instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

POLSKA AKADEMIA NAUK
**Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego**
Zakład Biochemii
Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Tel. (22)5892456; Fax: (22) 8225342, e-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędowicz
Kierownik Zakładu Biochemii
i Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 12 stycznia 2015 r.

# RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Ryszawego
pt.: "Rola koneksyny43 w regulacji potencjału inwazyjnego komórek raka prostaty i glejaka postaciowego" wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Jarosława Czyża
z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Nowotwory to druga po chorobach układu krążenia przyczyna przedwczesnej śmiertelności u ludzi. Mimo intensywnych badań nad poznaniem mechanizmów nowotworzenia, nad opracowaniem skutecznych terapii przeciwnowotworowych (w bazie Pubmed znajdują się już ponad 3 miliony publikacji poświęconych nowotworom, a ich liczba począwszy od początku XIX stale i lawinowo rośnie) wciąż dalecy jesteśmy - niestety - od opanowania choroby nowotworowej. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest nie tylko olbrzymia różnorodność różnych typów nowotworów (w zasadzie każda tkanka może ulec transformacji nowotworowej), ale także zaobserwowane stosunkowo niedawno zjawisko heterogenności fenotypowej w obrębie danego typu nowotworu/guza oraz postępująca mikroewolucja identyfikowanych dlań podtypów. Pomimo upływu kilku dekad zagadnienie to nie jest w pełni poznane, po części dlatego, że większość badań - prowadzonych głównie *in vitro* na liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów ludzkich lub zwierzęcych nie podejmowała tego problemu. A jest to przecież zagadnienie o olbrzymim znaczeniu nie tylko poznawczym, ale i klinicznym, gdyż - jak to wykazał również w swoje rozprawie Doktorant - heterogenność guza może mieć negatywne implikacje kliniczne i terapeutyczne.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. Damiana Ryszawego, poświęcona poznaniu mechanizmów regulacji potencjału inwazyjnego komórek raka prostaty i glejaka postaciowego, która została wykonana w grupie o tak znaczącym dorobku na temat mechanizmów inwazyjności komórek nowotworowych, doskonale wpisuje się w nurt badań na poznaniem przyczyn różnicowania się komórek nowotworowych w podtypy o tak odmiennych właściwościach oraz nad poszukiwaniem potencjalnych markerów inwazyjności. nowotworów

## Formalny opis rozprawy

Licząca (aż) 151 stron praca posiada w zasadzie układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się ona listą publikacji Doktoranta, po której następują spis treści, kilkustronicowe streszczenia (w języku angielskim i polskim) oraz liczący 3,5 strony wykaz stosowanych skrótów. Wstęp liczy 24 strony i nie zawiera żadnych rycin i schematów. Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy znajduje się liczący 16 stron rozdział materiały i metody. Ponadto, znaczna część informacji dotyczących stosowanych materiałów i linii komórkowych została zamieszczona na końcu rozprawy w postaci załączników (rozdział 8). Wyniki liczą (aż) 43 strony i zawierają 31 złożonych rycin oraz tabelę; po nich następuje 20-stronicowa dyskusja oraz kilkustronicowe podsumowanie

wyników wraz z wnioskami. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa, który składa się z 290 pozycji literatury (w tym znaczna ich część to prace z ostatniej dekady) oraz wspomnianym wyżej rozdziałem załączniki i spisem rycin.

**Ocena merytoryczna**

Wykaz skrótów jest wyczerpujący, podane nazwy są w zasadzie prawidłowe, aczkolwiek przy niektórych skrótach Doktorant zapomniał podać nazwy w języku polskim. Nie podoba mi się również wyjaśnienie skrótu techniki FRET, proszę Doktoranta o wytłumaczenie tego podczas obrony rozprawy.

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o procesie nowotworzenia i heterogenności komórek nowotworowych oraz o udziale koneksyn w procesie mikroewolucji nowotworów. Rozdział ten kończy opis używanych powszechnie (również tych wykorzystanych przez Doktoranta) linii komórkowych wyizolowanych z ludzkich bądź zwierzęcych nowotworów - raka prostaty i glejaków. Nie mam zasadniczych uwag do tej części pracy, jest ona napisana żywym językiem, w sposób czytelny i zrozumiały. Natomiast z punktu widzenia czytelnika rozprawy można było zamieścić ryciny obrazujące opisywane w tej części rozprawy procesy i białka; z pewnością ułatwiłoby to analizę tekstu.

Zasadniczy cel pracy to scharakteryzowanie heterogenności dwóch podstawowych linii komórkowych (raka prostaty i glejaka), zwłaszcza pod kątem ich zastosowania do analiz mikroewolucji komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Cel ten Autor postanowił zrealizować poprzez (i) określenie heterogenności badanych komórek, (ii) identyfikację powiązań procesów nowotworzenia z ekspresją koneksyny 43 (Cx43) i określenie roli tych powiązań w kształtowaniu heterogenności badanych linii, (iii) zbadanie powiązania pomiędzy "przeprogramowaniem" (jak to Autor określił) badanych komórek a funkcją czynnika transkrypcyjnego Snail-1, (iv) analizę powiązań pomiędzy ekspresją Snail-1 i Cx43 oraz określenie potencjalnej roli obu białek w mikroewolucji i progresji nowotworów, (v) poznanie mechanizmów zaangażowania Cx43 w powstawanie i inwazyjność podtypów badanych komórek oraz (vi) określenie roli komórek o fenotypie komórek macierzystych w mikroewolucji inwazyjnych populacji badanych linii komórkowych. To bardzo ambitne plany, które Doktorant zrealizował następnie w całej rozciągłości.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych, opisanych w rozdziale materiały i metody. Ta część rozprawy zawiera opis hodowli i szeregu analiz użytych w toku badań szeregu linii komórkowych (naliczyłam się aż 11 linii, nie wliczając w to uzyskanych, a następnie analizowanych podtypów). Autor przeprowadził analizy aktywności proliferacyjnej komórek, testy transmigracji (nie bardzo podoba mi się ta nazwa...), analizy klonalne, mikroskopowe (w tym analizę aktywności ruchu komórek i mikroskopię sił atomowych), wykonał szereg barwień i analiz immunocytochemicznych oraz analiz w wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Ponadto, Doktorant wykorzystał techniki immunodetekcji, koimmunoprecypitacji, metodę FRET oraz spektroskopię mas do określenia analizy poziomu występowania białek, a także do poznania oddziaływań pomiędzy nimi. Doktorant zastosował również technikę *si*RNA do wyciszenia ekspresji Snail1 i Cx43 oraz wywoływał ich przejściową nadprodukcje w komórkach. Tak jak zaznaczyłam, wcześniej spis użytych odczynników, przeciwciał i materiałów laboratoryjnych Doktorant umieścił na końcu rozprawy. Pragnę zaznaczyć, że liczba metod i analiz jest imponująca, co więcej zostały one opisane w sposób jasny i wyczerpujący, ale osobiście nie widzę powodu dla dokonania podziału części materiałowo-metodycznej. To trochę utrudnia czytanie rozprawy.

W rozdziale wyniki Doktorant przejrzyście opisuje uzyskane przez siebie dane. Na uwagę zasługuje nie tylko ich wielość, ale i wysoka ich wartość merytoryczna. Myślę, że uzyskanymi przez Doktoranta wynikami można by obdzielić co najmniej dwie rozprawy doktorskie - jedna mogła by być poświęcona analizie komórek raka prostaty, a druga - analizie komórek glejaka.

Aczkolwiek przyznaję, że wówczas ich przesłanie było by mniej znaczące Na pochwałę zasługuje sposób przedstawiania uzyskanych wyników. Autor bowiem krok po kroku wyjaśnia celowość przeprowadzanych doświadczeń, każde z nich podsumowując krótkim komentarzem. Należy również podkreślić, że niemal wszystkie dane są poddane analizie statystycznej, wykonano również szereg niezbędnych kontroli. Wszystko to powoduje, że tak ogromny materiał czyta się i łatwo i zrozumiale. Tak jak wcześniej wspomniałam imponujący jest również warsztat badawczy Doktoranta. Jako minus uważam zbyt mały rozmiar niektórych rycin (np. Ryc. 4, 8 i 28), ale Doktorant się zrehabilitował dołączając do rozprawy płytkę CD, co umożliwiło oglądanie rycin w dowolnym powiększeniu.

W swoich badaniach Doktorant skupił się na liniach komórkowych wyizolowanych z dwóch odmiennych feno- i genotypowo złośliwych nowotworów - glejaka (zwłaszcza linia T98G wyizolowana od pacjenta) i raka prostaty (zwłaszcza szczurza linia AT-2) oraz na ich podtypach. W toku żmudnych i pracochłonnych badań Doktorant przeanalizował poziom syntezy szeregu białek, które mogą być związane z wykazaną heterogennością fenotypową linii komórek raka prostaty (zwłaszcza szczurzej linii AT-2) i wykazał, że czynnik transkrypcyjny Snail-1 (regulujący przejście epitelialno-mezenchymalne, EMT) i koneksyna Cx43 (zaangażowana w tworzenie złączy szczelinowych) mogą służyć jako narzędzia do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworową w korelacji z ich zmienioną ekspresją. Doktorant wykazał również znaczące różnice w ekspresji obu tych białek w fenotypowo heterogennych komórkach glejaka i zauważył, że są one związane ze stopniem inwazyjności badanych komórek nowotworowych. Zaobserwował, że podwyższony poziom ekspresji Cx43 koreluje również z inwazyjnością komórek glejaka i raka prostaty; wykazał także, że koneksyna Cx43 może pełnić ważną rolę w mikroewolucji populacji komórek inwazyjnych. Szczególnie ważne z klinicznego punktu widzenia była obserwacja, że poszczególne podtypy komórek AT-2 wykazują zróżnicowaną (nawet przeciwstawną) wrażliwość na cytostatyki. Uzyskane wyniki wskazują również, że Cx43 może pełnić swoją rolę w regulacji inwazyjności obu typów nowotworów poprzez oddziaływanie/komunikację ze złączami szczelinowymi lub z efektorami szlaku transformującego czynnika wzrostu TGF-β. Co więcej, Doktorant wskazał że Cx43 może być zaangażowana w generowanie fenotypu inwazyjnego raka prostaty i zaproponował ważną rolę tego białka w mikroewolucji tego typu nowotworu. Ponadto, zaobserwował, iż nowotworowe komórki macierzyste - obok mikroewolucji klonalnej - mogą być również zaangażowane w utrzymaniu heterogenności fenotypowej linii AT-2 komórek raka prostaty.

Przy tak olbrzymim materiale Autor nie ustrzegł się od kilku nieścisłości i pominięć. W odniesieniu do Ryc. 1 brak mi informacji w jaki sposób liczony był procentowy udział podtypów, bo na Ryc. 2A nie widzę aż tak dużych różnic w morfologii komórek AT-2 (rozumiem, że to "mieszanina" komórek przed subklonowaniem). Nie do końca też rozumiem, co oznacza termin "fala inwazji". Przy analizach immunodetekcji brakuje mi analiz densytometrycznych; obraz samych prążków nie wystarczy bowiem do pełnej analizy ilościowej. Ciekawa również jestem (może to „herezja"), czy podobną heterogenność fenotypową można uzyskać dla nienowotworowych linii komórkowych (tzn. czy sama hodowla *in vitro* może stymulować różnicowanie się morfologiczne komórek). Nie rozumiem również, dlaczego w tytule dysertacji Doktorant pominął białko Snail-1, któremu poświęcił przecież tak dużo uwagi i miejsca w rozprawie.

Dyskusja jest wyczerpująca, bardzo dobrze napisana i wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta. Umiejętnie dyskutuje on tu swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe. I podobnie jak we wstępie - brakuje mi w tej części ilustracji (lub schematu), która by zobrazował(a) i podsumował(a) uzyskane dane.

W podsumowaniu wyników Doktorant zamieścił nie tylko podsumowanie uzyskanych wyników, ale i wysnuwa na ich podstawie interesujące i ważkie wnioski. Za najważniejsze z nich (swoiste przesłanie tej pracy) uważam wskazanie na istnienie bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją Cx43 i Snail-1 a inwazyjnością w komórkach linii wyprowadzonych z nowotworów o

różnej etiopatogenezie i obrazie klinicznym oraz wykazanie podobieństwa w mikroewolucji różnych typów nowotworów, a także sugestia zastosowania oceny poziomu Snail-1 jako potencjalnego markera złośliwości glejaków, co może mieć olbrzymie znaczenie w diagnostyce i terapii nowotworów. Jak sam Doktorant zaznacza, zagadnienia te nie były dotychczas dogłębnie badane, a więc wyniki przez niego uzyskane otwierają nowe horyzonty badawcze.

**Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca jest zredagowana w sposób bardzo staranny, napisana zrozumiale poprawną polszczyzną, co jest trudne w czasach, gdy język angielski zdominował nauki przyrodnicze i w większości polskojęzycznych tekstów naukowych aż roi się od anglicyzmów. W zasadzie nie znalazłam literówek, co dodatkowo wskazuje na niesłychaną staranność Doktoranta i jego dbałość o stronę edytorską rozprawy. To niemal niespotykane w dzisiejszych czasach.

**Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pana mgr. Damiana Ryszawego ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę o biologii nowotworów, a zwłaszcza o mechanizmach stanowiących o ich inwazyjności i różnorodności. Wyjątkowo obszerny materiał doświadczalny, niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej. Doktorant wykazał się umiejętnością nie tylko zdefiniowania ważkiego problemu badawczego, ale i jego rozwiązania. Wykazał się także znajomością rozległego piśmiennictwa w dziedzinie swoich zainteresowań oraz zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. W mojej ocenie uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią zaczyn do dalszych badań, zaś wyciągnięte przezeń wnioski oraz wysnute hipotezy są w pełni uzasadnione. Chciałabym podkreślić, że przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy. Na uwagę zasługuje fakt, że znaczna część wyników Doktoranta została już przedstawiona w dwóch artykułach opublikowanych w renomowanych czasopismach; na szczególną uwagę zasługuje zwłaszcza artykuł, w którym doktorant jest pierwszym autorem i który ukazał się w *Carcinogenesis*, czasopiśmie z 5-letnim IF ok. 6. Mniemam, że kolejna praca (prace?) zostanie wkrótce przygotowana do druku. Doktorant jest również współautorem dwóch innych publikacji nie związanych bezpośrednio z tematem rozprawy doktorskiej.

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Ryszawego do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej możliwe implikacje praktyczne, z całym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla Rady Wydziału nagrodą.