

Ocena rozprawy doktorskiej mgr analityki medycznej Natalii Koniecznej pt. „Badanie wpływu hamowania telomerazy za pomocą TMPyP4 na skuteczność leków przeciwnowotworowych w komórkach raka piersi *in vitro*”, w związku z powierzeniem przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu obowiązku recenzenta

1. Znaczenie podjętych badań

Praca doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Błażeja Rubisia i promotora pomocniczego dr Anny Paszel-Jaworskiej. Praca dotyczy określenia wpływu hamowania telomerazy przez 5,10,15,20-tetra-(N-metylo-4-pirydylo)-21,23-H-porfirynę (TMPyP4) w warunkach *in vitro*. Rozprawa powstała w wyniku realizacji projektu badawczego finansowanego przez NCN. Podjęcie przez Doktorantkę takiej tematyki jest logiczną konsekwencją i rozwinięciem badań prowadzonych przez promotora rozprawy dotyczących znaczenia regulacji telomerazy dla oporności komórek nowotworowych na leki uszkodzające DNA. Rozprawa została przygotowana z zastosowaniem standardowych i najnowocześniejszych technik proteomiki, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników.

2. Ocena pracy

Rozprawa doktorska napisana jest w układzie zalecanym dla prac promocyjnych, obejmuje **119 stron** z podziałem na spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo i streszczenie w języku polskim i angielskim. Już na wstępie można zorientować się, że rozprawa przygotowana jest bardzo starannie i jednocześnie ciekawie, i że obejmuje interesujące zagadnienia i wyniki. Praca dobrze wpisuje się też w projekty dotyczące wykorzystania nowoczesnych metod proteomicznych w badaniach nowotworów.

W obszernym **Wstępie** liczącym 25 stron Autorka przedstawia podstawowe informacje dotyczące raka piersi, tj. jego występowania, leczenia i oporności komórek raka piersi na leczenie. Następnie podejmuje problem proliferacji i inwazji komórek nowotworowych z uwzględnieniem regulacji cyklu komórkowego, inwazji oraz przerzutowania komórek nowotworowych. W kolejnej części opisuje budowę i funkcje telomerów i telomerazy, porównując komórki prawidłowe i nowotworowe, porusza reaktywację telomerazy w procesie transformacji nowotworowej, sposoby regulacji telomerazy w komórkach, a także strategie terapeutyczne oparte o modulatory telomerazy

oraz wskazuje na telomerazę jako czynnik prognostyczny rozwoju i terapii nowotworów. Jak łatwo przewidzieć, końcowa część wstępu dotyczy charakterystyki porfiryny TMPyP4 i jej oddziaływania z DNA. Wstęp pracy ładnie wiąże się z tematyką rozprawy, jest napisany kompetentnie. Trochę dziwię się, że Autorka nie poświęciła więcej miejsca dziedzicznej postaci raka piersi, który jest również bardzo częsty w populacji polskiej, a jego rodzinne występowanie jest silnym wskazaniem do profilaktycznej mastektomii i adnexectomii. Należy zgodzić się z Autorką, że decyzje dotyczące leczenia powinny być podejmowane przez interdyscyplinarne zespoły, wśród których powinien znaleźć się chirurg, radioterapeuta, onkolog, radiolog, patomorfolog, jak również genetyk. Wartość merytoryczną Wstępu oceniam wysoko.

W **Założeniach i celu pracy** Doktorantka wskazuje na konieczność poszerzenia wiedzy dotyczącej mechanizmów regulujących telomerazę i ocenę poziomu ekspresji aktywności tego enzymu. W celu pracy zamieszczona jest również informacja o liniach komórek raka piersi, które będą stosowane do oceny działania kationowej porfiryny TMPyP4. Doktorantka wymienia badania szczegółowe, które zamierza przeprowadzić. Ta część przedstawiona została na jednej stronie i jednocześnie w pełni pokrywa całość zagadnienia. Z tego też względu cel pracy uznaję za ambitny i nowatorski, wymagający pracy eksperckiej zarówno przy uzyskiwaniu jak i opracowywaniu wyników.

Materiały i metody przedstawiono na 17 stronach. Doktorantka charakteryzuje stosowane podłoża, bufony, odczynniki i przeciwciała i wskazuje na ich pochodzenie. Następnie informuje o hodowlach komórkowych linii MCF7, MDA-MB-231 i MCF12A, a więc komórkach nowotworowych i komórkach prawidłowych gruczołu piersiowego. Komórki pochodziły z *American Type Culture Collection*. Autorka podaje szczegóły hodowli, jak również utworzenie modelu badawczego czyli linii komórek nowotworowych o fenotypie oporności wielolekowych poprzez hodowlę z doksorubicyną. Do oceny żywotności komórek Doktorantka stosowała test MTT i test zdolności do tworzenia kolonii, co jest w pełni uzasadnione. Ważnym elementem postępowania jest cytometryczna ocena cyklu komórkowego, którą również stosowała Autorka. Badania molekularne obejmowały pozyskiwanie RNA z komórek celem określenia ekspresji genów w badanych komórkach. Doktorantka szczegółowo opisuje to postępowanie, które w zasadzie jest zgodne z metodą opracowaną przez Chomczyńskiego i Sacchi. Bardzo ważną reakcją stosowaną przez Doktorantkę była reakcja odwrotnej transkrypcji polegająca na syntezie cDNA na matrycy RNA. Do oceny liczby kopii matrycy cDNA Doktorantka stosowała ilościową reakcję łańcuchową (qPCR) z zastosowaniem barwnika SYBR Green I. Stosowała aparaty typu LightCycler 2.0 oraz LightCycler 96. Do analizy ekspresji genów *hTERT* i *GAPDH* stosowała startery reakcji zaprojektowane w Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP, a dla innych genów startery komercyjne. W części dotyczącej analizy białek

Doktorantka opisuje izolację i ilościową ocenę białek, rozdzielanie białek metodą elektroforetyczną i przenoszenie na błonę PVDF. Wykrywanie białek przebiegało z zastosowaniem I-rzędowych i II-rzędowych przeciwciał, a następnie stosowano detekcję chemiluminescencyjną. Ocenę funkcjonalną komórek prowadzono z zastosowaniem zdolności komórek do migracji oraz do adhezji. W końcowej części rozdziału Autorka przedstawia pomiary aktywności telomerazy. Opis jest dokładny, umożliwiając szczegółowe zapoznanie się z warunkami reakcji PCR z zastosowaniem do ilościowej oceny. Opisany na końcu rozdziału test aktywności transporterów ABC opiera się na pomiarze zdolności komórek do usuwania barwnika fluorescencyjnego, specyficznego substratu do wybranych białek ABC. Ten test umożliwił określenie oporności wielolekowej. Rozdział Materiały i metody oceniam wysoko, ponieważ umożliwia recenzentowi i czytelnikowi dokładne zapoznanie się ze stosowanymi procedurami i odczynnikami.

Wyniki przedstawione zostały na 30 stronach, są bogato ilustrowane rycinami i fotografiami oraz opisują kolejne etapy realizacji rozprawy, począwszy od wpływu TMPyP4 na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego. Zaobserwowano, że TMPyP4 wpływa na przeżywalność komórek linii nowotworowych w sposób zależny od czasu i stężenia, przy czym komórki linii MCF7 były bardziej wrażliwie niż komórki linii MDA-MB-231, co było szczególnie widoczne po 24 godzinnej inkubacji. Z kolei udokumentowano zdolność do tworzenia kolonii przez komórki linii MCF7 i MDA-MB-231. Komórki MDA-MB-231 wykazywały mniejszą zdolność do tworzenia kolonii. W kolejnych badaniach Doktorantka wykazała istotne różnice między komórkami linii MCF7 w odpowiedzi na inhibitor telomerazy. Większa wrażliwość tych komórek wystąpiła po 48 godzinach. Ciekawą obserwacją z badań wpływu TMPyP4 i kombinacji doksorubicyny z TMPyP4 jest ocena zmian ekspresji genu *hTERT*. W komórkach MCF7 dochodziło do obniżenia ekspresji genu *hTERT* w sposób zależny od stężenia TMPyP4, a kombinacja doksorubicyny z TMPyP4 powodowała spadek ekspresji genu o ponad 90%. Częściowo odwrotne zjawisko obserwowano dla komórek MDA-MB-231. W celu potwierdzenia hamującego działania TMPyP4 w badanych komórkach raka piersi, Doktorantka przeprowadziła test funkcjonalny oceniający aktywność enzymatyczną telomerazy, wykazała znaczący spadek aktywności telomerazy pod wpływem TMPyP4 o wybranych stężeniach. W kolejnej części określała wpływ TMPyP4 i kombinacji doksorubicyny z TMPyP4 na przebieg cyklu komórkowego po 72 godzinach inkubacji. Wykazała, że wyższe stężenie TMPyP4 obniża liczbę komórek linii MCF7 w fazie S cyklu komórkowego. Dodanie samej doksorubicyny zwiększa liczbę komórek w fazie G2/M oraz liczbę komórek apoptotycznych. Jednoczesne podanie doksorubicyny i TMPyP4 zwiększa liczbę komórek w fazie G0/G1 cyklu komórkowego i jednocześnie obniża liczbę komórek w fazach S i G2/M, niezależnie od stężenia TMPyP4. W przypadku komórek MDA-MB-231, wyższe stężenia inhibitora prowadziły do zahamowania

wzrostu komórek w fazach S oraz G2/M cyklu, przy obniżeniu liczby komórek w fazie G0/G1. Podobne efekty w odniesieniu do faz G2/M i G0/1 odnotowano dla samej doksorubicyny oraz podanej wraz z TMPyP4. Doktorantka dodatkowo analizowała poziom ekspresji genów związanych z regulacją cyklu komórkowego (*CDK4*, *CCND1*, *CKK2* i *CCNE1*), wykazując w odniesieniu do poszczególnych punktów kontrolnych cyklu komórkowego dla linii MCF7 i MDA-MB-231 często przeciwne działanie poszczególnych substancji lub brak ich wpływu na aktywność genów *CDK2* i *CCNE1* w przypadku linii MDA-MB-231. Zaobserwowała spadek poziomu cyklin B1, D1 i E w obydwu liniach o 50% po inkubacji z TMPyP4 o wysokim stężeniu oraz jego kombinacji z doksorubicyną. Sama doksorubicyna lub w połączeniu z TMPyP4 obniżała poziom ekspresji cyklin B1 i E w przypadku linii MCF7, podobnie było w przypadku linii MDA-MB-231, za wyjątkiem zastosowania samej doksorubicyny, która prowadziła do nieznacznego wzrostu poziomu białek B1 i E.

Doktorantka zaobserwowała obniżoną zdolność do adhezji komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 poddanych działaniu wysokiego stężenia inhibitora telomerazy oraz jego kombinacji z doksorubicyną. Efekt ten był bardziej widoczny w przypadku linii MDA-MB-231. Zaobserwowano również występowanie zmian w morfologii w przypadku linii MCF7, podczas gdy zmiany morfologii dla linii MDA-MB-231 obserwowano tylko w przypadku inkubacji z doksorubicyną.

Spadek zdolności do migracji komórek Doktorantka zaobserwowała jedynie w przypadku linii MDA-MB-231 po 72 godzinach inkubacji z doksorubicyną lub kombinacją doksorubicyny z TMPyP4.

Testy funkcjonalne adhezji i migracji komórek zostały potwierdzone na poziomie białek zaangażowanych w te procesy w obydwu liniach komórek poddanych działaniu inhibitora TMPyP4 oraz jego kombinacji z doksorubicyną, wykazując obniżenie poziomu białek β 1-integriny, FAK i paksyliny.

Za bardzo ważne uznaję wyniki badań mikromacierzowych, w których Doktorantka określiła ekspresję genów *CDK4*, *CCND1*, *CDK2*, *CCNE1*. Przedstawione wyniki są ładne, jednak zostały opisane bardzo skrótowo.

Ostatnia część Wyników związana jest badaniem wpływu inhibitora telomerazy na komórki raka piersi z indukowaną opornością na doksorubicynę – w oparciu o linię MCF7/DOX. Doktorantka wybrała 24 godzinny czas inkubacji z TMPyP4, w którym komórki linii MCF7/DOX wykazują mniejszą wrażliwość na działanie inhibitora w porównaniu z linią MCF7/WT. Nie wykazała statystycznie istotnych różnic w działaniu TMPyP4 na przebieg cyklu komórkowego pomiędzy tymi komórkami. Doktorantka wykazała czterokrotnie wyższą ekspresję genu *hTERT* w komórkach linii odpornej na doksorubicynę. Poziom ekspresji proporcjonalnie obniżał się w zależności od podanego stężenia TMPyP4, przy czym istotność statystyczną zmian zaobserwowano dla najwyższego stężenia inhibitora, wynik ten

został potwierdzony testem aktywności telomerazy TRAP. Doktorantka wykazała ponad 60-krotnie wyższą ekspresję genu *ABCC1* kodującego białko transportowe w linii komórek opornych na doksorubicynę, w porównaniu z linią MCF7/WT. Podobnie jak w powyższych badaniach, TMPyP4 o najwyższym stężeniu statystycznie istotnie obniżał poziom ekspresji tego genu w linii MCF7/DOX. Jako ostatnie zadanie Doktorantka przeprowadziła test zahamowania aktywności transporterów ABC w celu określenia zdolności TMPyP4 do hamowania tej aktywności. Przedstawione etapy w pełni odpowiadają założeniom pracy.

Podsumowując rozdział Wyniki uważam, że badania zostały zrealizowane zgodnie z celem pracy i bardzo kompetentnie przedstawione zarówno opisowo jak i dokumentacyjnie. Zauważyć można duży nakład pracy Autorki, co doprowadziło do uzyskania wysokiej jakości dokumentacji i oceny statystycznej.

W **Dyskusji wyników** przedstawionej na 12 stronach, Doktorantka umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki w odniesieniu do danych piśmiennictwa, począwszy od ustosunkowania się do aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych i jej zdolności do odtwarzania końców telomerów. W dalszej części rozważa działanie innych inhibitorów telomerazy i porównuje je z TMPyP4. Podkreśla również znaczenie zmian w mechanizmach regulujących cykl komórkowy ze względu na powszechność występowania zmian w komórkach nowotworowych i wskazuje, że skojarzone działanie doksorubicyny i TMPyP4 może mieć duży potencjał terapeutyczny. Doktorantka podkreśla konieczność dostosowania terapii w zależności od stopnia inwazyjności nowotworów, wskazując na obniżenie zdolności adhezyjnych i migracyjnych, jak i spadek poziomu białek regulujących te procesy pod wpływem skojarzonego działania doksorubicyny i TMPyP4 na linię MDA-MB-231. Zwraca uwagę na znaczenie pojawiającej się lekooporności, szczególnie w przypadku stosowania terapii jednym lekiem oraz pojawiającej się zwiększonej aktywności telomerazy, wskazuje również na potencjalne znaczenie prognostyczne poziomu ekspresji genu *hTERT* oraz genu *ABCC1* kodującego białko transportera w terapii opornych na leczenie nowotworów.

W podsumowaniu uważam, że dyskusja napisana jest bardzo kompetentnie i Doktorantka zachowała w niej kolejność, która odpowiada celom pracy i uzyskanym wynikom.

Wnioski Doktorantka zamieściła na 1 stronie, w 9 punktach przedstawiając najważniejsze osiągnięcia rozprawy.

Rozprawę zamyka **Piśmiennictwo** pochodzące z kilku ostatnich lat oraz **Streszczenie** w języku polskim i angielskim.

Pytania, które nasunęły się po przeczytaniu rozprawy są następujące: 1) Wyprowadzenie linii komórkowych trwało 6 miesięcy i w związku z tym nasuwa się pytanie czy już sam długi okres prowadzenia hodowli nie wpłynął na genotyp i fenotyp komórek. 2) Czy komórki wracały do swoich właściwości proliferacyjnych po kontynuowaniu inkubacji bez

inhibitora telomerazy? 3) Dlaczego inhibitor TMPyP4 wykazuje inne działanie wobec komórek nowotworowych i prawidłowych?

Pod względem edytorskim, rozprawa została przygotowana bardzo dobrze, znalazłem jedynie bardzo drobne błędy nie wpływające na całość wysokiej oceny rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Doktorantka porusza w rozprawie bardzo ciekawy i jednocześnie trudny temat. Jako recenzent odniosłem bardzo pozytywne wrażenie z lektury rozprawy doktorskiej. Mam również pozytywną ocenę sposobu przedstawiania wyników. Doktorantka z dużym uznaniem traktuje badania prowadzone pod opieką dr hab. Błażej Rubisia, co ja również czynię, bo to one umożliwiły realizację rozprawy.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że Autorka przygotowała bardzo ciekawą rozprawę, zgodną z Ustawą 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.). Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Natalii Koniecznej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wnikliwą analizę wpływu inhibitora telomerazy TMPyP4 i doksorubicyny na komórki raka piersi wraz ze wskazaniem potencjalnych strategii terapeutycznych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Ryszard Słomski

Poznań, 19.06.2018 r.

e-mail slomski@up.poznan.pl, <http://www.up.poznan.pl/~slomski/>