



Gliwice, 15 września 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pani Magdaleny Machowskiej pt. „Analiza skuteczności wybranych strategii terapii genowych – wpływ jądrowo ukierunkowanej maspiny na komórki nowotworu piersi oraz przygotowanie nośnika dla leku genetycznego”.

Pani Magdalena Machowska podjęła się w swojej pracy doktorskiej opracowania strategii leczenia nowotworu piersi opartej na terapii genowej z zastosowaniem odpowiedniego nośnika dla leku genetycznego. Badania były prowadzone w związku z realizacją szerszego projektu, którego celem było przygotowanie celowanej terapii skojarzonej składającej się z elementów terapii genowej oraz chemioterapii liposomowej.

Mimo, że sama idea terapii genowej nie jest nowa (liczy sobie ponad 40 lat), doczekała się zaledwie kilku zatwierdzonych zastosowań w praktyce lekarskiej i nadal w dużej mierze jest techniką eksperymentalną. W przypadku terapii nowotworów wyzwaniem jest nie tylko wybór odpowiedniej, skutecznej sekwencji leku genetycznego, ale również opracowanie wydajnej metody dostarczania leku w sposób umożliwiający swoiste „unieszkodliwienie” komórek nowotworowych, bez wywołania drastycznych skutków ubocznych. Praca Pani Magdaleny wpisuje się w ten nurt badań. Przy wyborze sekwencji leku zastosowano dwie strategie: wyciszenia onkogeny oraz nadprodukcji białka supresorowego (na podstawie analizy danych literaturowych wybrano odpowiednio geny kodujące białka HER2 oraz p53). W oparciu o własne wcześniejsze badania włączono do niniejszego projektu również maspinę (serpina b5). Natomiast jako nośniki leku genetycznego testowano liposomy, lentiwirusy oraz adenowirusy.

Rozprawa doktorska ma typowy układ. W relatywnie krótkim Wstępie Doktorantka przedstawiła w przystępny sposób podstawowe informacje na temat nowotworów (ich klasyfikacji, mechanizmów rozwoju, epidemiologii), przechodząc do charakterystyki nowotworów piersi, jako że komórki wywodzące się z nabłonka gruczołu piersiowego zostały wybrane jako model badawczy do przeprowadzenia eksperymentów. Przedstawiając metody

leczenia nowotworu piersi Doktorantka ocenia również skuteczność stosowanych terapii. Kolejną część Wstępu stanowi charakterystyka terapii genowych: rys historyczny, strategię, zastosowanie (w szczególności w leczeniu nowotworów), zalety i wady. Typy nośników wykorzystywanych w terapii genowej opisano w ostatnich rozdziałach Wstępu. Pomiędzy rozdziałami dotyczącymi terapii genowej znajdują się rozdziały opisujące białka HER2, p53 oraz maspinę. Mimo, że kolejność rozdziałów nie jest optymalna, zawarto w nich wszystkie kluczowe informacje związane z tematem pracy. Są to w większości dane niemal podręcznikowe. Wiedza na temat maspiny nie jest jednak tak ugruntowana jak na temat HER2, czy p53 i Doktorantka podjęła się jej syntezy oraz interpretacji niejednokrotnie sprzecznych danych (choćby na temat udziału maspiny w procesie embriogenezy). Moje drobne zastrzeżenia do tej części pracy dotyczą kilku niezręcznych sformułowań użytych przez Doktorantkę, np.:

Str. 30: „HER2 nie wiąże żadnych ligandów” (raczej: nie zostały dotychczas zidentyfikowane żadne naturalne ligandy HER2);

Str. 33: „Najwięcej mutacji, około 80%, jest stwierdzanych w domenie odpowiedzialnej za specyficzne wiązanie sekwencji DNA (DBD), co wskazuje, że aktywność czynnika transkrypcyjnego jest jedną z najistotniejszych funkcji tego białka.” (może to raczej wskazywać, że mutacje poza domeną DBD są najistotniejsze dla funkcji białka – skoro nie są wykrywane, muszą być letalne);

Str. 34-35: „Ekspresja genu maspiny regulowana jest na kilku drogach: metylacji wysp CpG w promotorze, acetylacji histonów przez czynniki transkrypcyjne takie jak p53, AP1 oraz Ets1” (wymienione czynniki transkrypcyjne nie mają aktywności acetylaz, choć być może w zdaniu zabrakło przecinka);

str. 35: „W przypadku aktywności maspiny w nowotworach, zostało stwierdzone jej działanie proapoptotyczne, antyproliferacyjne, antyangiogenne oraz antymetastatyczne, przez co białko to wpływa na ruchliwość, przeżywalność oraz inwazyjność komórek nowotworowych” (bez komentarza).

W rozdziale Materiały i metody zawarto wszystkie niezbędne informacje na temat stosowanych odczynników i procedur oraz opisano strategię klonowania wektorów wykorzystanych w pracy. Doktorantka wykazała się znajomością szerokiego panelu metod stosowanych w biologii molekularnej (m.in. klonowanie DNA, mutageneza ukierunkowana, PCR, hodowle komórek eukariotycznych, przygotowanie liposomów, wektorów lentiwirusowych i adenowirusowych, transfekcje i transdukcje, testy funkcjonalne i praca z cytometrem, immunoprecypitacja, Western blotting, immunofluorescencja, analizy mikroskopowe i statystyczne, eksperymenty *in vivo* na myszach). Drobne uwagi/komentarze/pytania do tej części pracy:

1. We wszystkich klonowaniach wstawkę namnażano za pomocą PCR wprowadzając odpowiednie miejsca restrykcyjne do starterów jeżeli było to konieczne. Zaskakujące jest, że strategię taką stosowano również wtedy kiedy miejsca restrykcyjne wektora i wstawki były kompatybilne (str. 61).
2. Przy klonowaniu maspiny z EGFP do wektora pCDH (str. 62) nie jest jasne, czy wstawiono również metkę FLAG (nie ma takiej informacji w opisie, natomiast sekwencja metki znajduje się w starterze wstecznym).
3. Szczegółowo opisano strategię przygotowania konstruktów do wyciszania ekspresji. W tabeli podano sekwencje zaprojektowanych fragmentów DNA (nie podając, że chodzi o ERBB2). Choć w wynikach znalazły się szczegółowe informacje w jakich wariantach transkrypcyjnych znajdują się wybrane sekwencje, interesująca byłaby również bardziej ogólna informacja, czy wypadają one w sekwencji kodującej czy niekodującej transkryptu.
4. Przy opisie mutagenезы ukierunkowanej (str. 68) przydatna byłaby informacja gdzie wstawiono sygnał lokalizacji jądrowej do sekwencji kodującej EGFP.
5. Czy obserwowano wygaszanie fluorescencji EGFP i narastanie autofluorescencji w czasie w preparatach utrwalanych 4% paraformaldehydem?

Najobszerniejszą część pracy stanowi opis uzyskanych wyników, przedstawiony w sposób logiczny i zrozumiały, bez zbędnych szczegółów. Doktorantka miała jasno sprecyzowany cel i konsekwentnie go realizowała, w razie potrzeby modyfikując dalsze etapy pracy. Każdy z podrozdziałów zakończony jest krótkim podsumowaniem i wnioskami. Ponieważ praca jest oparta na wprowadzaniu obcego DNA do komórek, w większości testowanych wektorów wykorzystano sekwencję EGFP do monitorowania wydajności transfekcji/transdukcji, bądź jako białko fuzyjne, bądź też kodowane niezależnie. Zastosowanie takiej strategii i przetestowanie różnych wariantów (z dbałością o odpowiednie kontrole) uważam za mocną stronę pracy. Interesująca jest obserwacja tzw. „mozaikowej” ekspresji w przypadku wprowadzania do komórek jednego wektora kodującego niezależnie dwa białka. Zgodnie z założeniami pracy, Doktorantka w pierwszej kolejności podjęła się wyciszenia ekspresji onkogenu ERBB2/HER2 za pomocą swoistych sekwencji kodujących shRNA. Doświadczenia te były bardzo pracochłonne, nie przyniosły jednak pożądanych efektów, tzn. zahamowania proliferacji komórek nowotworu piersi. Nie zaobserwowano również wpływu wyciszenia ekspresji *ERBB2* na toksyczność doksorubicyny lub docetakselu. W rezultacie Doktorantka zarzuciła dalsze badania z powyższymi wektorami jako nierokujące i skupiła się na zbadaniu wpływu nadekspresji genu supresorowego *TP53* oraz zlokalizowanej jądrowo maspiny na przeżywalność komórek nowotworu piersi. Doktorantka skonstruowała i przetestowała szereg konstruktów oceniając ich wpływ na tempo proliferacji komórek na podstawie barwienia białka Ki-67, co nie należy do metod najprostszych, jest to jednak optymalne rozwiązanie przy transfekcjach przejściowych o różnej wydajności (choć przy wysokiej wydajności transdukcji

adenowirusami mogłaby być również użyta inna metoda, np. wykorzystany wcześniej w pracy test proliferacji komórek z zastosowaniem Sulforodaminy B).

Badania maspiny wnoszą element nowości do pracy. Bardzo interesująca jest obserwacja, że zlokalizowana jądrowo maspina hamuje proliferację jedynie komórek nowotworowych nabłonka piersiowego. Ponieważ nie wywiera ona negatywnego wpływu na komórki prawidłowe gruczołu piersiowego, nie było konieczne planowane początkowo testowanie dodatkowych elementów mających zapewnić swoistość terapii, co byłoby konieczne w przypadku p53. Ostatecznie to maspina wyposażona w sygnał lokalizacji jądrowej oraz nośnik adenowirusowy, jako najbardziej obiecujące, zostały wybrane do testów *in vivo* w modelu mysim, które z uwagi na niewielki zakres nie przyniosły jednoznacznych wyników. Natomiast zastanawiający jest brak skuteczności terapii na bazie nośnika lentiwirusowego w prowadzonych badaniach.

Dodatkowy element pracy stanowią eksperymenty mające na celu wyjaśnienie mechanizmu działania maspiny w jądrze komórkowym. Jak sama Autorka pracy to ujęła – była to jedynie próba zbadania mechanizmu działania maspiny (Rozdz. 6.7), a badania te wymagają kontynuacji. Stosując koimmunoprecypitację wykazano w komórkach MCF7 oddziaływanie białka fuzyjnego maspina-NSL-EGFP z deacetylazą histonów HDAC1 (która została wybrana po analizie danych literaturowych; w rozdz. 6.7.2 nie podano jednak odnośnika do odpowiedniej pozycji w literaturze). Podobna analiza powinna być również wykonana w nienowotworowej linii MCF10A, co zresztą jest rozważane przez Doktorantkę w rozdz. 7.2.2 Dyskusji.

Doktorantka przyjęła interesującą strategię opisu rycin podając interpretację wyników (czasem kosztem innych informacji, które powinny się tu znaleźć, choć na ogół ryciny są zrozumiałe i jednoznaczne). Mocną stroną pracy są zdjęcia mikroskopowe, słabszą – sposób prezentacji wyników Western blot (w większości przypadków pokazano „wycięte” pojedyncze prążki; zakładam, że pochodziły z tego samego blotu, w przeciwnym przypadku nie powinny być porównywane ze sobą). Na rycinie 18 i kolejnych prezentujących zdjęcia mikroskopowe należy się samemu domyśleć, które barwienia uzyskano stosując przeciwciało. Również na rycinie 21 nie zostało wyjaśnione znaczenie kluczowych oznaczeń, na rycinie 46 i 48a nie jest jasne jakim przeciwciałem wykonano detekcję białka fuzyjnego maspina-EGFP, a rycina 33 zawiera niepełny tytuł. Większe zastrzeżenia budzi interpretacja wyników prezentowanych na rycinie 16, gdzie na podstawie obserwacji morfologii chromatyny Doktorantka wnioskuje o zajściu procesu apoptozy i funkcjonalności konstruktu p53-EGFP. Jest to dosyć subiektywna ocena, nie poparta przekonującymi obrazami i powinna być zweryfikowana innymi technikami pozwalającymi wykryć apoptozę (typu TUNEL test, czy barwieniem za pomocą aneksyny V). Jaka może być przyczyna, że w barwieniach p53 za pomocą przeciwciała (rycina 33) nie wykryto endogennego białka, które w MCF7 lokalizuje się głównie w cytoplazmie?

W obszernej Dyskusji Doktorantka omawiając poszczególne etapy pracy rozważa bardzo szczegółowo przede wszystkim kwestie metodyczne związane w wykonanymi eksperymentami, zastanawiając się również co jeszcze można było lub należy zrobić. Omawia też jakie były pierwotne plany i wyjaśnia dlaczego uległy zmianie. W odniesieniu do literatury (a nie tylko do własnych wyników), najszerzej jest dyskutowany wpływ maspiny i jej lokalizacji na komórki nowotworowe. Doktorantka krytycznie odnosi się do danych z literatury – w jednej z prac przeanalizowała nawet sekwencję starterów dostrzegając w nich potencjalne źródło mutacji, która mogła rzutować na wyniki uzyskane w publikacji. Pod jej kierunkiem prowadzone są eksperymenty mające wyjaśnić zaistniałe wątpliwości. Rozprawę doktorską kończy krótkie, jednostronicowe podsumowanie, co przy specyfice tematu, napotkanych problemach i szeregu negatywnych wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy wydaje się być lepszym posunięciem niż zakończenie rozprawy wnioskami.

Pod względem edytorskim praca pozostawia wiele do życzenia, głównie z powodu licznych błędów literowych i stylistycznych. Pomyłki pojawiają się również w nazwach sekwencji shRNA (na rycinach 10-12 jest inna numeracja niż w opisach rycin). Autorka nie stosuje się do aktualnych zaleceń dotyczących pisowni nazw genów i białek. W pracy umieszczono tabelę ze skrótami, nie jest ona jednak pełna (np. brak DOPE, DOTAP itp).

Podsumowanie.

Badania wykonane w ramach rozprawy doktorskiej Pani Magdaleny Machowskiej mają zarówno potencjał aplikacyjny jak i poznawczy. W mojej opinii praca stanowi znaczące osiągnięcie naukowe, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13, ust. 1 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, z późn. zm.). Wnoszę więc o dopuszczenie Pani Magdaleny Machowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiesława Widłak

dr hab. Wiesława Widłak,

profesor nadzwyczajny Centrum Onkologii -
Instytutu, Oddział w Gliwicach