



Wrocław, 12 sierpień 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Mieczkowskiego**  
**pt. „Znaczenie FGFR2 w progresji i terapii luminalnych raków piersi”**  
wykonanej w Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej  
Instytutu Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej GUMed

Rak piersi jest jednym z częstszych nowotworów u kobiet i najczęściej diagnozowanym nowotworem w Polsce. Hormono-zależne, luminalne raki piersi, które wykazują ekspresję receptora estrogenowego (ER) stanowią znaczną większość spośród nowotworów piersi. Komórki luminalnych raków piersi, oprócz ER mogą także produkować receptor progesteronowy (PR), którego obecność w istotny sposób determinuje złośliwość nowotworu i jego odpowiedź na terapie. W ostatnich latach wykazano ścisłą kooperację pomiędzy ER i PR w modulacji ekspresji genów regulujących podstawowe procesy komórkowe, takie jak metabolizm czy proliferacja, co ma znaczenie w rozwoju guzów i ich odpowiedzi na leczenie. Dodatkowym czynnikiem, który wpływa na zachowanie komórek nowotworowych jest ich interakcja z otaczającym środowiskiem. Jednym z głównych przekaźników sygnałów w mikrootoczeniu guza jest system fibroblastycznych czynników wzrostu (FGF) oraz ich receptorów (FGFR). Białka FGF/FGFR przekazują sygnały z zewnątrz do wnętrza komórek, regulując ich różnicowanie, podział, metabolizm oraz śmierć. Grupa badawcza, której członkiem jest mgr Kamil Mieczkowski we wcześniejszych badaniach wykazała, że ER, PR oraz system FGFR są funkcjonalnie połączone, gdzie FGFR w sposób alternatywny (niezależny od kanonicznych ligandów) aktywuje ER oraz PR. Co ważne, współdziałanie ER, PR oraz FGFR może decydować o progresji choroby nowotworowej i jej odpowiedzi na stosowane terapie. W ten bardzo ciekawy i ważny nurt badań doskonale wpisuje się praca doktorska mgr Kamila Mieczkowskiego wykonana w Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej pod opieką naukową dr hab. Rafała Sądeja, prof. GUMed.

Wstęp teoretyczny pracy doktorskiej mgr Kamila Mieczkowskiego jest doskonale przygotowanym zbiorem informacji, który idealnie wprowadza w podjętą tematykę badawczą. Praca stopniowo przechodzi od klasyfikacji nowotworów piersi, poprzez budowę i funkcję ER oraz PR do strategii terapeutycznych celujących w luminalne nowotwory piersi. Następnie opisane są białka FGF/FGFR i ich udział w procesach nowotworzenia, ze szczególnym uwzględnieniem raków piersi. Zaznaczono też obecny stan wiedzy łączący system FGF/FGFR z białkami ER i PR oraz kliniczne znaczenie



tych interakcji. Przedstawione dane są merytorycznie poprawne, wszechstronne, a użyta bibliografia szeroka i aktualna. Podobnie, sekcje techniczne pracy („Materiały” i „Metody”) nie zawierają merytorycznych błędów i pozwalają na prześledzenie i ewentualne powtórzenie wykonanych eksperymentów.

Część eksperymentalną pracy doktorskiej mgr Kamil Mieczkowski rozpoczął od analizy wpływu szlaków sygnałowych FGF7/FGFR2 na wzrost komórek luminalnego raka piersi. Co warto podkreślić, eksperymenty były przeprowadzone z użyciem hodowli komórkowych 3D z uwzględnieniem tła hormonalnego w celu możliwie najlepszego naśladowania warunków panujących *in vivo* u pacjentek. To niewątpliwie mocna strona niniejszej pracy doktorskiej. Doktorant przekonująco wykazał, że FGF7 poprzez FGFR2 znosi hamujący proliferację komórek efekt progesteronu (P4) w linii T47D, co stanowiło ważny wstępny wynik do dalszych analiz. Co ciekawe, kombinacja estrogenu (E2) i FGF7 (pod nieobecność P4) gorzej stymulowała wzrost komórek niż samo E2, a efekt ten był zniesiony przez wyciszenie FGFR2 (Ryc. 5, Ryc. 7). Ten wynik nie został skomentowany w pracy, a w mojej opinii jest warty zauważenia, gdyż może wskazywać na udział ścieżki FGF7/FGFR2 w hamowaniu podziałów komórkowych indukowanych przez ER. Czy jest to bezpośrednie działanie FGFR2 na ER? Bardzo chciałbym poznać opinię/hipotezę mgr Kamila Mieczkowskiego dotyczącą tego wyniku.

Doktorant konkluduje na s.58: „Podsumowując, przeprowadzone analizy wzrostu komórek luminalnego raka piersi jednoznacznie wskazują na udział sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulacji odpowiedzi komórek na hormony steroidowe”. Ponieważ knock-down FGFR2 jednocześnie eliminuje sygnalizację FGFR2-zależną oraz sam receptor, przedstawione podsumowanie jest niejako nadinterpretacją. Doktorant na tym etapie pracy (dowody pojawiają się w dalszych częściach pracy) nie może wykluczyć, że FGF7/FGFR2 w sposób niezależny od przekazywania sygnału (np. przez fizyczną interakcję z ER/PR, lub w inny sposób niezależny od aktywności kinazy tyrozynowej) reguluje działanie hormonów steroidowych.

W pracy zawarto analizy szeregu linii komórkowych w celu doboru drugiego modelu odpowiedniego do prowadzonych badań. Jest to poprawne podejście, pozwalające na uniknięcie artefaktów i świadczące o dojrzałości naukowej doktoranta. Na podstawie testów proliferacyjnych oraz techniki western blotting z panelu przetestowanych linii do kolejnych analiz, oprócz T47D, wybrano linię CAMA-1. Wykazano, że wpływ FGF7 na działanie ER/PR dla linii CAMA-1 jest analogiczny jak uzyskany dla T47D, co znacząco wzmacnia uzyskane dane i potwierdza założoną hipotezę badawczą. Zastanawiająca jest natomiast migracja FGFR2 na przedstawionych blotach. W linii T47D FGFR2 na Ryc.





6 migruje w postaci pojedynczego prążka (potwierdzone wyciszeniem FGFR2), natomiast na Ryc. 9 w postaci dwóch prążków. Czy doktorant walidował w jakiś sposób który z prążków dla sygnału FGFR2 jest prawidłowy? Z czego wynika różnica w detekcji FGFR2 dla linii T47D między Ryc. 6 i 9? Uważam, że identyfikacja prążków FGFR2 jest szczególnie istotna pod kątem linii CAMA-1, w której sygnał dla FGFR2 jest bardzo słaby i obserwowany jako pojedynczy prążek. Czy doktorant próbował analizować poziom innych FGFR w badanych liniach? Ponieważ FGF7 (użyty w testach proliferacyjnych) może także oddziaływać z FGFR1 przedstawione w pracy dane w pełni nie wykluczają możliwości udziału FGFR1 w FGF7-zależnej regulacji ER/PR w linii CAMA-1.

Doktorant w kolejnych krokach przekonująco wykazał, że FGF7 w obecności E2 i P4 reguluje poziom PR. Tutaj chciałbym zwrócić uwagę na kilkukrotnie pojawiające się w pracy nieścisłość w postaci stwierdzenia, że FGF7 wpływa na poziom ekspresji PR (np. s.61, linia 7). Przeprowadzone testy pozwalają wyciągnąć jednoznaczny wniosek, że FGF7 wpływa na poziom PR, natomiast nie pozwalają stwierdzić, że FGF7 wpływa na poziom ekspresji tego białka (FGF7 może np. indukować degradację już istniejącego białka PR nie mając wpływu na ekspresję genu PR).

Przedstawione dane sugerują, że szlaki sygnałowe zależne od FGF7/FGFR2 indukują fosforylację na serynie 294 PR. Ponieważ obserwowane różnice w intensywności sygnału dla PR294 są stosunkowo niewielkie praca zyskałaby na densytometrycznej i statystycznej analizie tych sygnałów (podobnie jak wykonano na Ryc. 12D). Warte podkreślenia jest wychwycenie przez doktoranta zaskakującego wyniku dla E2+P4 dla linii T47D FGFR2 (-) (Ryc. 13) oraz ciekawa jego interpretacja.

Następnie mgr Kamil Mieczkowski podjął próbę analizy wpływu FGF7/FGFR2 na tworzenie kompleksu pomiędzy PR i ER. Na początku zastosowano ko-immunoprecypitację (Co-IP). Pomimo negatywnego wyniku tych testów (brak detekcji interakcji ER z PR) warty podkreślenia jest szereg prób optymalizacji i modyfikacji Co-IP, szczególnie podejście z zastosowaniem sieciowania molekularnego przez paraformaldehyd (PFA). W związku z eksperymentem z PFA chciałem się zapytać doktoranta czy wykrywano całe membrany, czy też przedstawione fragmenty (Ryc. 14). Sieciowanie molekularne prowadzi do wytworzenia stabilnych adduktów ER-PR (nie ulegających dekompozycji w SDS-PAGE) o masie odpowiadającej kompleksowi a nie pojedynczym białkom. W związku z tym kompleksy powinny wędrować znacznie wolniej na SDS-PAGE.

Jako alternatywę dla Co-IP zastosowano test PLA, który jest stosunkowo nową techniką pozwalającą na detekcję kompleksów stosując mikroskopię fluorescencyjną (FM). Stosując PLA, doktorant jednoznacznie wykazał negatywny wpływ FGF7 na formowanie kompleksów pomiędzy E2 i



P4 zarówno w komórkach T47D jak i CAMA-1. Co ciekawe, w większości przypadków kompleksy ER/PR zlokalizowane są w jądrze komórkowym, natomiast w przypadku E2+P4 dla CAMA-1 większość sygnału znajduje się poza jądrem (Ryc. 15B). Czy przedstawiony obraz jest reprezentatywny? Czy doktorant mógłby skomentować ten punkt? Czy kompleksy ER-PR są wykrywane w PLA pod nieobecność hormonów?

W kolejnym kroku zbadano wpływ FGF7/PR na regulację ekspresji genów zależnych od ER. W tym celu zastosowano RT Profiler PCR Array i wytypowano zestaw genów ER-zależnych modulowanych przez FGF7. Zidentyfikowane geny kodują szereg białek zaangażowanych w komórkowe mechanizmy onkogenne, co podkreśla wartość przeprowadzonych badań. Dla wybranych genów potwierdzono uzyskane wyniki z zastosowaniem testu qPCR. Następnie, stosując qPCR oraz inhibitory ścieżek sygnałowych zależnych od FGFR2 wykazano, że ścieżki PI3K/Akt, MAPK/JNK oraz Src mogą odpowiadać za obserwowane efekty FGF7/FGFR2 na aktywność ER w obecności E2/P4. Uzyskane wyniki potwierdzono w testach wzrostu komórek w hodowlach 3D z wytypowanymi inhibitorami.

Warte podkreślenia są również wyniki przedstawione w rozdziale 5.6. W sekcji tej doktorant wykazał, że odkryta zależność pomiędzy systemem FGF/FGFR może mieć znaczenie w leczeniu nowotworów piersi. Jednoznacznie wykazano, że FGF7 obniża skuteczność tamoksifenu, związku używanego w chemioterapii luminalnych nowotworów piersi. Podjęto również próbę połączenia molekularnych mechanizmów odkrytych *in vitro* z danymi klinicznymi (we współpracy z zespołem klinicystów z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi). Przeprowadzone analizy pozwoliły na wytypowanie FGFR2 jako dobry czynniki rokowniczy u pacjentek postmenopauzalnych z luminalnym rakiem piersi.

Pod kątem technicznym chciałbym zwrócić uwagę na brak informacji o słupkach błędów na przedstawionych w pracy wykresach. Czy przedstawiono średnią +/- SD czy SEM? W części wykresów analizę statystyczną przeprowadzono dla wszystkich wyników (np. Ryc. 5 czy Ryc. 11), natomiast w części testy statystyczne przedstawiono jedynie dla wybranych danych (Ryc. 7, Ryc. 18), lub w ogóle brakuje statystyki (Ryc. 12B, D, Ryc. 16). Dlaczego przyjęto taką metodykę? W danych z eksperymentów PLA brakuje paska skali przy zdjęciach FM na Ryc. 15.

Część „Dyskusja” jest wyczerpująca oraz merytorycznie poprawna. Brakowało mi w niej jedynie szerszego odniesienia do systemu FGF/FGFR. Czy tylko FGF7/FGFR2 spośród systemu FGF/FGFR są zaangażowane w regulację ER/PR? Czy podjęto próby/planowano analizy bezpośredniego oddziaływania białek FGF z ER-PR (szereg białek FGF zlokalizowanych jest w cytozolu/jądrze)? Czy podjęto próby zbadania wpływu miejscowo-specyficznej, zależnej od FGF7/FGFR2 fosforylacji ER/PR





na formowanie kompleksów ER-PR oraz na aktywność transkrypcyjną ER? Bardzo doceniłbym ustosunkowanie się doktoranta do tych niezwykle ciekawych naukowo kwestii.

### Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Kamila Mieczkowskiego zawiera oryginalne wyniki badań naukowych, które cechują się dużą nowatorskością oraz znaczeniem naukowym. Przedstawione badania stanowią logiczny, spójny, doskonale zaplanowany ciąg badań. Pracę naukową mgr Kamila Mieczkowskiego charakteryzuje szeroki wachlarz zastosowanych technik (hodowle 3D, techniki biochemiczne, mikroskopowe, techniki biologii molekularnej) oraz krytyczne podejście do uzyskanych wyników. Pod kątem redakcyjnym (poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, układ pracy oraz struktura podziału treści) przedstawiona praca doktorska przygotowana jest w sposób niemal bezbłędny, sposób prezentacji danych i ich analizy jest poprawny. W pracy znajdują się pojedyncze niedociągnięcia oraz nieścisłości merytoryczne (wymienione powyżej), co nie ma jednak większego wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej pracy. Co ważne, uzyskane wyniki wnoszą ważny wkład w stan wiedzy o ścieżkach przekazywanie sygnałów w nowotworach piersi i mogą znacząco przyczynić się do rozwoju nowego podejścia terapeutycznego celującego w FGFR2.

W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kamila Mieczkowskiego pt. „Znaczenie FGFR2 w progresji i terapii luminalnych raków piersi” spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych-nauki biologiczne. Wnoszę więc do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Kamila Mieczkowskiego oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Łukasz Opaliński