15.04.2015 [illegible]

Uniwersytet Łódzki

Prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
Katedra Cytobiochemii

Łódź, 14 kwietnia 2015 r.

OCENA

pracy doktorskiej mgr Mateusza Banaszczyka

pt. *Senescencja jest główną przyczyną niemożności stabilizacji linii komórkowych glejaka wielopostaciowego, raka stercza, raka gruczołu mlekowego i raka jelita grubego*

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Mateusza Banaszczyka przygotowana została pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Rieske i dr n. med. Sylwestra Piaskowskiego, a wykonana w Zakładzie Biologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Tematyka pracy wpisuje się w nurt poszukiwań optymalnych modeli badawczych *in vitro*, mających zastosowanie w badaniach biologii komórek nowotworowych oraz identyfikacji nowych związków przeciwnowotworowych i strategii terapeutycznych chorób nowotworowych. W badaniach tych najpowszechniej stosowanym modelem badawczym są linie komórkowe, chociaż jak wynika z danych literaturowych komórki nowotworowe pochodzące od pacjentów i odpowiadające im linie komórkowe hodowane *in vitro* często różnią się genetycznie. Dodatkowo sprawę komplikuje heterogenność komórek w obrębie samego nowotworu i fakt, że komórki guza pierwotnego i komórki metastatyczne również reprezentują sobą genetycznie zróżnicowane klony komórek, co ma szczególne znaczenie dla efektywności terapii. Badania realizowane pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Rieske dotyczą między innymi opracowania procedury pozwalającej na otrzymanie stabilnej linii komórek glejaka wielopostaciowego z genotypem jak najbardziej zbliżonym do komórek nowotworowych występujących *in vivo*. W przypadku glejaka wielopostaciowego nie

został dotychczas opracowany odpowiedni model badawczy. Nawet w przypadku hodowli trójwymiarowej w sferoidach obserwuje się zmniejszoną zdolność komórek do proliferacji *in vitro*.

Przedstawiona do oceny praca doktorska podejmuje trudne wyzwanie jakim jest poszukiwanie mechanizmów uniemożliwiających stabilizację *in vitro* linii komórkowych, a w szczególności glejaka wielopostaciowego.

Praca licząca 153 strony ma układ typowy dla rozpraw doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych. Rozpoczyna ją *Wstęp*, w którym zawarto ogólne informacje dotyczące hodowli komórek nowotworowych *in vitro* oraz transformacji nowotworowej i zaburzeń procesów biologicznych w komórkach nowotworowych. W kolejnych rozdziałach przedstawiono podstawowe dane odnośnie do glejaka wielopostaciowego, raka prostaty, piersi i jelita grubego. Wstęp zawiera także informację o komórkach mikrogleju i perycytach i ich potencjalnej roli w stabilizacji linii komórkowych glejaka wielopostaciowego oraz o zjawisku senescencji. Tak szerokie spektrum zagadnień przedstawionych we *Wstępie* stanowi bardzo dobre wprowadzenie do badań podjętych przez doktoranta i przejrzyście zarysowuje problemy badawcze podjęte w części eksperymentalnej. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na nieścisłe sformułowania, które pojawiły się w tej części pracy. W badaniach skupiono się chyba na komórkach czterech typów nowotworów, a nie jak napisano na str. 14 „... na czterech typach komórek nowotworowych ...". Przecież jak sam autor pisze w wielu miejscach, materiał nowotworowy zawiera subpopulacje komórek różniących się fenotypowo i genotypowo, o różnym potencjale metastatycznym. Angiogeneza nie jest procesem, w którym powstają nowe naczynia krwionośne (str. 23). Powstawanie nowych naczyń krwionośnych to waskulogeneza, a angiogeneza to rozrost istniejących naczyń krwionośnych. Poza tym nie wszystkie komórki mezenchymalne są cytokeratyno-negatywne (str. 24), czego przykładem są niektóre komórki mięśni gładkich, w tym *myometrium* czy *myocardium*. Określenia rak jelita grubego i rak okrężnicy czy rak odbytnicy nie są synonimami (str. 35). Na str. 20 autor rozwija skrót hTERT jako podjednostka katalityczna ludzkiej telomerazy odwrotnej transkryptazy zamiast ludzkiej telomerazowej odwrotnnej transkryptazy, a na str. 46 skrót HDAC1 jako histony deacetylazy zamiast deacetylaza histonów. Białko RB oddziałuje nie z histonami , ale deacetylazą. W mojej opinii rozdziały 1.6 *Stabilizacja hodowli komórkowej* i 1.8 *Kokultury komórek,* dla czytelności

przedstawionych informacji powinny znaleźć się w części dotyczącej hodowli komórkowych *in vitro* czyli obejmującej rozdziały 1.1 i 1.2.

Część eksperymentalna pracy jest prawidłowo opisana i zilustrowana. Rozdział *Metody* zawiera właściwy opis podejść metodycznych i pokazuje, że zrealizowano budzący uznanie rozległy zakres badań, za pomocą analiz bioinformatycznych oraz technik laboratoryjnych stosowanych w biologii komórki i biologii molekularnej, w tym wykorzystujących metody immunoenzymatyczne i immunofluorescencyjne. Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym z 42 glejaków wielopostaciowych, 10 raków prostaty, 5 raków piersi i 5 raków jelita grubego, z którego wyprowadzano hodowle pierwotne. Materiał kontrolny stanowiły komercyjnie dostępne linie komórkowe oraz krew jak się można domyślić od pacjentów, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej, a nie jak podano na stronie 56 „... od zdrowych pacjentów...". Wyniki badań zaprezentowano w formie 30 złożonych rycin i zdjęć mikroskopowych oraz 10 zestawień tabelarycznych. Do pracy załączono również płytę CD zawierającą zdjęcia i film dokumentujące wyniki. Utrudnienie w analizie wyników sprawia błąd numeracji rycin i odwołań do nich w tekście. Ryciny o numerach 5 i 6 pojawiają się dwukrotnie (str. 69, 71, 77). Poza tym podpis ryciny 1 znajdującej się na str. 64 jest zbyt mało informatywny, tym bardziej, że odniesienie do ryciny 1 znajduje się znacznie wcześniej, tj. na stronie 52.

Z założonych hodowli pierwotnych 42 glejaków wielopostaciowych, 10 raków stercza (str. 48 i 62 – 10 przypadków, str. 88 – 9 przypadków), 5 raków piersi i 5 raków jelita grubego w warunkach hodowli *in vitro* ustabilizowało się spontanicznie tylko 6 linii komórek glejaka wielopostaciowego. Analiza wielu tysięcy genów i produktów ich składania techniką mikromacierzy mRNA wykazała istnienie zasadniczych zmian w procesach biologicznych pomiędzy populacjami komórek *in vivo* i *in vitro*. Chociaż udało się wytypować geny o odmiennej ekspresji w komórkach linii ustabilizowanych, co zweryfikowano testem Real-time PCR, to jednak heterogenność materiału do badań nie pozwoliła na podstawie poziomu ekspresji na wyróżnienie genów odpowiedzialnych za stabilizację. W dalszej części pracy skupiono się na mutacjach genów w komórkach charakteryzujących się różnym potencjałem proliferacyjnym. Przeprowadzono bioinformatyczną analizę częstości mutacji wybranych genów w komórkach nowotworowych *in vivo* i w odpowiadających im ustabilizowanych liniach komórkowych. Zidentyfikowano statystycznie istotne różnice w przypadku amplifikacji genów *EGFR* i *PDGFRA*, delecji *CDKN2A* i mutacji

punktowych *TP53* i *PTEN* oraz zmian wielogenowych, tj. delecji *CDKN2A* łącznie z mutacją *TP53*, amplifikacją *EGFR*, albo mutacją *PTEN* oraz *PTEN* i *PIK3CA*. Analiza komórek, które nie dały się ustabilizować i komórek wczesnych i późnych pasaży linii komórkowych z zastosowaniem odmian techniki PCR, tj. MLPA i Real-time PCR oraz sekwencjonowanie wykazała statystycznie istotne różnice dotyczące delecji *CDKN2A* i mutacji *TP53* w badanych grupach. Uzyskane wyniki sugerowały, że zablokowanie cyklu komórkowego i w konsekwencji senescencja odpowiedzialne są za niemożność stabilizacji hodowli komórek pierwotnych, co potwierdzono stosując analizę inkorporacji znakowanej bromem deoksyurydyny, enzymocytochemiczny test aktywności β-galaktozydazy w pH 6 (powinno być Dimri i wsp., 1995 (143), a nie Dimitri i wsp. jak podano na str. 58), wykrywanie ognisk heterochromatyny uznawanych za markery senescencji oraz podwójne bądź potrójne znakowanie immunofluoroscencyjne. Podkreślić należy, że w pracy zastosowano nowatorską metodę kombinacji enzymocytochemii, immunocytochemii i inkorporacji znakowanej bromem deoksyurydyny. Udowodniono, że ustanie podziałów komórkowych nie jest zjawiskiem przejściowym, ale efektem senescencji, a komórki senescentne nie pochodzą z materiału otrzymanego od pacjentów. W kolejnych pasażach komórek linii pierwotnych, których nie udało się ustabilizować liczba komórek senescentych wzrastała, czego nie obserwowano w przypadku hodowli komórek prawidłowych czy linii ustabilizowanych.

Rzeczowa i obszerna dyskusja, którą kończy podsumowanie i wnioski potwierdzają właściwą interpretację wyników własnych, znajomości literatury przedmiotu. W pracy udowodniono, że mechanizmem odpowiedzialnym za brak zdolności komórek glejaka wielopostaciowego do proliferacji podczas hodowli *in vitro* jest senescencja. Mechanizm ten wydaje się mieć charakter uniwersalny, co potwierdzono na przykładzie komórek raka prostaty, piersi i jelita grubego.

Uzyskane nowatorskie wyniki mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale co należy szczególnie podkreślić potencjalnie aplikacyjne. Wskazują bowiem na indukowanie senescencji jako strategii terapeutycznej w przypadku nowotworów złośliwych, szczególnie, że jak wykazano w pracy komórki nowotworowe łatwiej ulegają senescencji niż komórki prawidłowe.

W kontekście przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników nasuwają się pytania o mechanizmy odpowiedzialne za występowanie lub brak senescencji podczas wyprowadzania linii komórkowych *in vitro*.

- Czy przyczyną senescencji *in vitro,* mimo braku pozytywnych wyników badań własnych dotyczących hodowli kokultur, nie jest brak oddziaływania z komórkami niszy, w której rozwija się nowotwór? Funkcjonowanie komórek, tkanek organizmu regulowane jest autokrynnie, parakrynnie i endokrynnie, a interakcje szlaków sygnalizacyjnych są zjawiskiem udokumentowanym.
- Jeśli tak to jakie mechanizmy leżą u podstaw braku senescencji w ustabilizowanych liniach komórkowych? Jak można wyjaśnić fenomen np. komórek HeLa, które pobrane zostały od Henrietty Lacks, bez Jej zgody, w 1951 roku i stały się jednym z najważniejszych narzędzi współczesnej medycyny?
- Czy może brak możliwości stabilizacji linii komórkowej *in vitro* wynika z klonalnego zróżnicowania komórek nowotworowych *in vivo*, podczas gdy materiał pobrany od pacjenta obejmuje jedynie niewielki obszar guza?

Oceniając formalną stronę pracy stwierdzam, że układ pracy jest przejrzysty, a proporcje poszczególnych części właściwe. Praca została przygotowana z dużą starannością, szczególnie o stronę graficzną, co w przypadku obrazów mikroskopowych ma duże znaczenie. Piśmiennictwo liczy ponad 200 właściwie dobranych pozycji literaturowych, w którym uwzględniono prace opublikowane w ostatnich latach. Rozprawa zawiera streszczenie nie tylko w języku polskim, ale zgodnie z obecnymi wymaganiami, również w języku angielskim. To pozytywne wrażenie osłabiają:

- pomijanie znaków interpunkcyjnych (na ogół brak przecinków przed *a, ale,* czy *jaki*),
- zapożyczania z języka angielskiego (tranzycja zamiast przejście; alteracja zamiast zmiana)
- stosowanie określenia ilość zamiast liczba (np. tab. 9 i 11)
- brak ujednolicenia stosowanej terminologii (nowotwór gruczołu mlekowego/gruczołu sutkowego/sutka str. 34; godziny/h str. 58,59).

W wykazie skrótów stosowanych w pracy znalazły się niezbyt właściwe, niejednoznacznie rozwinięcia, np. BRIP1 – helikazowe C-terminalne białko wchodzące w interakcję z białkiem BRCA1, RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy odwrotnej transkryptazy, SMAD – białko, które transdukuje sygnały

zewnątrzkomórkowe z transformującym czynnikiem wzrostu nowotworu, TMPRSS2 – proteza transbłonowa seryny. Przy genach kodujących enzymy, takie jak *BRAF, HDAC1* nie ma potrzeby podawania, że kodują one białko enzymu, bowiem może to implikować, że te enzymy mają naturę nie tylko białkową. bFGF to zasadowy a nie podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, *Rb* to gen, którego delecję zidentyfikowano w siatkówczaku, ale jego mutacje nie ograniczają się do siatkówczaka, a CDKN1A koduje inhibitor cyklinozależnej kinazy 2, ale także 4 i 1.

Podsumowanie

Praca doktorska mgr Mateusza Banaszczyka, której tytuł *Senescencja jest główną przyczyną niemożności stabilizacji linii komórkowych glejaka wielopostaciowego, raka sfercza, raka gruczołu mlekowego i raka jelita grubego* jest zasadniczym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań, wnosi nowe, oryginalne dane dotyczące pierwotnych linii komórkowych. Uzyskane wyniki mają nowatorski charakter, są znaczące poznawczo i co ważne inspirują do stawiania kolejnych wyzwań badawczych. O wartości poznawczej uzyskanych w pracy wyników świadczy fakt ich opublikowania w prestiżowych indeksowanych czasopismach. Mgr M. Banaszczyk jest współautorem 9 prac oryginalnych, z których sześć zawiera wyniki związane z problematyką badań przedstawionych w pracy doktorskiej. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Mateusza Banaszczyka spełnia wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 22 grudnia 2014, poz. 1852, tekst jednolity). Z pełnym przekonaniem wnioskuję zatem do Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Mateusza Banaszczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.