



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

Warszawa, 28 listopad 2012 r.

Szanowny Pan
Prof. dr hab. Wojciech Francisz
Dziekan Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

OCENA
ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH
MGR MAGDALENY TERTIL
ZATYTUŁOWANEJ: "ROLE OF THYMIDINE PHOSPHORYLASE AND NRF2
TRANSCRIPTION FACTOR IN NON-SMALL LUNG CARCINOMA GROWTH AND
ANGIOGENESIS"

Rak płuca jest pierwszym nowotworem w Polsce u mężczyzn i drugim u kobiet co do częstości zachorowań, zaś pierwszym co do przyczyny zgonów z powodu chorób rozrostowych u obu płci. Rocznie z powodu raka płuca umiera na świecie ponad 1,3 miliona osób. Jest to niezwykle złożona choroba dotycząca niezbędnego do życia narządu, której wczesne rozpoznanie stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Poznanie zmian biologicznych leżących u podłoża rozwoju raka płuca, zadanie niezwykle ważne i aktualne, zostało wybrane przez panią Magdalenę Tertil jako przedmiot badań opisanych w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej.

Doktorantka podjęła próbę określenia roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2, oksygenazy hemowej-1 oraz fosforylasy tymidylanowej w regulacji angiogenezy w modelu niedrobnokomórkowego raka płuca. Wykazała ona, że zwiększona ekspresja genu dla Nrf2 prowadzi do zahamowania proliferacji i migracji komórek linii NCI-H292 oraz do zmniejszonej ekspresji markera komórek macierzystych ALDH i wybranych onkogennych mikro RNA. Ponadto, w transdukowanych komórkach zaobserwowała zwiększoną ekspresję mikro RNA związanych z zahamowaniem procesów nowotworzenia oraz obniżone wydzielanie prozapalnej cytokiny IL-1 β oraz wybranych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Do najciekawszych, w mojej



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

ocenie, wyników należy zwiększona ekspresja fosforylasy tymidylanowej w komórkach transdukowanych genem dla czynnika Nrf2. Jest to obserwacja oryginalna, do tej pory nie opisywana przez innych badaczy. Mgr Magdalena Tertil wykazała ponadto, że w regulacji ekspresji fosforylasy tymidyny bierze pośrednio udział oksygenaza hemowa-1 i proces ten jest zależny od statusu oksydacyjnego komórki. Dalsze badania pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że zwiększona ekspresja fosforylasy tymidylanowej hamuje proliferację i migrację badanych komórek, jednocześnie nasila ona wydzielanie czynników proangiogennych i stymuluje proces angiogenezy. Zwiększony potencjał angiogeny komórek transdukowanych genem dla fosforylasy tymidylanowej Doktorantka potwierdziła w mysim modelu *in vivo* oraz w modelu komórek śródbłonna *in vitro* poddanych działaniu cytokin prozapalnych zwiększających ekspresję badanego genu. Zbadanie ekspresji fosforylasy tymidylanowej i związanych z nią cytokin prozapalnych w pierwotnym materiale pobranym od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca uważam za najbardziej wartościowy element recenzowanej rozprawy. Są to bez wątpienia obserwacje oryginalne, o znaczeniu poznawczym i potencjalnym zastosowaniu klinicznym.

We Wstępie doktorantka szczegółowo omówiła epidemiologię, podstawy biologii oraz klasyfikację kliniczną raka płuca, podstawy biologiczne procesu angiogenezy nowotworowej oraz możliwości zastosowania terapii antyangiogennej w leczeniu tego nowotworu, głównie wymierzonej w białka ważne dla przebiegu tego zjawiska, takie, jak fosforylaza tymidyny, oksygenaza hemowa-1 oraz czynnik transkrypcyjny Nrf2. Ponadto, jeden podrozdział poświęciła roli mikro RNA w powstawaniu nowotworów oraz znaczeniu zapalenia i nowotworowych komórek macierzystych w rozwoju nowotworów. Tę część rozprawy oceniam wysoko. Doktorantka wykazała się w niej dużą dojrzałością i wprawą w analizowaniu obszernych danych z literatury światowej. Ponadto, zilustrowała część opisywanych zjawisk bardzo czytelnymi i starannymi rycinami, które ułatwiają lekturę tego rozdziału. W mojej ocenie we Wstępie zabrakło jednak płynnych przejść narracyjnych pomiędzy poszczególnymi podrozdziałami. Uważam również, że Tabela 1, opisująca stadia kliniczne raka płuca, nie wpisuje się w tematykę zagadnień poruszanych w części badawczej pracy i jest w związku z tym zbędna. Doktorantka nie ustrzegła się również drobnych błędów językowych (dla przykładu, na stronie 22 zamiast zdania: "... stimuli, which leads to degradation of extracellular matrix..." powinno znaleźć się zdanie: "...stimuli, which lead to..."). Te drobne mankamenty w żaden sposób nie umniejszają wartości rozprawy, która została napisana niezwykle starannie i przejrzysto. Na podkreślenie zasługuje również bardzo sprawne posługiwanie się językiem angielskim przez Doktorantkę.

Cztery cele pracy zostały zwięźle określone i w większości odpowiadają podjętym badaniom.



Opis Materiałów i Metod jest niezwykle wyczerpujący i staranny. Zastosowana przez Doktorantkę metodyka badawcza jest nowoczesna i zgodna z najwyższymi światowymi standardami dla tego typu doświadczeń. Należy podkreślić, że w swojej pracy mgr Magdalena Tertil wykorzystała liczne, niekiedy zaawansowane techniki laboratoryjne, co wskazuje na Jej duże doświadczenie badawcze i biegłość w posługiwaniu się rozmaitymi metodami biologii molekularnej. Moją wątpliwość budzi jedynie opis oceny ekspresji genu reporterowego (genu dla lucyferazy, podrozdział 6.4.3.). W jaki sposób Doktorantka określała aktywność badanych czynników transkrypcyjnych? Czy otrzymane wartości luminescencji przeliczała na całkowitą ilość białka w ocenianych lizatach? Złotym standardem dla tego rodzaju doświadczeń jest jednoczesowe wprowadzenie do komórek nie tylko genu dla lucyferazy świetlikowej (*firefly*), ale również lucyferazy *Renilla*, której aktywność powinna stanowić właściwy punkt odniesienia dla uzyskanych wyników, umożliwiając uwzględnienie również wydajności transfekcji ocenianych komórek. Ponadto, z poznawczego punktu widzenia przydatny byłoby choć skrótowy opis próbek pobranych od pacjentów z rakiem płuca (na przykład rozpoznanie histopatologiczne).

Opis uzyskanych Wyników stanowi najobszerniejszą część ocenianej rozprawy. W swoich badaniach Doktorantka posłużyła się modelami *in vitro* (ludzkie linie komórkowe raka płuca NCI-H292 i A549 oraz ludzkie komórki śródbłónka naczyniowego HUVEC i HMEC), modelem ksenoprzeszczepu komórek NCI-H292 do myszy nagich oraz przeanalizowała materiał kliniczny (próbki guzów pierwotnych oraz przerzutowych pobrane od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca). Mnogość zastosowanych modeli bez wątpienia znakomicie zwiększa znaczenie poznawcze poczynionych obserwacji.

Niektóre z uzyskanych przez Doktorantkę wyników budzą jednak moje drobne wątpliwości i dalsze pytania:

1) Niezręczne jest posługiwanie się terminem "tumorogenność" w odniesieniu do wyników uzyskanych w eksperymentach w modelu *in vitro* (podrozdział 7.1.5., 7.2.1. oraz 7.3.) - jest to zjawisko opisywane raczej jedynie w modelach *in vivo*.

2) Na rycinie 7.7 oraz 7.12 różnice w inkorporacji bromodeoksyurydyny pomiędzy komórkami transdukowanymi / transfekowanymi pustym wektorem i genem dla Nrf2 / HO-1, choć istotne statystycznie, są, w mojej ocenie, dość subtelne.

3) Nie sposób odnieść się do oceny ekspresji mikro RNA w komórkach wykazujących zwiększoną ekspresję HO-1, gdyż uzyskane wyniki nie zostały omówione w rozprawie, a publikacja, która stanowi do nich odniesienie, nie jest jeszcze opublikowana / publicznie dostępna.



4) Zastanawiające jest, dlaczego Doktorantka w swoich badaniach nie oceniła ekspresji i roli mikro RNA, dla którego geny znajdują się w obrębie genu dla czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (miR-4444-1 oraz miR-3128)? Ponadto, w ocenie roli badanych mikro RNA należałoby posłużyć się testami umożliwiającymi weryfikację funkcji badanych mikro RNA (na przykład wprowadzić do komórek plazmid zawierający gen dla lucyferazy pod kontrolą konstytutywnego promotora, zawierający fragment 3'UTR genu docelowego dla badanego mikro RNA).

5) Jaką analizą bioinformatyczną posłużyła się Doktorantka przy ocenie miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w obrębie promotora genu dla Nrf2?

6) Jak Doktorantka interpretuje brak różnic we wzroście guza pomiędzy grupą kontrolną a grupą ze zwiększoną ekspresją fosforylasy tymidylanowej (dane z eksperymentu wykonanego w modelu *in vivo*, przedstawione na rycinie 7.29.A)?

7) Czy istnieje wytłumaczenie dla znacznych różnic w ekspresji tubuliny pomiędzy komórkami kontrolnymi a komórkami ze zwiększoną ekspresją fosforylasy tymidyny przedstawionymi na rycinie 7.41?

8) Mając na uwadze niewielką ekspresję VEGF w komórkach HUVEC, na rycinie 7.42 należałoby przedstawić raczej wyniki surowe, a nie odsetek wartości uzyskanej dla komórek kontrolnych, gdyż jest to, w mojej opinii, nieco mylące.

W Dyskusji, napisanej niezwykle dojrzałe, Doktorantka przedstawia wyniki swoich badań na tle literatury światowej i podejmuje próbę ich analizy w oparciu o znane zjawiska uczestniczące w rozwoju nowotworów. Jest to, w mojej ocenie, niezwykle cenna część recenzowanej rozprawy, choć brakuje mi w niej częstszych odniesień do konkretnych wyników uzyskanych przez Doktorantkę w przebiegu Jej badań.

Piśmiennictwo zostało przygotowane niezwykle starannie i opiewa na aż 439 pozycji. W rozprawie w znakomitej większości cytowane są aktualne pozycje literatury światowej z zakresu poruszanej w pracy tematyki oraz najważniejsze prace historyczne opublikowane w prestiżowych czasopismach międzynarodowych. Ta część rozprawy również wskazuje na ogromną dojrzałość naukową Doktorantki i Jej sprawność analizowaniu niezwykle bogatej literatury. W mojej ocenie cytowane piśmiennictwo mogłoby się zamknąć w mniejszej liczbie bez znacznego zubożenia rozprawy. Również recenzent czułby się wtedy nieco mniej przytłoczony jego rozmiarem.

Na podkreślenie bez wątpienia zasługuje fakt, że mgr Magdalena Tertil jest współautorem dwóch prac oryginalnych i pierwszym autorem jednej pracy przeglądowej opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedłożoną mi do recenzji rozprawę oceniam bardzo wysoko. Uważam, że w pełni odpowiada ona wymogom stawianym pracom doktorskim.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr Magdaleny Tertil do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Dominika Nowis

dr hab. Dominika Nowis
Zakład Immunologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1A, budynek F
02-097 Warszawa