

Kraków, 11 stycznia 2018



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI

COLLEGIUM
MEDICUM

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Łukasza Turczyka

**pt. „Analiza funkcji i mechanizmu działania FGFR2 w raku gruczołu
piersiowego”**

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Turczyka pt. „Analiza funkcji i mechanizmu działania FGFR2 w raku gruczołu piersiowego” stanowi blisko stustronicowe opracowanie wyników badań prowadzonych przez doktoranta w Zakładzie Enzymologii Molekularnej Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Składanowskiego – promotora oraz dr hab. Rafała Sądeja – promotora pomocniczego. Zasadniczym celem badań było rozpoznanie roli i mechanizmu regulacji ekspresji i aktywności izoformy 2 receptora fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR2) w raku piersi, w tym jego wpływu na zyskiwanie przez komórki rakowe oporności na działanie powszechnie stosowany w tej chorobie lek, tamoksyfen. Praca ma zdecydowanie charakter podstawowy, ale nie ulega wątpliwości, że doktorantowi przyświeca również cel kliniczny – poszukiwanie nowych molekularnych celów terapeutycznych, których swoiste traktowanie zwiększałoby efektywność leczenia raka piersi z użyciem tamoksyfenu.

Wydział Lekarski

Katedra

Biochemii Lekarskiej

ul. Kopernika 7

PL 31-034 Kraków

tel./fax +48 12 422 32 72

+48 12 422 74 00

+48 12 424 72 29

kbl_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

– Rak piersi jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów kobiet z powodu nowotworów złośliwych. Pomimo ogromnego wysiłku badawczego, jak i zgromadzenia bogatego arsenału postępowań diagnostyczno-terapeutycznych daleko do opanowania tej często występującej choroby, która rokrocznie w Polsce pozbawia życia kilka tysięcy, często młodych, w pełni sił witalnych, kobiet. Znajomość szczegółów mechanizmów powodujących powstawanie i pobudzających

rozwój nowotworów, w tym raka piersi, jest niezmiernie pożądana, gdyż badania molekularne niejednokrotnie udowodniły, że identyfikacja specyficznych elementów przeżyciowych ścieżek sygnalizacyjnych stała się podstawą do stworzenia tzw. terapii celowanej, której doskonałym przykładem jest np. stosowanie imatinibu i kolejnych generacji inhibitorów fuzyjnej kinazy tyrozynowej BCR-Abl w przewlekłej białaczce szpikowej. Jednym z powszechnie i od wielu dziesięcioleci stosowanych leków w terapii raka piersi jest tamoksyfen, działający modulująco na aktywność receptora estrogenowego, bezdyskusyjnie zaangażowanego w proces powstawania i progresji tego nowotworu.

Niestety jedną z cech charakterystycznych stosowania leków antynowotworowych jest – oprócz ich mniej lub bardziej szkodliwego działania ubocznego – inicjowanie procesów komórkowych zwiększających stopniowo oporność kolejnych generacji komórek nowotworowych na stosowane leki. Problem ten dotyczy również tamoksyfenu. Na obecnym etapie wiedzy mamy świadomość, że badań nad mechanizmami determinującymi losy komórek nowotworowych nie można prowadzić w oderwaniu od oceny interakcji bezpośredniego otoczenia guza nowotworowego ze stanowiącymi go komórkami. Z tego względu podjęcie przez doktoranta analizy funkcji i mechanizmu działania w raku piersi jednego z receptorów fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR2), z uwzględnieniem roli mediatorów generowanych przez zasocjowane z nowotworem fibroblasty (CAFs) i możliwym wpływem tych zależności na zwiększenie oporności na tamoksyfen są jak najbardziej zasadne. Z tego też powodu uznać należy, że przyjęta przez doktoranta koncepcja badań jest właściwa. Ponadto projekt badawczy, a w konsekwencji praca doktorska bardzo dobrze wpisują się w tematykę badawczą od wielu lat z powodzeniem realizowaną w Zakładzie Enzymologii Molekularnej, Katedry Biotechnologii Molekularnej MWB UG i GUMedu. Oceniana dysertacja jest jednocześnie dobrym przykładem zastosowania nowoczesnych technik biologii molekularnej, umożliwiających ingerencję w procesy komórkowe na poziomie ekspresji genów, w celu określenia roli badanego białka w funkcjonowaniu i zachowaniu się komórki.

Charakterystyka pracy od strony wydawniczej.

Praca doktorska została napisana czytelnie i starannie przygotowana od strony wydawniczej, w typowy dla takich opracowań sposób, z podziałem na rozdziały i gdzie to konieczne podrozdziały. Obejmuje 94 strony tekstu, w tym:

- (i) oświadczenie autora m.in. o samodzielnym wykonaniu pracy,
- (ii) podziękowania,

- (iii) spis treści,
- (iv) streszczenia w j. polskim i w j. angielskim – ponad 1 strona każde, z bardzo zwięzłym przedstawieniem najważniejszych informacji dotyczących pracy doktorskiej, jak zasadność wyboru tematu, cel, metody, uzyskane wyniki oraz sformułowane wnioski,
- (v) wykaz skrótów,
- (vi) wstęp – 16 stron, 5 podrozdziałów, 4 ryciny – w ramach którego doktorant, dokonując niezbędnej selekcji niezmiernie obszernego piśmiennictwa dotyczącego rozmaitych aspektów klasyfikacji, rozpoznania i leczenia raka piersi, przedstawia w zwięzły, ale wystarczający sposób aktualny stan wiedzy odnośnie zagadnień i pojęć takich jak znaczenie dla rozwoju i w leczeniu mikrośrodowiska guza, ekspresji tetraspaniny CD 151, osi sygnalizacyjnej FGF/FGFR, receptorów estrogenowych (ER), antynowotworowego działania tamoksyfenu i oporności na niego, których poznanie jest niezbędne dla zrozumienia zasadności podjęcia danego tematu badawczego i koncepcji pracy,
- (vii) cel pracy – 1 strona, opisany zwięzle, ale klarownie i wyczerpująco,
- (viii) materiały – 8 stron – szczegółowy spis wykorzystywanych w pracy linii komórkowych, wraz z krótką ich charakterystyką oraz wszystkich odczynników, a także sprzętu laboratoryjnego, bez których realizacja zaplanowanych badań nie byłaby możliwa,
- (ix) metody – 6 stron – opis zastosowanych metod biologii komórki, biologii molekularnej i biochemii (hodowle komórkowe, wyprowadzanie zmutowanych linii komórkowych, cytometria przepływowa, hodowla trójwymiarowa, western blot, immunoprecypitacja, analiza szlaków sygnalizacyjnych, qPCR),
- (x) wyniki – 28 stron, 19 rysunków (zdjęć) bardzo często złożonych z 3 - 4 części – prezentacja wyników wraz z uzupełniającymi komentarzami,
- (xii) podsumowanie całościowe uzyskanych wyników – 1 strona,
- (xiii) dyskusja – 7 stron,
- (xiv) piśmiennictwo, zawierające 186 pozycji w tym: 67 pozycji do roku 2006 i wcześniejsze, 73 pozycji z lat 2007 – 2011, 42 pozycje z lat 2012 – 2016 i 4 pozycje z roku 2017 (w sumie około 25% z ostatnich pięciu lat, a blisko 2/3 z okresu ostatnich z 10 lat).

Ocena / Uwagi.

Wstęp rozprawy napisany jest klarownie, czyta się go z zainteresowaniem, a uważne zapoznanie się z przedstawioną argumentacją pozwala zgodzić się z dokonaniem przez doktoranta wyborem FGFR2 jako ważnego ogniwa w funkcjonowaniu komórek raka piersi, a także słuszności podjęcia badań odnośnie okoliczności jego ekspresji, warunków funkcjonowania, a także ewentualnego mechanizmu zaangażowania w proces nabywania przez komórki rakowe oporności na tamoksyfen.

Materiały i Metody są opisem stosowanych technik badawczych z załączeniem niemal detalicznych protokołów postępowania. Wnikliwe zapoznanie się z nimi pozwala rozpoznać w doktorancie starannego i rzetelnego eksperymentatora, dysponującego stosownym warsztatem badawczym. Znajdują się w nim zarówno podstawowe, ale wymagające reżymu doświadczalnego i odpowiedzialnego podejścia techniki biochemiczne (western blotting, immunoprecypitacja, etc), biologii molekularnej (infekcja komórek odpowiednio przygotowanymi wektorami lenti-/retrowirusowymi, qPCR) oraz biologii komórki (hodowle komórkowe, cytometria przepływowa).

Kolejny rozdział pracy to Wyniki, w którym na blisko trzydziestu stronach i korzystając z 19 często złożonych rycin zawierających również zdjęcia hodowli komórkowych doktorant prezentuje rezultaty otrzymane w trakcie realizacji pracy. Zaprojektowanie badań, bez wątplenia modyfikowanych i aktualizowanych podczas realizacji projektu, wielokierunkowe podejście metodyczne oraz opracowanie uzyskanych wyników świadczą o umiejętności kompleksowego podejścia do badanego zagadnienia i zasługują na uznanie.

W Dyskusji doktorant przeprowadził krytyczną analizę wszystkich własnych wyników, w zasadzie ustosunkowując się w poprawny sposób do nich w kontekście dostępnego aktualnie na ten temat i szeroko cytowanego piśmiennictwa. Zapoznanie się z Dyskusją pozwala dostrzec dojrzałość naukową doktoranta wyrażającą się w podejściu nie tylko do prowadzenia badań i opracowywania wyników, ale również w doborze argumentów na rzecz stawianych hipotez.

Zależności wykazane przez doktoranta w wyniku przeprowadzenia serii dobrze zaplanowanych eksperymentów są bezdyskusyjne. Tym bardziej ważkie staje się pytanie o naturalne okoliczności, w których badana (symulowana) sytuacja – brak ekspresji CD151 – mogłaby mieć miejsce. To jest, moim zdaniem, nieco niewystarczająco poruszona w Dyskusji kwestia dotycząca przeprowadzonych badań.

Intrygującym jest bowiem fakt, że oba niekorzystne dla stanu komórki i zwiększające groźbę rozwoju nowotworu elementy sygnalizacji międzykomórkowej jak CD151 i FGFR wykluczają swój jednoczesny sposób działania, co zresztą doktorant zauważył w Dyskusji (str. 78). Wydaje się, że proponowane przez doktoranta wyjaśnienie odnośnie mechanizmu wpływu CD151 na FGFR2 jest poprawne i pokazuje z jednej strony istotną rolę integryn wiążących lamininy, a z drugiej kinazy p38. To dobrze tłumaczy sytuację, w której narasta ekspresja CD151, a czego skutkiem jest zahamowanie ekspresji FGFR2. Doświadczenia Zespołu i publikowane prace, choć pokazują dość skomplikowaną rolę tej molekuly dla przebiegu procesu nowotworowego, raczej sygnalizują niekorzystny dla komórek efekt nasilenia ekspresji tego białka (Sadej et, 2010, etc). Co i kiedy dzieje się, co może być powodem, że ekspresja CD151 ulega redukcji?

Na podstawie przedstawionych wyników przeprowadzonych badań i dostępnej literatury należy wnioskować (rozumieć), że „naturalnym stanem” rzeczy jest obecność CD151 i wynikający z tego faktu brak obecności (występowania) FGFR2.

Praca doktorska skupia się przede wszystkim na wykazaniu, że receptor FGF, w szczególności FGFR2 odgrywa, zgodnie z dotychczasową wiedzą, istotną rolę w progresji raka piersi jak również w nabywaniu przez komórki rakowe oporności na działanie tamoksyfenu. Należałoby oczekiwać, że oś FGF/FGFR2 nie jest w naturalnych warunkach dominująca, gdyż ekspresja FGFR2 jest m.in. z powodu występowania CD151 niewielka lub jej brak. Aby FGFR2 wykazało niekorzystny wpływ na funkcjonowanie komórek powinna zmaleć lub zostać zahamowana ekspresja CD151. Należałoby spodziewać się, że FGFR2 jest skuteczną „bronią” komórki nowotworowej wykorzystywaną przez nią m.in. w obronie przed antynowotworowym działaniem czynnikami terapeutycznymi modulującymi aktywność receptora estrogenowego (ER), jak np. badany tu tamoksyfen. Czy znane są czynniki / bodźce, które pomimo obecności CD151 indukują/stymulują ekspresję i aktywność FGFR2? Doktorant dokumentuje sposób, w jaki obecność CD151 prowadzi do hamowania ekspresji FGFR2, ale nie podejmuje/podnosi kwestii w jaki sposób, w jakich okolicznościach maleje ekspresja CD151, co mogłoby skutkować pojawieniem się receptora FGF typu 2, a w ślad za tym wszelkich tego konsekwencji dla funkcjonowania komórki. Czy znane są komórki w których nie stwierdza się obecności CD151, a występuje FGFR2, a jeśli to czy były to komórki z późniejszych stadiów progresji nowotworów?

Rodzi się też pytanie, dlaczego doktorant nie przedstawił ekspresji CD151 w badanych liniach na poziomie mRNA lub/i białka (np. metoda Western blot; anti-CD151 oferuje wielu producentów MAb), jak to zrobił dla wykazania obecności FGFR2 w komórkach w których

zastosowano knock-out CD151? Obraz ten nie przyczyniłby się bezpośrednio do odpowiedzi na powyższe pytanie, czy do wyjaśnienia znaczenia negatywnej korelacji obu molekuł, ale pozwoliłby udokumentować – bez ingerencji w naturę komórek (bez modyfikacji biotechnologicznych) – czy występowaniu w badanych liniach CD151 towarzyszy nieodmiennie brak lub niewielka ekspresja FGFR2.

Kiedy i ewentualnie co powoduje, że ekspresja CD151 maleje na tyle, że ekspresja FGFR2 wzrasta do niekorzystnego dla komórki poziomu? Co powoduje, że ekspresja CD151 maleje, czy FGFR2 ma z tym jakikolwiek związek, czy w ogóle i ewentualnie jaki wpływ na tę sytuację ma receptor estrogenowy (ER).

Czy badany układ biotechnologicznie wyciszonej ekspresji CD151 ma szansę znaleźć odpowiednik w naturze?

Z mniej istotnych, ale koniecznych do odnotowania, z racji spoczywającego na recenzencie obowiązku, chciałbym zwrócić uwagę na następujące drobne kwestie:

1/ w streszczeniu na str. 8 jest fragment zdania, cytuje: „stabilizacja ER przez tamoksyfen”. Czy chodzi sensu stricto o stabilizację cząsteczki ER, której aktywność jest hamowana modulowana poprzez wiązanie tamoksifenu, czy też stwierdzenie to jest skrótem myślowym odnośnie stabilizacji choroby, ściśle mówiąc zatrzymanie postępu choroby,

2/ niefortunnie opisany lub dobrany rozcieńczalnik (solwent) do oznaczania białka (str. 43). Lepiej od odczynnika Lowry’ego nadaje się do stosowania w obecności 2-merkaptoetanolu odczynnik Bradforda. Wydaje się, mając na uwadze długość fali pomiarowej jaka podano w opisie (595 nm), że takiego właśnie odczynnika użyto. W przypadku zastosowania odczynnika Lowry’ego odczyt prowadzi się bowiem przy długości fali 750 nm.

3/ w spisie odczynników na str. 35, pierwsza pozycja od góry: powinno być Anty-fosfo-AKT (Ser473), a nie anty-fosfo-AKT (Tyr473)

4/ nie do końca rozumiem, dlaczego w Podsumowaniu na str. 75 mowa jest o aktywacji receptora estrogenowego (ER) przez oś FGF7/FGFR2 poprzez jego fosforylację z udziałem PI3K/Akt na Ser167, prowadzącą do ubikwitynacji i ostatecznie degradacji,

5/ czytając rozprawę często napotyka się na używane przez autora nazwy własne epitelium czy endotelium etc. – na marginesie rodzi się refleksja, czy w przyszłości w ogóle będziemy stosować nazwy nabłonek i śródbłonek?

Wniosek końcowy.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że pomimo wysuniętych w recenzji nielicznych i nie tyle uwag krytycznych, co raczej wyrażenia pewnego niedosytu, dysertacja doktorska mgr Łukasza Turczyka pt. „Analiza funkcji i mechanizmu działania FGFR2 w raku gruczołu piersiowego” prezentuje wyniki oryginalnych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych, powszechnie akceptowanych, metod badawczych biologii komórki i molekularnej wspartych niezbędnymi biochemicznymi technikami analitycznymi. Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim, jak również wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365 i Dz. U. z 2011r. nr 84, poz. 455).

Zapoznanie się z rozprawą doktorską mgr Łukasza Turczyka i wynikami przeprowadzonych przez niego badań pozwala stwierdzić, że jest to wyróżniająca się praca doktorska. Za najważniejsze osiągnięcia doktoranta uznać należy konsekwentne przeprowadzenie założonych badań i osiągnięcie wyznaczonego/ych celu/ów w serii dobrze przemyślanych, pracochłonnych i starannie zaplanowanych eksperymentów, czemu bez wątplenia sprzyjało dobre przygotowanie badawcze i umiejętne łączenie doświadczeń oraz kojarzenie posiadanych informacji z otrzymywanymi wynikami.

W szczególności na uwagę zasługuje wykazanie po raz pierwszy, że:

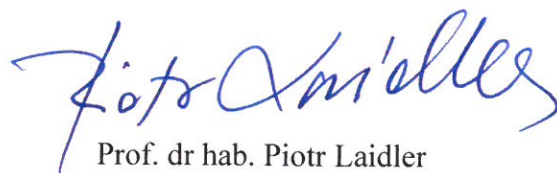
1/ tetrasapnina CD151 jest istotnym i swoistym elementem kontroli ekspresji receptora fibroblastycznego czynnika wzrostu typu 2, FGFR2 w czym kluczowa role odgrywa interakcja pomiędzy CD151 a integrynami wiążącymi lamininy, co po raz kolejny potwierdza niezwykła złożoność oddziaływań zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, i wynikającą z niej elastyczność komórki nowotworowej w adaptowaniu się do warunków otoczenia i bodźców z niego płynących

2/ mikrośrodowisko guza poprzez oś FGF/FGFR2 może z udziałem AKT powodować, że nasila się fosforylacja receptora estrogenowego (ER) na Ser 167 co skutkuje jego wzmożoną degradacją proteosomalną, zmniejsza jego pulę i w konsekwencji przy dodatkowym udziale Bcl-2 redukuje efektywność działania, tamoksifenu, co kolei mogłoby tłumaczyć mechanizm pojawiającej się w trakcie terapii, oporności na ten nadal bardzo ważny i użyteczny w leczeniu raka piersi lek.

Przedstawione i przedyskutowane wyniki, póki co, jak rozumiem na podstawie posiadanej dokumentacji, jedynie częściowo opublikowane, stanowią oryginalny i trwały wkład do nauki

i choć – jak to często bywa – mają miejscami wstępny charakter, to co najważniejsze bez najmniejszej wątpliwości otwierają dalsze interesujące obszary badawcze, co stanowi o niezaprzeczalnej wartości rozprawy doktorskiej. Biorąc to pod uwagę wnioskuję, o czym wspomniałem powyżej, o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Turczyka.

Praca doktorska mgr Łukasza Turczyka stanowi spójne, dojrzałe opracowane dzieło, które prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje, że doktorant posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jego zainteresowania, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań oraz interpretowania ich wyników. W mojej ocenie przedłożona praca w pełni kwalifikuje doktorantkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.



Prof. dr hab. Piotr Laidler