



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Łódź 16 kwietnia 2019 r.

Prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska  
Katedra Cytobiochemii UŁ

### Ocena

**pracy doktorskiej mgr Kamili Rosiak**

**pt. Wyjaśnienie niektórych aspektów biologicznej roli *EGFR*<sup>VIII</sup> i *IDH1*<sup>R132H</sup>  
w glejakiach wielopostaciowych**

Praca doktorska mgr Kamili Rosiak wykonana została w Zakładzie Biologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Rieske i dr Wojciecha Steca jako promotora pomocniczego. Stanowi ją spójny tematycznie cykl trzech współautorskich prac oryginalnych opublikowanych w latach 2016-2018, z których dwie ukazały się w *Oncotarget* w 2016 i 2018 roku (IF 2016 5,168; pkt. MNiSW 40), a jedna w *PLoS One* w 2016 roku (IF 2,806; pkt. MNiSW 40). Abstrahując od toczącej się dyskusji dotyczącej usunięcia czasopisma *Oncotarget* z listy *Web of Science* wszystkie prace składające się na rozprawę doktorską opublikowane zostały w uznanych, międzynarodowych czasopismach, znajdujących się w wykazie czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, o łącznej liczbie punktów 120. Mgr Kamila Rosiak jest pierwszym autorem, drugim o wkładzie równym z pierwszym autorem lub drugim autorem prezentowanych prac. Niepodważalny udział mgr Kamili Rosiak w powstaniu tych prac potwierdza zarówno Jej wiodąca pozycja wśród autorów, jak również oświadczenia współautorów. W przypadku wszystkich trzech prac mgr K. Rosiak uczestniczyła w przeprowadzeniu eksperymentów, analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu, a w przypadku jednej z nich była również autorem koncepcji i planu badań. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską opatrzone zostały 1) 13-stronicowym wprowadzeniem zawierającym podstawowe dane odnośnie do: klasyfikacji glejaków o naciekającym charakterze wzrostu, funkcji biologicznej i znaczenia w patogenezie glejaków mutacji genu dehydrogenazy izocytrynianowej (*IDH*) oraz receptora czynnika wzrostu naskórka (*EGFR*),

a także strategii terapeutycznych oraz modeli badawczych glejaka wielopostaciowego, 2) omówieniem każdego z trzech artykułów stanowiących rozprawę doktorską, 3) podsumowaniem przeprowadzonych badań. W materiałach zawarte zostały również wyjaśnienia stosowanych skrótów, dane bibliograficzne 190 pozycji literaturowych oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Załączone są również oświadczenia współautorów, a także zgody odpowiednich Komisji Bioetycznych zezwalających na wykorzystanie do badań materiału pobranego od pacjentów oraz przeprowadzenie badań na zwierzętach.

Celem przedstawionych w pracy doktorskiej mgr Kamili Rosiak badań, wpisujących się w wieloletnie zainteresowania naukowe promotora pracy prof. Piotra Rieske, było opracowanie modeli badawczych pozwalających na ocenę roli biologicznej w glejakach wielopostaciowych zmutowanej formy receptora czynnika wzrostu naskórka EGFRvIII oraz izomerazy izocytrynianowej IDH1 p.R132H, z podstawioną w pozycji 132 w miejsce argininy resztą histydyny, a także wyjaśnienie/przybliżenie mechanizmów molekularnych ich działania.

Glejaki należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów pierwotnych mózgu u dorosłych. Ich ogromna niejednorodność, nie tylko w obrębie nowotworów pochodzenia glejowego, ale także w obrębie komórek samego guza przekłada się na niską skuteczność leczenia. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi WHO w diagnostyce glejaków o naciekającym charakterze wzrostu za kluczowy uznaje się status molekularny dehydrogenazy izocytrynianowej cytozolowej (IDH1). Glejaki wielopostaciowe (WHO IV) ze zmutowanym *IDH* powstają w wyniku progresji guzów II i III stopnia złośliwości, podczas gdy w 90 - 95% guzów rozwijających się *de novo IDH* jest typu prawidłowego. Substytucja pojedynczego nukleotydu w genie *IDH1* (c. 395G>A) zmieniająca kodon Arg w kodon His w pozycji 132 białka, prowadzi nie tylko do zmniejszenia lub braku aktywności katalitycznej enzymu. Zmutowany *IDH* wykorzystując zredukowany  $\text{NADP}^+$  przekształca  $\alpha$ -ketaglutaran do 2-hydroksyglutaranu, który kompetycyjnie hamuje dioksygenazy zależne od  $\alpha$ -ketaglutaranu, co w największym skrócie prowadzi do zaburzenia mechanizmów epigenetycznych, a także regulacji ekspresji genów odgrywających rolę w progresji nowotworu, zależnej od czynnika indukowanego hipoksją HIF-1.

Drugi z wybranych genów to gen *EGFR* kodujący receptor czynnika wzrostu naskórka, którego amplifikację stwierdza się w około 40% glejaków, w połowie których, w wyniku delecji eksonów 2-7 (EGFRvIII), ekspresji ulega wariant pozbawiony domeny zewnątrzkomórkowej co prowadzi do konstytutywnej aktywności receptora i nieprawidłowości w funkcjonowaniu wielu szlaków sygnałowych oraz ekspresji docelowych genów.

Badania zostały szczegółowo opisane w pracach oryginalnych składających się na rozprawę doktorską, zarówno pod względem stosowanego szerokiego spektrum nowoczesnych podejść metodycznych, jak i prezentacji oraz merytorycznej i twórczej dyskusji uzyskanych wyników. Prace te nie budzą żadnych zastrzeżeń, tym bardziej, że podlegały one już merytorycznej ocenie przez specjalistów, tj. recenzentów i wydawców renomowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym. Dwa z opublikowanych artykułów stanowiących rozprawę doktorską (*Oncotarget* 2016, 2018) dotyczą opracowania modelu badawczego pozwalającego na ocenę znaczenia mutacji *EGFRvIII*. W wyniku selekcji klonalnej ze stabilnej linii komórkowej glejaka DK-MG, wykazującej heterogenność pod względem endogennej ekspresji EGFR, wyodrębniono i ustabilizowano dwie sublinie glejaka wielopostaciowego z obecnością EGFRvIII, różniące się odsetkiem (50% i 5%) komórek wykazujących ekspresję zmutowanego genu. Niemożność uzyskania linii całkowicie pozbawionej amplikonów *EGFRvIII* wskazuje na jego istotną funkcję biologiczną. Stosując techniki badawcze *in vitro* i *in vivo* udowodniono wpływ EGFRvIII na wzrost inwazyjności i liczebności populacji komórek. Zwiększenie przeżywalności populacji komórek o wysokim odsetku komórek wykazujących ekspresję zmutowanego genu korelowało z poziomem aktywności szlaku NFκB, pozostając bez wpływu na szlak PI3K/AKT. Analiza 408 genów związanych z nowotworami wykazała brak zasadniczych różnic w profilach genetycznych linii z wysoką i niską ekspresją zmutowanego genu, potwierdzając tym samym znacznie EGFRvIII dla obserwowanych efektów biologicznych.

Poszukując odpowiedzi na pytanie o mechanizm aktywacji i regulacji EGFRvIII wykazano brak oddziaływania pomiędzy prawidłową i zmutowaną formą EGFR, nie potwierdzając tym samym istniejących w tym zakresie doniesień literaturowych. Ujawniono również zdolność EGFRvIII do dimeryzacji w sposób niezależny od tworzenia wiązań disiarczkowych przez resztę Cys w pozycji 16. Defosforylacja w homodimerze receptora wydaje się być regulowana przez jedną bądź różne fosfatazy tyrozynowe, a zmutowany receptor odznacza się zwiększoną stabilnością i w konsekwencji zwiększonym potencjałem onkogennym.

Wyniki zaprezentowane w pracy opublikowanej w *Oncotarget* w 2016 roku wskazują również na ograniczenia innych modeli badawczych, w kontekście badania efektów biologicznych EGFRvIII, w tym wynikające z niemożności stabilizacji komórek linii pierwotnych z amplikonami *EGFRvIII* czy w przypadku modeli uzyskanych metodami inżynierii genetycznej, braku korelacji między poziomem mRNA i białka oraz losowego charakteru efektów biologicznych.

Praca opublikowana w 2016 roku w *PLoS One* dotyczy natomiast opracowania modelu badawczego pozwalającego na badania roli *IDH1* p. R132H w glejakach. Opisany w pracy

model stanowi pierwsze doniesienie o zastosowaniu ludzkich neuralnych komórek macierzystych do badań nad wpływem IDH1 p.R132H na rozwój glejaków. Sukcesem autorów pracy jest ustabilizowanie w wyniku transdukcji i selekcji ludzkich indukowanych neuralnych komórek macierzystych, wykazujących konstytutywną ekspresję prawidłowego lub zmutowanego genu *IDH1*. Indukowane neuralne komórki macierzyste otrzymano metodą pośrednią na drodze różnicowania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych poprzez hodowlę w postaci kul zarodkowych. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem tego modelu wskazują na istnienie zależności między ekspresją IDH1 p.R132H, a zmniejszeniem zdolności do różnicowania neuronalnego i astrocytarnego, ocenianego na podstawie cech morfologicznych i ekspresji specyficznych markerów, oraz zwiększeniem podatności na apoptozę.

Odnosząc się do badań dotyczących EGFRvIII nasuwają się następujące pytania:

- co może być przyczyną odmiennych wyników uzyskanych w pracy w kontekście danych literaturowych, a dotyczących oddziaływań pomiędzy prawidłową i zmutowaną formą EGFR,
- jak z molekularnego punktu widzenia, w świetle uzyskanych wyników badań własnych i danych literaturowych, można wyjaśnić udział zmutowanej formy EGFR w procesach odpowiedzialnych za żywotność komórek i prowadzących do apoptozy.

Prosiłabym również o:

- przybliżenie roli biologicznej w komórce dehydrogenazy izocytrynianowej zależnej od NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>, a także
- wskazanie kierunków dalszych badań z wykorzystaniem opracowanych modeli badawczych.

#### Podsumowanie i wniosek końcowy

Pracę doktorską mgr Kamili Rosiak pt. „Wyjaśnienie niektórych aspektów biologicznych roli EGFRvIII i IDH1<sup>R132H</sup> w glejakach wielopostaciowych” oceniam w pełni pozytywnie. Uzyskane i prezentowane w opublikowanych pracach wyniki mają niepodważalną wartość poznawczą i użytkową w zakresie patogenezy i biologii glejaków. Opracowano unikatowe modele badawcze jakimi są stabilne linie glejaka wielopostaciowego o różnym odsetku komórek pozytywnych w kontekście EGFRvIII, a także ludzkie indukowane neuronalne komórki macierzyste z egzogenną ekspresją IDH1 p.R132H, będące przedmiotem zgłoszenia patentowego, którego pierwszym autorem jest doktorantka. Przybliżono nie tylko mechanizmy molekularne działania EGFRvIII oraz biologicznej roli IDH1 p.R132H, ale także wskazano potencjalne cele dla nowych strategii terapeutycznych. Profilowanie molekularne *IDH* wydaje się mieć szczególną wartość predykcyjną. O ile stopień złośliwości glejaków może ulec

progresji w czasie trwania choroby, o tyle status *IDH* pozostaje niezmienny. Z uznaniem odnoszę się do formy przedstawionej przez mgr Kamili Rosiak pracy doktorskiej, którą stanowią opublikowane wieloautorskie artykuły. Doktorantka potwierdziła w ten sposób swoją wiedzę w zakresie realizowanej problematyki badawczej i znajomość literatury przedmiotu oraz udział w dokonaniach naukowych. W przedstawionym opracowaniu w mojej opinii zabrakło jedynie wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, bowiem rozdział zatytułowany „Wnioski końcowe” jest *de facto* podsumowaniem uzyskanych wyników. Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr Kamili Rosiak spełnia wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. nr. 65, poz. 595 z póź. zm.; Dz. U. z 21 czerwca 2016, poz. 882, tekst jednolity). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kamili Rosiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę oryginalność uzyskanych wyników, które opublikowane zostały w uznanych międzynarodowych czasopiśmie i ich znaczącą wartość poznawczą i aplikacyjną, wnoszę o uznanie pracy jako wyróżniającej.



