

Prof. dr hab. Dariusz Rakus
Katedra Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Sienkiewicza 21
50-335 Wrocław

Wrocław, 15.12.2020

OCENA

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Urbaniak
pt. „Wpływ białka indukowanego prolaktyną na apoptozę komórek raka gruczołu
piersiowego wywołaną doksorubicyną”**

Oporność komórek nowotworowych na chemioterapię jest jedną z najważniejszych przyczyn niepowodzeń w leczeniu nowotworów złośliwych, a szczególnie nowotworów w późnym stadium zaawansowania.

Przyczyny owej lekooporności różnych nowotworów są niestety bardzo różnorodne, nie ograniczone do jednego mechanizmu, tak więc poznanie ich w całym bogactwie nowotworów wydaje się być koniecznym dla opracowania skutecznym metod terapeutycznych.

Badania prowadzone od lat przez zespół profesora Piotra Dzięgła dotyczą odkrywania i poznawania biologii różnych białek, które mogłyby być wyznacznikami różnych stadiów zaawansowania rozwoju różnych nowotworów. Tym samym, mogą one być potencjalnie celem działania terapii przeciwnowotworowych.

Tym razem wybór padł na raka gruczołu piersiowego oraz białko, którego ilość wydaje się odwrotnie korelować z możliwością skutecznej chemioterapii z wykorzystaniem doxorubicyny i cyklofosfamidu: na Białko Indukowane Prolaktyną (Prolactin Induced Protein, PIP).

Ekspresja PIP (zarówno na poziomie mRNA jak i białka) zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości.

Co więcej, guzy pacjentek z niskim poziomem PIP w komórkach nowotworowych są bardziej odporne na leczenie doksorubicyną i cyklofosfamidem niż guzy od pacjentek z wysokim poziomem jego ekspresji.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 17.12.2020
L.dz. 832

Bazując na tych danych, Doktorantka wraz z Promotorem postawili hipotezę, iż białko PIP wpływa na odpowiedź raków gruczołu piersiowego na standardową chemioterapię.

Ażeby zweryfikować ową hipotezę, Pani mgr Anna Urbaniak przeprowadziła eksperymenty, w których zbadała wpływ białka PIP na przeżywalność komórek nowotworowych oraz apoptozę indukowaną trzema cytostatykami (doksorubicyną, cyklofosfamidem i paklitakselem). Komórkami, które wykorzystano do badań były komórki raka gruczołu piersiowego MDA-231 i komórki T47D oraz ich genetycznie zmodyfikowane formy: MDA-231/PIP (z niedekspresją białka PIP) i T47Dpuro/shPIP (z obniżoną ekspresją białka PIP).

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Panią Annę Urbaniak są niezwykle intrygujące i pokazują jak zawiłym zagadnieniem są badania biomedyczne i do jak niepoprawnych wniosków mogą prowadzić poprawnie wykonane doświadczenia. Ta uwaga dotyczy nie wyników i wnioskowania Pani Anny Urbaniak, lecz innych badaczy, z którymi – chcąc, nie chcąc – Doktorantka musi polemizować.

Niezależnie od tego, należy podkreślić, że część wyników Pani Anny Urbaniak została już doceniona przez Świat Naukowy, na co dowodem jest publikacja w renomowanym czasopiśmie naukowym *Am. J. Cancer Res.* ('Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression'). W pracy tej Pani Anna Urbaniak jest pierwszym autorem.

W trakcie swoich badań Doktorantka pokazała, że w hodowlach komórkowych, białko PIP:

- a) nie zmienia potencjału proliferacyjnego komórek raka gruczołu piersiowego, ani nie wpływa na przebieg cyklu komórkowego,
- b) zwiększa wrażliwość komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną cytostatykami.

Zwiększoną wrażliwość na indukcję apoptozy Doktorantka zaobserwowała także *in vivo*, w mysim modelu raka gruczołu piersiowego.

Co ciekawe, w tymże modelu *in vivo*, Pani Anna Urbaniak zaobserwowała znacznie większe rozmiary guza w komórkach nadeskpresjonujących PIP, co pozornie jest w sprzeczności z badaniami przeprowadzonymi z wykorzystaniem hodowli komórkowych.

Ponieważ jednakże białko PIP jest białkiem wydzielniczym i działa jako białko zewnątrzkomórkowe, toteż Doktorantka – po przeprowadzeniu badań asocjacji rekombinowanego białka PIP do błon komórkowych – stwierdziła, że białko to oddziałuje na

komórki raka gruczołu piersiowego zewnątrzkomórkowo, wiążąc się prawdopodobnie do białka błonowego (oszacowała także eksperymentalnie masę takiego receptora PIP na 55 kDa). Taka sygnalizacyjna rola PIP jest w zgodzie z wynikami Doktorantki, która pokazała, że indukcja apoptozy przez cytostatyki w komórkach nadespresjonujących PIP związana jest z aktywacją kaspaz szlaku zewnętrznego indukcji apoptozy.

Jak dla mnie, to bardzo przekonująca argumentacja, tym bardziej, że Doktorantka przeprowadziła prosty (a więc i piękny) eksperyment: dodała rekombinowane białko PIP do hodowli komórek raka gruczołu piersiowego i obserwowała, że w obecności doksorubicyny i PIP indukcja apoptozy jest znacznie wyższa niż pod nieobecność białka PIP. Ważnym jest także to, że stężenia, w których PIP zwiększała wrażliwość na doksorubicynę były w zakresie nanomolowym, co może odzwierciedlać fizjologiczne stężenia tego białka.

Swoją drogą: ciekawym byłoby stwierdzenie także zmian w tempie proliferacji oraz cyklu komórkowym wywołanym dodaniem do medium hodowlanego rekombinowanego białka PIP. Innym doświadczeniem, które pokazałoby, że efekt nadekspresji i wyciszenia PIP na badane komórki jest głównie pochodną stężenia PIP w medium hodowlanym (a nie poziomu PIP wewnątrz komórek) byłoby prześledzenie zachowania się tych komórek (indukcji apoptozy, tempa proliferacji) w hodowlach, w których medium hodowlane zmieniane byłoby wystarczająco często, ażeby zapobiec gromadzeniu się wydzielanego przez komórki PIP. Być może nie zaobserwowano by zmian podatności na apoptozę komórek nadekspresjonujących PIP? No, ale to tylko dodatkowe eksperymenty, niekonieczne dla konkluzji tej rozprawy doktorskiej.

Wyniki przedstawione w przez Pani Anną Urbaniak, poza wartościami poznawczymi, pokazują jej bardzo wysoki poziom umiejętności posługiwania się nowoczesnymi i bardzo zróżnicowanymi technikami badawczymi z zakresu biochemii, histologii, biologii komórkowej i molekularnej oraz pracy z modelami zwierzęcymi.

Zadaniem recenzenta jest jednak nie tylko utwierdzenie Doktoranta (i Promotora) w poglądzie, że jego praca/wyniki jest doskonała, lecz także wskazywanie uchybień i błędów. O ile nie mam wątpliwości, że wyniki są bardzo wartościowe, to mam kilka uwag do rozprawy. Są to jednakże uwagi głównie natury edytorskiej.

I tak, nie wszystkie pozycje literaturowe cytowane w pracy są ujęte w spisie literatury. Np. praca Wang i wsp., 2018 (cytowana na stronie 113, w akapicie drugim) nie występuje w

spisie literatury, a jest to praca istotna, chociaż niekoniecznie odzwierciedlająca rzeczywistość.

Cieszę się natomiast, że Doktorantka opisując test MTT napisała, że odzwierciedla on nie tyle ilość komórek, co ich aktywność metaboliczną. Tutaj jednak chciałbym zaznaczyć, że test MTT nie mówi o liczbie aktywnych metabolicznie komórek, ale o średniej aktywności metabolicznej dużej populacji komórek.

Typowym błędem w opisie technik (popożyczanym w najlepszych czasopismach), którego nie ustrzegła się Doktorantka jest podawanie napięcia prądu podczas elektroforezy białka w żelu poliakrylamidowym. Powinno się podawać natężenie prądu.

Innym powszechnym błędem jest pisanie znaku równa się („=”) po symbolu „pH”. Doktorantka czasami nie wstawia znaku „=” (co jest prawidłowe), a czasami wstawia.

W trakcie pisania tak obszernej rozprawy trudno uniknąć niebytnych zgrabnych konstrukcji literackich i wydaje mi się, że np. taką niezgrabnością jest stwierdzenie, iż białko PIP „oczyszczono z nasienia” (strona 20). Chyba lepiej napisać, że białko PIP zostało wyizolowane z nasienia. Zasadniczo jednak pracę czyta się bardzo dobrze.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pani Anny Urbaniak jako bardzo ciekawą i dobrze napisaną, a wspomniane przez mnie drobne uwagi nie obniżają oceny całości rozprawy. Nie mam więc żadnych wątpliwości, że odkrycia Doktorantki nie tylko wnoszą istotną wiedzę dotyczącą biologii raka i metod terapii przeciwnowotworowej, ale także pokazują jak istotnym jest przeanalizowanie działania całego systemu biologicznego

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy 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. oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu z propozycją nagrodzenia rozprawy.

Wrocław, 15.12.2020



Prof. dr hab. Dariusz Rakus