UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSYTUT ZOOLOGII
ZAKŁAD CYTOLOGII

prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko
Prodziekan ds. organizacji badań Wydziału Biologii
Kierownik Zakładu Cytologii

Warszawa, 12 listopada 2014

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Rola koneksyny 43 w regulacji potencjału inwazyjnego komórek raka prostaty i glejaka wielopostaciowego"
autorstwa Pana mgr. Damiana Ryszawego.

Praca doktorska autorstwa Pana mgr. Damiana Ryszawego została wykonana pod kierunkiem dr hab. Jarosława Czyża w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Doktorant realizował nowatorski projekt, którego wyniki doprowadziły do stworzenia modelu badań inwazyjności nowotworów i wskazały na czynniki, których ekspresja może charakteryzować inwazyjne komórki linii nowotworowych o różnym pochodzeniu.

Nadrzędnym celem badań poświęconym mechanizmom nowotworzenia oraz przerzutowania nowotworów jest opracowanie metod skutecznej terapii. Aby było to możliwe konieczna jest precyzyjna analiza kolejnych etapów progresji nowotworów, zmian genetycznych i epigenetycznych skutkujących przystosowaniem się komórek do nisz, w których się znalazły. W efekcie takich zmian w obrębie jednego nowotworu powstają różniące się od siebie populacje. Także takie, które charakteryzuje zwiększona zdolność do migracji, a co za tym idzie większa inwazyjność. Co istotne, a zarazem z punktu widzenia pacjenta niekorzystne, te różne populacje komórek może charakteryzować różna wrażliwość na stosowaną chemio- czy radioterapię.

Wykorzystanie w badaniach poświęconych nowotworzeniu linii komórek nowotworowych często było i jest krytykowane. Zakłada się bowiem, że linia komórkowa jest, lub raczej powinna być, jednorodna. Jednak z roku na roku coraz więcej danych eksperymentalnych wskazuje na to, że także w przypadku linii komórkowych obserwuje się powstawanie populacji różniących się od siebie. Prowadzona in vitro hodowla nie odzwierciedla co prawda skomplikowanych oddziaływań zachodzących w organizmie, ale to „uproszczone" środowisko pozwala na manipulowanie wybranymi jego elementami i precyzyjną analizę wybranych sub-populacji komórek. Uzyskane wyniki mogą stać się wyjściem do dalszych weryfikujących analiz, w których badane będą hodowle pierwotne komórek nowotworowych czy też tkanki nowotworowe izolowane od pacjenta. Dostepność wielkiej liczby różnego rodzaju linii komórek nowotworowych pozwala na porównywanie reakcji na te same bodźce komórek uzyskanych z różnych nowotworów, umożliwiając identyfikacje odmienności czy wskazywanie podobieństw. Ten drugi aspekt wydaje się być szczególnie istotny w poszukiwaniach skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

W badaniach przedstawionych w recenzowanej rozprawie doktorskiej mgr Damian Ryszawy wykorzystał linie komórek nowotworowych. Stanowiły one narzędzie w analizach powstawania „sub-linii" różniących się fenotypem i inwazyjnością. Doktorant wybral linie komórek szczurzego i ludzkiego raka prostaty oraz komórek ludzkiego glejaka wielopostaciowego. Wykorzystał więc komórki uzyskane z guzów o różnych pochodzeniu. Głównymi celami Doktoranta było stworzenie modelu pozwalającego na śledzenie mikroewolucji komórek nowotworowych oraz analiza kluczowego dla inwazyjności takich komórek procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). W oparciu o dostępne dane literaturowe swoje analizy skoncentrował na powiązaniu fenotypu komórek z poziomem czynnika transkrypcyjnego Snail-1, który odpowiedzialny jest m.in. za regulację procesów związanych z EMT oraz koneksyny 43 (Cx43), której rola w nowotworzeniu była analizowana w licznych pracach.

Szczegółowe cele wymienione w pracy obejmowały:

- określenie wzoru heterogenności komórek modelowych raka prostaty i glejaka wielopostaciowego;
- identyfikację powiązania procesów towarzyszących EMT z ekspresją koneksyny 43 oraz określenie roli tych procesów w powstawaniu heterogenności fenotypowej badanych komórek;
- określenie roli białka Snail-1 i koneksyny 43 w procesach związanych z powstawaniem odmiennych populacji komórek nowotworowych;
- określenie powiązań między ekspresją Snail-1 i koneksyną 43;
- określenie roli konkesyny 43 w powstawniu populacji komórek inwazjnych;
- określenie roli komórek macierzystych nowotworu w powstawaniu populacji komórek inwazyjnych.

Postawione cele mgr Damian Ryszawy zrealizował przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych i skrupulatnie przeprowadzonych analiz. Realizując je Doktorant wykorzystał technik biologii molekularnej i biologii komórki: hodowle komórek nowotworowych, hodowle komórek śródbłonka, testy migracji komórek, transfekcje komórek, różnego rodzaju analizy mikroskopowe – mikroskopię świetlną, fluorescencyjną, sił atomowych, analizę FRET, barwienia cytologiczne, immunodetekcję antygenów, cytometrię przepływowa, Western blotting, immunoprecypitację, spektroskopię mas. Wykorzystując techniki siRNA czy nadekspresji manipulował poziomem wybranych białek. Niemal wszystkim analizom towarzyszyły odpowiednio dobrane kontrole. W pracy nie znalazłam jedynie informacji o weryfikacji specyficzności stosowanych przeciwciał. Uzyskane dane poddane zostały niezbędnym analizom statystycznym i bioinformatycznym. Wykorzystując wyżej wymienione metody mgr Ryszawy zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele, a wyniki jego badań zostały już włączone do publikacji, które ukazały się w 2013 (Musialik i wsp.) i 2014 roku (Ryszawy i wsp.), w czasopismach tej klasy co *Oncology Reports* i *Carcinogenesis*. Warto także nadmienić, że oprócz tych dwóch prac Doktorant współtworzył 2 kolejne publikacje, które również ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jest to niewątpliwie powód do satysfakcji i świadectwo, że mgr Ryszawy zaangażowany był w realizację wartościowych badań.

Rozprawa doktorska pana mgr. Damiana Ryszawego poprzedzona jest bardzo dobrym *Wstępem*, wyczerpująco i precyzyjnie wprowadzającym w zagadnienia, którym poświęcona jest praca. Doktorant z dużą precyzją zaprezentował tło swoich badań. Pierwsza część *Wstępu* poświęcona jest heterogenności fenotypowej komórek nowotworowych. Następnie opisana została problematyka inwazji nowotworowej i przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Omówione zostały mechanizmy molekularne związane z regulacją EMT i podobieństwa procesów zachodzących podczas rozwoju zarodkowego i nowotworzenia. Przedstawione zostały także dane na temat roli połączeń międzykomórkowych podczas nowotworzenia. Autor w

ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

sposób przejrzysty przedstawił modele ewolucji kolonalnej nowotworu, mikroewolucji prowadzącej do heterogenności nowotworowów, a także dowody i kontrowersje związane z komórkami macierzystymi nowowotworów. Końcowy fragment *Wstępu* poświęcony jest liniom komórkowym, które zostały wykorzystane w opisanych badaniach, oraz uzasadnieniu dokonanego wyboru. We *Wstępie* Doktorant wielokrotnie odnosi się do historii analiz opisywanych procesów, podsumowuje nie tylko istniejący stan wiedzy ale także przedstawia swoje poglądy na tematykę, której dotyczy rozprawa.

Informacje zawarte w części poświęconej *Materiałom i Metodom* zaprezentowane zostały w jasny i bardzo szczegółowy sposób. Niektóre fragmenty zapewne można byłoby skrócić. Nie mniej jednak tak obszerna prezentacja stosowanych metod nie jest wadą i może ułatwić wykorzystanie technik przez innych badaczy.

Wyniki zawierają uporządkowany opis realizacji projektu. Autor przeprowadził wielowątkowe badania dotyczące analizy licznych linii i „sub-linii" komórkowych. Analiza była wieloaspektowa, wykorzystująca różne techniki biologii komórki i biologii molekularnej. Zaprezentowano ogrom danych i muszę przyznać, że Doktorant zaimponował mi sposobem, w jaki udało mu się je przedstawić. Podczas lektury pracy nie poczułam się ani razu zagubiona, chociaż czasem oczekiwałam nieco większego wsparcia ze strony Autora. Szczególnie wtedy, gdy na scenę wprowadzał kolejną „sub-linię" lub bardzo oszczędnie uzasadniał potrzebę tej czy innnej analizy. Nie mniej jednak ogrom uzyskanych rezultatów przedstawiony został w sposób czytelny.

Pierwsza część *Wyników* poświęcona została porównaniu klonów komórek uzyskanych w wyniku hodowli linii komórek raka prostaty. Klony te różniły się morfologią i zostały zakwalifikowane jako nabłonkowe (epitelialne) oraz mezenchymalne. Doktorant wykazał, że w linii komórek MAT-LyLu, które charakteryzuje wysoki potencjał metastatyczny, dominują klony mezenchymalne. Druga linia AT-2 charakeryzowała się większą różnorodnościa klonów i dlatego to ona była przede wszystkim analizowana w kolejnych doświadczeniach. Dalsze analizy uzyskanych „sub-linii" wykazały, że te o mezenchymalny wyglądzie charakteryzuje większa podatność na odkształcenia oraz zdolność do migracji. Ich komórki opisywała także wyższa ekspresja Snail-1 i koneksyny 43. Komórki żadnej z linii nie eskprymowały E-kadheryny. Niektóre, mimo morfologii charakterystycznej dla komórek mezenchymalnych syntetyzowały natomiast cytokeratyny. Co ciekawe, uzyskano także linie, których komórki cechowała morfologia charakterystyczna dla komórek nabłonkowych, a mimo to wykazywały one wysoką zdolność migracji. Komórki o „morfologii mezenchymalnej", o wysokiej ekspresji Snail-1 i koneksyny 43, miały najwyższą zdolność do migracji przez warstwę śródbłonka, a także do tworzenia połączeń szczelinowych. Zdaniem Autora mogło to zwiększać ich inwazyjność. Zróżnicowanie „sub-linii" miało także swój wyraz we wrażliwości komórek na cytostatyki. Dalsze analizy dotyczyły linii glejaka wielopostaciowego. Wykazały one, że podobnie jak w przypadku komórek raka prostaty, można z nich wyprowadzić klony różniące się morfologią – nabłonkowe, mezenchymalne, ale także o charakterstyce pośredniej. Ponownie, skorelowano potencjał migracyjny komórek tych linii z ich charakterystyką cytologiczną i molekularną. Te o wyglądzie komórek mezenchymalnych charakteryzowała większa zdolność do migracji oraz podwyższona ekspresja Snail-1 i koneksyny 43. Co ciekawe, także niektóre „sub-linie nabłonkowe" charakteryzował wysoki poziom Snail-1 i koneksyny 43 – również korelowało to z ich zdolnościa do migracji. Ta i kolejne obserwacje świadczą o tym, że EMT jest procesem dynamicznym i nie zawsze kompletnym.

Istotnym etapem badań było określenie dynamiki ewolucji klonalnej badanych linii komórkowych raka prostaty oraz tych uzyskanych z glejaków (rozdział 4.4). Autor wykazał, że wraz z pasażowaniem komórek „sub-linii" odtworzona zostaje ich heterogenność. Klony kolejnej

ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

„generacji" charakteryzował różny poziom Snail-1 czy koneksyny 43. Tak więc komórki "sub-linii", które wyjściowo były do siebie podobne, zmianiały się w trakcie hodowli in vitro. Autor postawił pytanie, czy możliwym jest że w powstawaniu heterogenności badanych linii odgrywają rolę macierzyste komórki nowotworowe (CSC). Podjął próbę ich izolacji z linii i „sub-linii" raka prostaty AT-2. Wykazał, że te tworzą one klony o różnej morfologii. Fig. 30 (str. 101) prezentuje, że komórki macierzyste obecne są one we wszystkich analizowanych „sub-liniach". Czy wszystkie te komórki syntetyzują markery komórek pluripotencjalnych? Czy zdaniem Autora podobny odsetek CSC wystepuje w liniach glejaka? Czy jest możliwe, że to jedynie te komórki odpowiedzialne są za odtworzenie heterogenności badanych „sub-linii"?

Kluczowe dla zrozmienia zależności Snail-1 – koneksyna 43 były doświadczenia, w których manipulowano poziomem ekspresji obu czynników. Doktorant wykazał, że podwyższona ekspresja Snail-1 zwiększa poziom Cx43 oraz inwazyjność komórek nowotworowych. Natomiast wycieszenie ekspresji Snail-1 prowadzi do zmiany morfologii komórek (z „mezenchymalnej" na „nabłonkową"), ograniczenia ich migracji i spadku ekspresji Cx43. Zależność między Snail-1 a badaną koneksyną została potwierdzona dzięki obniżeniu jej ekspresji. Doprowadziło to do spadku poziomu Snail-1. W jaki sposób te dwa czynniki są ze sobą powiązane pozostaje niejasne. Doktorant stwierdził, że nie oddziałuja one ze sobą bezpośrednio. Wykazał natomiast, że Cx43 oddziałuje z tubuliną i to właśnie to białko może stanowić platformę dla relacji Snail-1 – Cx43. Czy Autor mógłby zaproponować doświadczenia prowadzące do weryfikacji tej hipotezy?

W bardzo dobrze przygotowanej *Dyskusji* wyniki własne zostały sprawnie omówione i przedstawione na tle rezultatów innych zespołów badawczych. Wszystkie wątki pracy zostały fachowo przedyskutowane w oparciu o wiele prac oryginalnych (w całej pracy Autor zacytował ich aż 290!). Autor swobodnie „poruszał" się w dostępnej literaturze, prezentował własne przemyślenia, krytycznie odnosił zarówno do wyników badań własnych jak i innych badaczy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje strona edytorska i graficzna pracy. Rozprawa została przygotowana niezwykle starannie. Ilustrowana jest bardzo dobrej jakości wykresami oraz zdjęciami, przedstawionymi w precyzyjnie zaplanowanych tablicach. Muszę przyznać, że już dawno nie recenzowałam rozprawy przygotowanej z tak wielką dbałością. Nie ukrywam, że jej lektura sprawiła mi przyjemność nie tylko ze względu na zawartość, ale także na sposób prezentacji.

Obowiązkiem recenzenta jest jednak nie tylko omawianie zalet pracy, ale także zwracanie uwagi na jej niedoskonałości. Chciałabym jednak podkreślić, że nie znalazłam ich zbyt wielu. Być może jest to dowód mojej osłabionej czujności. To co czasem utrudniało mi lekturę to fakt, że opisy przeprowadzonych badań bywały bardzo zwięzłe. Autor nie zawsze wystarczająco jasno opisał dlaczego wykonał taką a nie inną analizę. Przykładowo, w rodziale 4.1.2 (str. 61) zabrakło wytłumaczenia dlaczego badana jest N-kadheryna, wyjaśnienie pojawia się w rozdziale 4.1.5 (str. 69). W przypadku kiedy po raz pierwszy opisywana jest analiza jakiegoś czynnika wskazane byłoby odesłanie czytelnika do odpowiedniego fragmentu *Wstepu* lub też przypomnienie dlaczego takie badanie jest istotne. Szkoda, że zamieszczone na końcu pracy piekne zdjęcia komórek uzyskanych „sub-linii" AT-2 (rozdział 8.2, str. 147) nie zostały opisane z wykorzystaniem skrótów stosowanych w pracy. Niektóre ryciny zawierają opisy niemożliwe do odczytania (np. Ryc. 18, str. 86 – nieczytelne są opisy wykresów części A; Ryc. 19, str. 87 – nieczytelna legenda pod wykresami; Ryc. 30, str. 101 – nieczytelne opisy badanych antygenów w części A).

Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Znalazłam w niej jedynie nieliczne mankamenty edytorskie, stylistyczne, czy związane z używanym żargonem. Do przykładów takich

ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

mankametnów moge zaliczyć, np. „komórki pozytywne dla markera CD34" (str. 31), „zdrapywano w obecności PBS" (str. 54, 56), „elastyczne komórki" (str. 65), czy antropomorfizacje w rodzaju „nowotwór naśladuje niektóre etapy ontogenezy" (str. 34) lub „pozwalano komórkom dorosnąć" (str. 47). W uchu biologa rozwoju, którym jestem, niezbyt zręcznie brzmi też „potomstwo" komórek. Chciałam również zwrócić uwagę, że Yvonne Dragan była kobietą, a nie jak sugeruje Autor pisząc„koncepcja Pitota i Dragana" (str. 20.), mężczyzną. Wszystkie wymienione usterki uważam jednak za niewielkie i nieistotne dla oceny, zwracam na nie uwagę jedynie z obowiązku, jaki na mnie spoczywa, jako na Recenzencie pracy.

Podsumowując, pan mgr Damian Ryszawy zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na związek między ekspresją czynnika transkrypcyjnego Snail-1 oraz Cx43 a inwazyjnością komórek nowotworowych. Wskazują także na to, że poziom ekspresji obu białek może być markerem komórek inwazyjnych w tak różnych rodzajach komórek nowotworowych jak te pochodzenia nabłonkowego i glejowego. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie aplikacyjne. Z cała pewnością można uznać przeprowadzone badania za nowatorskie. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Damiana Ryszawego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę jakość przeprowadzonych badań i przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej zgłaszam wniosek o nagrodzenie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
ZAKŁADU CYTOLOGII INSTYTUTU ZOOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienk

ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl