



ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 61 869 1427
61 869 1532
www.ckdm.ump.edu.pl

Poznań, dnia 27.03.2019 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Mieszkowskiej
pt. „Rola tetraspaniny CD151 w regulacji funkcji białek z rodziny ErbB – znaczenie
w progresji raka gruczołu piersiowego”,
w związku z powierzeniem obowiązku recenzenta
przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

1. Znaczenie podjętych badań

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Enzymologii Molekularnej Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a jej promotorem jest Pan dr hab. Rafał Sądaj.

Praca dotyczy próby zbadania roli tetraspaniny CD151 w procesach dimeryzacji białek rodziny ErbB. W szerszym kontekście praca miała na celu analizę znaczenia tych procesów dla przebiegu i skuteczności terapii przeciwnowotworowej opartej o Herceptynę. Tym samym, ambitnym celem Doktorantki była identyfikacja nowych ścieżek molekularnych o istotnym znaczeniu dla skuteczności leczenia raka piersi. Przez wzgląd na wieloczynnikowy charakter patogenezy tego nowotworu i złożoność procesów molekularnych jemu towarzyszących, tego typu założenia zawsze stanowią poważne wyzwanie w pracy badacza.

Praca została napisana w sposób spójny, logiczny i przejrzysty. Warto zaznaczyć, że część wyników zaprezentowanych w pracy została już opublikowana w czasopiśmie o nieprzeciętnej jakości. Podjęcie przez Doktorantkę wspomnianej tematyki stanowi kontynuację owocnych prac badawczych prowadzonych przez promotora rozprawy, a dotyczących m.in. udziału w patogenezie raka piersi takich czynników jak CD151 czy też sygnalizacji komórkowej lub identyfikacji markerów diagnostycznych i prognostycznych jak np. miRNA. Jak wiadomo, w obliczu rosnących wskaźników zachorowalności na nowotwory, w tym raka piersi, tego typu badania doskonale wpisują się w światowy trend ale i w potrzeby współczesnej medycyny molekularnej.

2. Ocena pracy

A) Ocena merytoryczna

We wstępie, obejmującym 22 strony, Doktorantka dokonuje zwięzłego opisu aspektów związanych z epidemiologią i klasyfikacją raka piersi. Ta gruntowna analiza obrazu klinicznego pozwala na zaprezentowanie uzasadnienia dla realizacji badań we wskazanym kierunku. Doktorantka podejmuje udaną próbę podsumowania wiedzy na temat znaczenia receptorów ErbB zarówno jako elementu prognostycznego ale i wpływającego na skuteczność terapii przeciwnowotworowej. Szczególnie aspekt praktyczny, kliniczny prezentuje najistotniejszą wartość pracy. Tak przygotowany wstęp stanowi istotne uzasadnienie dla podjęcia zaproponowanych działań w ramach pracy. W stosownych miejscach znalazły się ryciny, które jasno obrazują przedmiotowy kontekst rozprawy i znacząco wzbogacają pracę oraz ułatwiają podążanie za ideą Autorki.

Należy jednak zaznaczyć, że w założeniach i celu pracy Doktorantka bardzo lakonicznie prezentuje koncepcję poszczególnych jej etapów. W mojej ocenie doprecyzowanie strategii działania na pewno znacząco poprawiłoby odbiór złożonej przecież pracy i pomogło w śledzeniu realizacji poszczególnych jej etapów. Może dobrym podejściem byłoby stworzenie hipotezy badawczej i schematu kolejnych etapów jej weryfikacji. Przedstawione cele pracy zostały podane bardzo szczegółowo ale zabrakło nieco kontekstu i szerszego omówienia znaczenia ich realizacji i wpływu na poszerzenie wiedzy w przedmiotowym zakresie.

Materiały i metody przedstawiono na zaledwie 12 stronach ale w tym przypadku jest to uzasadnione. Doktorantka szczegółowo charakteryzuje stosowane podłoża, bufory, odczynniki i przeciwciała wskazując ich pochodzenie. Podstawą do uzyskania przełomowych wyników było zastosowanie tak innowacyjnych metod biologii molekularnej jak transdukcja wektorem lentiwirusowym, cytometria przepływowa czy immunoidentyfikacja lub hodowle 3D. Zastosowanie tak szerokiego panelu bardzo nowoczesnych i miarodajnych metod diagnostycznych zdecydowanie podnosi walory poznawcze pracy.

Wyniki przedstawione zostały na 25 stronach, są bogato ilustrowane rycinami i fotografiami oraz opisują kolejne etapy realizacji rozprawy.

Analiza dotyczy głównie linii komórkowych nowotworowych (HB2, MCF7, SKBR3 i BT474) oraz linii referencyjnej, nienowotworowej tj. MCF10A. Każda z tych linii w sposób naturalny i oczywisty różni się statusem ekspresji receptora ErbB2.

To część najważniejsza i najciekawsza z całej pracy. Autorka prezentuje udział CD151 w aktywności metabolicznej mierzonej ich potencjałem proliferacyjnym. Jest to o tyle cenne, że analiza dotyczy hodowli w układzie 3D. Część ta została poprawnie udokumentowana i poddana szczegółowej, adekwatnej analizie. Aczkolwiek wyniki okazały się być na tyle niejednoznaczne, że autorka zasugerowała, prawdopodobnie słusznie, plejotropowy efekt CD151.

Kolejny etap badań obejmował oznaczenie parametrów proliferacyjnych badanych komórek w kontekście zastosowania Herceptyny i ocenę udziału w tym procesie CD151. W tej części wykazano, że odpowiedź raka piersi na terapię Herceptyną może być warunkowana sygnalizacją komórkową inicjowaną przez heterodimer ErbB2/ErbB3. Wyniki te wydają się potwierdzać kolejne dane pokazujące rolę hereguliny w stymulacji wzrostu komórek o wysokim poziomie receptora ErbB2 (komórki linii SKBR3 oraz BT474). Co więcej, w liniach tych Autorka wskazała na rolę CD151 w odpowiedzi komórek na Herceptynę. Analiza funkcjonalna potwierdziła zniesienie przez to białko stymulującego wpływu hereguliny na proliferację wskazanych komórek oraz jego udział w uwrażliwianiu komórek nowotworowych na działanie Herceptyny. W dalszych etapach pracy Doktorantka koncentruje się na wykazaniu ścieżki sygnalizacyjnej pośredniczącej w mechanizmie indukowanym CD151. Podobnie, Autorka wykazała rolę CD151 w procesie uwrażliwiania komórek na działanie Pertuzumabu na drodze hamowania heterodimeryzacji kompleksu ErbB2/ErbB3.

Podsumowując, białko CD151 zostało wskazane jako istotny element biorący udział w mechanizmie uwrażliwiania komórek nowotworowych na drodze regulacji dimeryzacji receptorów ErbB2/ErbB3. Takie wnioski dają szansę na rozwinięcie i postęp badań w zakresie terapii uzupełniającej w leczeniu opornych nowotworów.

W **Dyskusji** wyników przedstawionej na 6 stronach Doktorantka dokonała rzeczowej analizy uzyskanych wyników w zestawieniu ze światowymi danymi literaturowymi. Interpretacja uzyskanych wyników jest logiczna ale i krytyczna. Autorka podkreśla momenty, w których jej wyniki znajdują potwierdzenie w danych literaturowych ale i podkreśla nowatorski charakter odkryć. Ta część pracy wydaje się szczególnie wartościowa, ponownie wielowątkowa ale i ostrożna.

Integralna część pracy to 2 zwięzłe (jak na ogrom materiału i uzyskanych wyników) **streszczenia**, odpowiednio w języku polskim i angielskim, a znajdujące się na początku pracy. W ocenie recenzenta pozostaje pewien niedosyt w świetle braku podsumowania w postaci konstruktywnych wniosków.

B) Strona formalna

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie z zastosowaniem standardowych i najnowocześniejszych technik biologii molekularnej, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników o kluczowym znaczeniu dla poznania mechanizmów towarzyszących procesom nowotworzenia ale i diagnostyki oraz ich leczenia.

Rozprawa doktorska napisana jest w układzie klasycznym, obejmuje 93 strony z uwzględnieniem szczegółowego spisu treści, który ułatwia poruszanie się po dość bogatej pracy. Praca przygotowana jest bardzo starannie i jednocześnie ciekawie. W pracy pojawiły się nieliczne błędy edytorskie i zapożyczenia z języka angielskiego.

Z drobnych ale istotnych uwag - wydaje się, że trudno przygotować roztwór 4% formaldehydu jeśli dodaje się go 2g na 100ml buforu. Zdaniem recenzenta, wartości szybkości wirowania powinny być podawane w jednostkach „g” a nie w RPM. Trudno również znaleźć informację odnośnie sposobu pomiaru wzrostu kultur 3D – czy był to pomiar oparty na objętości, powierzchni czy średnicy sferoid? Należy też podkreślić, że liczenie kolonii może nie do końca odzwierciedlać właściwości proliferacyjne komórek gdyż potencjał klonogenności może wynikać z uwarunkowań związanych z właściwościami choćby adhezyjnymi czy komunikacyjnymi komórek. Trochę niejasne pozostaje podejście do samego sposobu liczenia kolonii – w sekcji Metody podana jest informacja o mierzeniu co najmniej 50 kolonii podczas gdy w części wynikowej podana jest informacja o liczeniu całkowitej liczby kolonii. Reasumując, informacje te są rozbieżne, a może raczej po prostu niekompletne w zakresie opisu metody. Zdjęcia wkomponowane w rycinę nr 21 wydają się być uzyskane za pomocą różnych obiektywów lub Autorka pominęła w opisie istotne zmiany morfologiczne komórek hodowanych w różnych warunkach. Przy tej okazji powstaje pytanie - jak oceniać sygnał jeśli pochodzi z innej liczby komórek, co jest wyraźnie widoczne na zdjęciu. Ostatni drobniaczek jaki powtarza się kilkakrotnie to określenie *prycypitacja* zamiast precypitacja (np. str. 63).

Nasuwa się też jeszcze jedno pytanie aczkolwiek w dużo szerszym kontekście – czy model kultur 3D, zastosowany przez Doktorantkę, może być rozpatrywany w badaniach naukowych bezkrytycznie biorąc pod uwagę zjawisko hipoksji oraz biodostępności leków/substancji terapeutycznych?

Podsumowując, należy zaznaczyć, że Autorka wykazała się dużą dozą doświadczenia manualnego i merytorycznego oraz zaprezentowała krytyczne podejście do uzyskanych, bardzo wartościowych wyników. Zanotowane obserwacje zostały bardzo dobrze

udokumentowane. Źródła literaturowe dobrano bardzo dobrze aczkolwiek zabrakło kilku pozycji najnowszych.

4. Wniosek końcowy

Doktorantka porusza w rozprawie bardzo aktualny, ciekawy i jednocześnie trudny temat. Sposób prezentacji uzyskanych wyników oraz cała praca robią bardzo pozytywne wrażenie, co daje efekt nadążania formy za przebogatą i wartościową treścią.

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 Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Magdaleny Mieszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wnikliwą analizę uzyskanych wyników oraz w związku z faktem ich opublikowania w bardzo poczytnym czasopiśmie tj. *Translational Research* wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem



Dr hab. Błażej Rubiś, prof. UM