostały one uzyskane ze zbiorów badaczy, z którymi

Kandydatka współpracuje, czy też zapożyczone z innych źródeł. Autorka rozprawy powołuje się na źródła, z których korzystała do ich opracowania, stosując komentarz „z własną modyfikacją”. Nie wiadomo jest jednak, czy modyfikacje zmieniły tak bardzo oryginały, że nie było potrzeby uzyskania zgód wydawców na ich wykorzystanie.

4.2. W opisie linii komórkowych pochodzących z GBM brak jest danych dotyczących ich szczegółowej charakterystyki użytych linii komórkowych jak również informacji o przeżywalności komórek.

4.3. W opisie wirowania w celu przygotowania hodowli komórkowej oraz izolacji frakcji jądrowej komórek autorka rozprawy podaje stosowaną prędkość obrotową podczas osadzania a nie stosowaną siłę odśrodkową (G), która zależy od zastosowanego rotora.

4.4. Autorka rozprawy dla porównania ekspresji genów i pomiarów densytometrycznych jako kontrole przyjęła standardowo odpowiednio *GADPH* i β -aktynę. Czy nie byłoby dokładniej przyjąć jako odniesienia genów których ekspresja jest stała w badanych komórkach i białek, których stężenie niezależnie od warunków doświadczenia pozostaje stałe.

4.5. W doświadczeniach dotyczących badania ekspresji kolagenu 1 mgr Edyta Andrulowicz-Botulińska bada ekspresję genów *COL1A1* i/lub *COL1A2* kodujących łańcuchy prokolagenu.

Powyższe uwagi nie zmniejszają ogólnie bardzo pozytywnej oceny recenzowanej pracy, jakkolwiek moim zdaniem powinny być wprowadzone przed publikacją wyników.

5. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Edyty Andrulowicz-Botulińskiej napisana jest jasno i logicznie. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do badań nad oceną bardzo złożonych zależności między ekspresją integrzyn ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$), kolagenu typu I, MMP-2, MMP-9 a migracją komórek glejaka wielopostaciowego mózgu. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o dobrym przygotowaniu doktorantki do prowadzenia badań, wskazując jednocześnie na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Na podkreślenie zasługuje aplikacyjny charakter

pracy. Rozprawa spełnia wszystkie wymagania ustawy o tytułach i stopniach naukowych, dotyczące przygotowywania rozpraw doktorskich.

Wobec powyższego wnoszę do wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę fakt dużej innowacyjności w podejściu do badań i ich znaczenia dla badań nad glejakiem wielopostaciowym mózgu wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



Ryszard Szyszka