

Prof. UG, dr hab. Anna Herman-Antosiewicz
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza
80-308 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Alicji Grudowskiej, pt.:
The role of tetraspanin CD151 in prostate cancer progression

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem współczesnej ludzkości, nie tylko ze względu na skalę zachorowań, ale również trudności w leczeniu. Szczególnie - nowotworów zaawansowanych, które cechuje formowanie wtórnych ognisk, czyli tzw. przerzutów. Proces ten zachodzi wieloetapowo i wymaga modulacji szeregu szlaków sygnalizacyjnych oraz oddziaływań między komórkami nowotworowymi a środowiskiem, przy czym zmienia się ono z tego, w którym pierwotnie proliferują, do tego, które pokonują podczas przemieszczania się w organizmie, w końcu - na środowisko wtórnie zasiedlane. Poznanie molekularnych mechanizmów tych oddziaływań ma ogromne znaczenie w projektowaniu skutecznych leków, na przykład celujących w elementy mikrośrodowiska guza, które -z natury- są mniej zmienne niż komórki nowotworowe.

W tę tematykę wpisuje się praca doktorska pani mgr Alicji Grudowskiej wykonana pod kierunkiem pana prof. dr hab. Andrzeja Składanowskiego z Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed oraz ko-promotora, pana prof. dr hab. Kazimierza Krajki z Kliniki Urologii GUMed. Doktorantka na modelu komórek prostaty badała udział tetraspaniny CD151 w rozwoju nowotworu tego narządu. Tetraspaniny to całkiem spora rodzina białek membranowych, które oddziałując pomiędzy sobą oraz innymi czynnikami (receptorami lub białkami adhezyjnymi), tworzą specyficzne domeny w błonie komórkowej regulujące takie procesy jak przekaźnictwo sygnałów, adhezja, proliferacja, mobilność lub różnicowanie komórek. Niektóre z nich pełnią rolę supresorów onkogenezy, inne - raczej ją promują. CD151 jest produkowane przez wiele rodzajów komórek prawidłowych, ale podwyższona jego ilość jest obserwowana u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami różnego pochodzenia i generalnie wiąże się to ze słabym rokowaniem. Liczne badania wskazują, że białko to promuje inwazyjność i metastazę komórek nowotworowych, również komórek nowotworu prostaty. W tym rodzaju nowotworu

proponuje się nawet, że szacowanie poziomu tetraspaniny CD151 może mieć większą wartość prognostyczną niż tradycyjna skala Gleasona. Dokładna rola tego białka w rozwoju nowotworu prostaty, szczególnie w kontekście oddziaływań komórek prostaty z mikrośrodowiskiem nie jest dokładnie znana, stąd podjęty przez Doktorantkę problem badawczy jest ważny zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i praktycznego zastosowania - do projektowania nowych strategii leczenia.

Pani mgr Grudowska badała udział CD151 w oddziaływaniu prawidłowych komórek epitelialnych prostaty z mikrośrodowiskiem nowotworu oraz nowotworowych komórek prostaty z mikrośrodowiskiem kości, jako że są one najczęstszym miejscem metastazy tego nowotworu. Wykorzystała w tym celu odpowiednio komórki linii BPH-1 (unieśmiertelnione komórki epitelialne prostaty) i PC3 (pochodzące ze złośliwego, inwazyjnego nowotworu prostaty umiejscowionego w kościach) oraz ich pochodne ze znacząco obniżoną ilością CD151. Uzyskała je w trakcie realizacji tej pracy poprzez selekcję komórek ze stabilną ekspresją specyficznego shRNA. Mikrośrodowisko nowotworu było symulowane przez medium kondycjonowane przez hodowlę fibroblastów związanych z nowotworem prostaty, uzyskanych z materiału klinicznego. Natomiast środowisko kości - przez medium pochodzące z hodowli osteoblastów linii hFOB. Dodatkowo, do hodowli w trójwymiarze zastosowano matrigel dostarczający zestawu białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

W pierwszej części badań pani mgr Grudowska wykazała, że niezależnie od obecności CD151 proliferacja komórek BPH-1 w matrygelu była silnie stymulowana przez medium pochodzące z hodowli fibroblastów związanych z nowotworem prostaty. Doktoranta następnie skupiła się na roli CD151 w odpowiedzi tych komórek na konkretne czynniki wzrostu fibroblastów. Wzrost kolonii BPH-1 był stymulowany przez FGF1 i FGF6 niezależnie od CD151, natomiast był wyraźnie słabszy po traktowaniu komórek pozbawionych CD151 czynnikami FGF2 lub FGF7. Doktorantka uznała, że jest to efekt cytostatyczny, choć wykluczenie apoptozy jedynie na podstawie ilości białek Bcl-2 czy Bad jest według mnie zbyt pochopne. Jak można wytłumaczyć obserwowany hamujący efekt EGF2 w komórkach z obniżoną ilością CD151?

Doktorantka zauważyła, że CD151 pozytywnie wpływa na produkcję FGFR1 a negatywnie na - FGFR2. Dodatkowe eksperymenty z komórkami nadprodukcującymi receptory FGFR1 lub 2 pozwoliły wysnuć wniosek, że proliferacja oraz potencjał migracyjny komórek BPH-1 są głównie aktywowane przez interakcję FGF2 z FGFR1, którego synteza jest regulowana przez CD151. Przy tej serii doświadczeń brakuje przysłowiowej „kropki na

i”, tj. weryfikacji, czy nadprodukcja FGFR1 w BPH-1 shCD151 będzie suprymować obniżony potencjał proliferacyjny i migracyjny po traktowaniu FGF2.

Pani mgr Grudowska następnie pokazała, że podwyższonej zdolności migracji komórek BPH-1 wt lub nadprodukujących FGFR1 towarzyszy wzmożona fosforylacja FGFR i FAK pod wpływem FGF2 (co do poziomu p- Src – trudno stwierdzić na podstawie przedstawionego blotu). To, że te zjawiska zachodzą równolegle, nie uprawnia jednak do wniosku, że udział CDC151 w promowaniu wzrostu i migracji komórek przez FGF2/FGFR1 jest rezultatem aktywacji FAK i Src (str. 80 i 99). Dodatkowo, przedstawiony w pracy wynik immunoblottingu nie jest najlepszej jakości, a w takim przypadku konieczne jest wykonanie eksperymentu kilkakrotnie i oszacowanie różnic w poziomie białek w stosunku do kontroli i po korekcie do różnic w ładowaniu do studzienek żelu.

W drugiej części eksperymentów pani mgr Grudowska badała udział CD151 w układzie: komórki nowotworowe i mikrośrodowisko guza lub kości. Okazało się, że medium kondycjonowane przez hodowlę fibroblastów związanych z nowotworem silnie stymulowało potencjał migracyjny komórek PC-3, właściwie niezależnie od obecności CD151. Co ciekawe, w tym modelu CD151 okazało się hamować migrację i inwazyjny fenotyp komórek. Podobnie w przypadku hodowli w medium kondycjonowanym przez hodowlę osteoblastów (szczególnie niezróżnicowanych) - obecność CD151 niwelowała aktywujący wpływ tego medium na potencjał inwazyjny i migracyjny komórek PC3. Doktorantka podjęła się zidentyfikowania szlaków regulowanych przez CD151 w obecności czynników wydzielanych przez dzielące się osteoblasty i wykazała, że fosforylacja (związana z aktywacją) takich białek, jak FAK, Src, Akt, p38 i Hsp27, jest podwyższona przy braku CD151, co mogłoby tłumaczyć zwiększony potencjał proliferacyjny i metastatyczny tych komórek. Co więcej, w komórkach z obniżoną ilością CD151 zachodziła wzmożona produkcja i sekrecja metaloproteinazy MMP-13, co również może przyczyniać się ich zwiększonej mobilności.

Przedstawione w rozprawie wyniki są bardzo interesujące. Nasuwa mi się refleksja dotycząca stosowanego modelu do badania oddziaływań komórek nowotworowych ze środowiskiem guza. Użyte zostały komórki linii PC-3, które pochodzą właśnie z przerzutu do kości, tak więc mogą być zbyt zaawansowanym modelem do tego typu badań. Może lepiej by było zbadać te zależności, stosując mniej tumorogenne linie jak LNCaP, które do wzrostu w układzie *in vivo* potrzebują składników macierzy zewnątrzkomórkowej i czynników wzrostu. Proponuję, aby Doktorantka ustosunkowała się do tej refleksji w czasie obrony pracy.

Podsumowując ocenę wartości merytorycznej badań opisanych w rozprawie doktorskiej pani mgr Grudowskiej, uważam, iż uzyskane przez Nią rezultaty prac

doświadczalnych w istotnym stopniu poszerzyły wiedzę o roli tetraspaniny CD151 w rozwoju nowotworu prostaty.

Przechodząc do oceny samej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że pani mgr Grudowska opanowała umiejętność przedstawiania uzyskanych przez siebie wyników w sposób przyjęty dla prac naukowych. W tematykę pracy doktorskiej wprowadza rozdział „Introduction”, w którym Autorka bardzo szczegółowo przedstawia problem nowotworu prostaty: od danych epidemiologicznych, przez kolejne stadia rozwoju, diagnostykę i metody leczenia. Szczególną uwagę poświęca roli mikrośrodowiska guza w jego progresji oraz stanie wiedzy na temat tetraspanin i ich roli w nowotworzeniu.

Rozdział *Materials* przygotowany został przez Doktorantkę starannie i szczegółowo (ujęte zostały nawet materiały, których użycie nie zostało pokazane w części wyników, np. niektóre przeciwciała, jak anti-occludin, anti-OctA, anti-catherin, anti-MMP-9, anti-MMP-2). Opis metod w części *Methods* pozwala zrozumieć i powtórzyć wykonane eksperymenty, choć niektóre opisy są niekompletne, jak 4.2. *Lentiviral infection*, a warunki wirowań nie zostały precyzyjnie podane.

Wyniki pracy Doktorantka dzieli na 2 części tematyczne. W omawianiu kolejnych kroków zmierzających do poznania roli CD151 w rozwoju nowotworu prostaty widoczny jest porządek i logika pracy. Autorka stawia kolejne pytania w oparciu o uzyskane wyniki i konsekwentnie na nie odpowiada, dobierając adekwatne techniki. Mam zastrzeżenia co do prezentacji wyników. Notorycznie w ilościowych schematach oś Y ma błędną legendę, tzn. nie wiadomo, czy obrazuje liczbę czy wartości procentowe, np. Fig. 30: „Average number of migrated cells [%]”, Fig. 34C: „Average number of invading cells [%]”, podobnie - Fig. 35B i 36. Dodatkowo, niektórym wynikom przedstawionym w formie wykresów brakuje analiz statystycznych, dla przykładu Fig. 29B, 32 Ai C, 34 B i C, 35B. Wreszcie, nie wiadomo, czy doświadczenia typu western blotting były wykonywane kilkakrotnie i pokazane są wyniki reprezentatywne.

Na koniec Autorka w dojrzały i krytyczny sposób dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Może niekiedy dyskusja jest zbyt oszczędna. Imponujący jest zestaw cytowanej literatury- 243 pozycje. Tu nie do końca wiem, jaki został przyjęty styl, nie jest on alfabetyczny, raczej wg kolejności cytowań, choć np. prace 238-241 następują po pracy 234 (str. 100 i 101).

Rozprawa napisana jest w języku angielskim, ze streszczeniem w wersji polskojęzycznej. W tym miejscu chciałabym zaznaczyć, że o ile przygotowanie prac naukowych w j. angielskim jest trendem światowym i na pewno stanowi punkt wyjścia do

opracowania publikacji, ma efekty uboczne: pewna nieporadność pisania w języku polskim, co widać w *Streszczeniu*. Dla przykładu podaję 2 cytaty: „ Dowiedziono, że ekspresja tetraspaniny CD151 ma znaczenie dla rozwoju raka gruczołu krokowego, stąd uważa się go za potencjalnego kandydata jako biomarkera do przyszłych celów diagnostycznych oraz terapii PCa” oraz „Efekt ten był bardziej widoczny gdy CD151-negatywne komórki hodowano w 3D w obecności kondycjonowanego medium z osteoblastów”. Znalazłam w pracy dość dużo błędów, głównie literowych i interpunkcyjnych, ale też gramatycznych. Pragnę jednak zaznaczyć, że powyższe uwagi nie wpływają zasadniczo na moją wysoką ocenę zawartości merytorycznej pracy.

Podsumowując, uzyskane przez panią mgr Alicję Grudowską rezultaty prac doświadczalnych stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała specyficzny problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty pracy w rozprawie doktorskiej. Doktorantka wykazała się wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem technik biochemicznych i biologii komórki oraz umiejętnością interpretacji wyników. Osiągnięcia te jednoznacznie spełniają wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 18 marca 2011 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia nadanie stopni naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Zwracam się zatem do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Alicji Grudowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Anna Herman-Antosiewicz