

Łódź, dnia 13 czerwca, 2019 r.



dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Molekularnej, UŁ
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: aneta.balcerczyk@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Wawro

pt.: „Rola podjednostek tubulin klasy β w przemianie śródbłonkowo-mezenchymalnej”

Promotor: Prof. dr hab. Jolanta Niewiarowska

Promotor pomocniczy: Dr inż. Katarzyna Sobierajska

W przedstawionej do recenzji dysertacji Pani mgr Marta Wawro podejmuje ambitną próbę zdefiniowania roli globularnych białek cytoszkieletu komórkowego, tubulin klasy β , w przemianie śródbłonkowo-mezenchymalnej. Temat rozprawy jest szalenie ciekawy, niezwykle aktualny i bardzo ważny, w szczególności z perspektywy chorób zwióknieniowych, ale i chorób nowotworowych, w przypadku których przemiana śródbłonkowo-mezenchymalna (EndMT) przyczynia się do progresji nowotworu. Wzmagając zdolności komórek do migracji i inwazyjności EndMT może powodować zmianę niezłośliwej formy nowotworu w lokalnie agresywną i inwazyjną postać. Dlatego też, tak ważne jest dogłębne zrozumienie mechanizmów regulujących proces przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej, m.in. z poziomu tubulin klasy β , które jak pokazują wyniki uzyskane przez Doktorantkę, mogą w znaczący sposób przyczynić się do rozwoju nowej formy terapii wspomagającej leczenie chorób nowotworowych.

Trzon rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Wawro stanowi cykl 3 tematycznie spójnych prac o łącznym współczynniku oddziaływania (IF, *Impact Factor*) 11,311, opublikowanych w dobrych czasopismach naukowych: *Cellular Signalling* i *International Journal of Molecular Sciences*. Łączny IF dorobku publikacyjnego Doktorantki jest bardzo wysoki (21,141), co jest znakomitą wizytówką poziomu naukowego promotorów – prof. dr. hab. Jolanty Niewiarowskiej i dr inż. Katarzyny Sobierajskej. We wszystkich trzech publikacjach wchodzących w skład cyklu tematycznego Pani mgr Marta Wawro jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej znaczącym udziale w powstawaniu prac, niemniej jednak zabrakło mi oświadczenia w którym Doktorantka wyszczególniłaby swoje

zaangażowanie. W oparciu o załączone oświadczenia współautorów należy zaznaczyć istotną pomoc ze strony promotora i promotora pomocniczego na wszystkich etapach powstawania publikacji począwszy od sprawowania pieczy nad częścią eksperymentalną po przygotowywanie manuskryptów. Wsparcie w takim wymiarze jest szczególnie istotne dla rozwoju i kształtowania się młodego naukowca.

Prezentacja publikacji, stanowiących treść niniejszej rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Wawro, została wykonana w postaci monografii, znakomicie prezentującej podejmowaną tematykę badawczą i dyskutującą wyniki opublikowane w trzech wyżej wspomnianych publikacjach w sposób spójny i co ważne całościowy. Na monografię składają się następujące rozdziały: informacje wprowadzające ze wskazaniem źródła finansowania, wstęp, cele, metody, dyskusja uzyskanych wyników, wnioski końcowe, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, bibliografia, publikacje stanowiące trzon niniejszej rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów i wykaz dorobku naukowego doktorantki.

Wstęp otwierający ocenianą rozprawę zawiera istotne informacje ogólne odnośnie przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej i jej znaczenia w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych. Doktorantka w zwięzły sposób omówiła budowę i reorganizację cytoszkieletu komórkowego skupiając się na roli mikrotubul w przemianie śródbłonkowo-mezenchymalnej ze wskazaniem struktur mikrotubularnych jako celu terapii przeciwnowotworowych i chorób o podłożu zwłóknieniowym. Sposób napisania części teoretycznej stanowi jednocześnie uzasadnienie dla postawionej hipotezy badawczej dotyczącej potencjalnego zaangażowania tubulin klasy β w przemianę śródbłonkowo-mezenchymalną.

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Doktorantka w 3 punktach przedstawiła plan swoich badań obejmujący:

- (i) analizę poziomu tubulin klasy β i ich modyfikacji potranslacyjnych;
- (ii) zdefiniowanie roli cytoszkieletu tubulinowego w regulacji kształtu i ruchu komórek;
- (iii) ocenę wpływu chemioterapeutyków na reorganizację mikrotubul.

Do realizacji celów rozprawy Doktorantka wykorzystwała linię ludzkich nieśmiertelnych komórek śródbłonka mikronaczyniowego (HMEC-1) przed i po zadziałaniu transformującego czynnika wzrostu $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) oraz medium kondycjonowane z nad hodowli ludzkich komórek raka jelita grubego postaci przedinwazyjnej (LS180), jaki i inwazyjnej (LS180Snail, LoVo).

Wachlarz metod zastosowanych do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej jest bardzo szeroki i obejmuje techniki biochemiczno-immunofluorescencyjne, biologii komórki, biologii molekularnej, za pomocą których Doktorantka dokonuje m.in. transfekcji komórek, oceny ekspresji

genów na poziomie transkryptu i na poziomie białka, analizy migracji komórek czy lokalizacji markerów analizowanych procesów biochemicznych.

Pierwsza praca z cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy opublikowana w 2017 roku w *Cellular Signalling* dotyczy identyfikacji zaangażowania dwóch izoform tubulin klasy β (3 i 4) w proces reorganizacji mikrotubul dokonujący się w przemianie śródbłonkowo-mezenchymalnej. Badania przeprowadzone na linii HMEC-1 z (i) farmakologicznie (TGF- β 1) i (ii) genetycznie (transfekcja wektorem ekspresyjnym kodującym czynnik transkrypcyjny SNAIL) indukowaną przemianą EndMT, wykazały, że w zastosowanych modelach badawczych tubuliny β 3 i β 4 uczestniczą w procesie wydłużania i polimeryzacji mikrotubul, migracji komórek, jak również ułatwiają transport N-kadheryny do błony plazmatycznej.

W drugiej pracy opublikowanej w 2019 roku w *International Journal of Molecular Sciences* zastosowano inny model przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej wykorzystując medium kondycjonowane z hodowli komórek raka jelita grubego traktowanym transformującym czynnikiem wzrostu β 2 (TGF- β 2). Wykazano, że substancje wydzielane przez inwazyjne komórki raka jelita grubego LoVo oraz LS180 z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego SNAIL indukują zmiany w komórkach śródbłonka mikrowaskularnego HMEC-1 prowadząc do powstania fenotypu fibroblastów towarzyszących nowotworom (CAFs) i że u podstaw tych zmian leży fosforylacja i podwyższony poziom ekspresji tubuliny β 3.

W ostatniej z cyklu trzech prac opublikowanej w 2019 roku w *International Journal of Molecular Sciences* Doktorantka łączy zidentyfikowane w ramach wcześniejszych badań zmiany w cytoszkieletcie HMEC-1 podczas przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej, ze zjawiskiem lekooporności, znacząco ograniczającej efektywność chemioterapii poprzez zmniejszenie efektywnego stężenia wewnątrzkomórkowego leku na skutek jego ograniczonego transportu do wnętrza komórki nowotworowej, bądź wzmożonego wyrzutu leku na zewnątrz. Przeprowadzone badania z użyciem alkaloidu *Vinca*, winkrystyny, wykorzystywanej w leczeniu raka jelita grubego, wykazały, że lek sprzyja powstawaniu fenotypu fibroblastów towarzyszących nowotworom (CAFs), zaś niesteroidowe leki przeciwzapalne odwracają ten stan.

Chciałabym prosić Doktorantkę o komentarz, czy Jej zdaniem w świetle przedstawionych w ramach niniejszej rozprawy danych niesteroidowe leki przeciwzapalne można łączyć z innymi lekami, stosowanymi w leczeniu chorób o podłożu zwłóknieniowym i w terapiach przeciwnowotworowych, np. taksanami, w przypadku których zidentyfikowano szereg skutków ubocznych, m.in. indukowanie oporności wielolekowej?

Badania ostatnich lat podkreślają rolę diety jako czynnika wspomagającego leczenie szeregu stanów patologicznych, m.in. w zakresie regeneracji organizmu po chemioterapii. Ponieważ wykorzystywana przez Doktorantkę w badaniach winkrystyna i dyskutowane taksany są pochodzenia

naturalnego, w ramach dyskusji chciałabym zapytać czy wiadomo aby związki o dużym potencjale antyoksydacyjnym jak substancje obecne w soku z granatu (*Punica granatum*) kwas elagowy/kwas galusowy, galusan epigallokatechiny (EGCG, główna katechina zielonej herbaty) czy polifenole, miały potencjał oddziaływania na tubuliny klasy β czy obniżania ekspresji TGF- β 2, indukującego przejście śródbłonkowo-mezenchymalne i fenotyp fibroblastów towarzyszących nowotworom?

Sumaryczna dyskusja, którą Pani mgr Marta Wawro przedstawiła w rozprawie doktorskiej jest syntetyczna i świadczy o bieżącej znajomości przez Doktorantkę zagadnień związanych z mechanizmem przemiany śródbłonkowo-mezenchymalnej z poziomu białek cytoszkieletu komórki. Mgr Marta Wawro w sposób krytyczny dokonała przejrzystej analizy oraz interpretacji własnych wyników w oparciu o dostępne piśmiennictwo.

Monografię kończą prawidłowo wyciągnięte wnioski, wynikające ze szczegółowo zaplanowanej doskonale zrealizowanej i opublikowanej części eksperymentalnej pracy. Streszczenie w języku polskim i angielskim oddaje charakter przeprowadzonych badań i nie budzi zastrzeżeń.

Rozprawa jest opracowana bardzo starannie pod względem językowym, stylistycznym i edytorskim. Czyta się ją z dużą przyjemnością, niemniej jednak Doktorantka nie ustrzegła się drobnych niezręczności językowych, m.in. na stronie 9 Doktorantka pisze, że „komórki śródbłonka poddano....działaniu komórek nowotworowych” mając pewnie na myśli medium kondycjonowane znad komórek nowotworowych. Ponadto w mojej opinii trafniejsze byłoby użycie sformułowania „lekooporność” niż „chemiooporność”, choć ta forma jest coraz częściej używana w określeniu niewrażliwości komórek na chemioterapeutyki. Na stronie 12 Doktorantka zaznacza, iż dokonywano „deplecji poszczególnych czynników wzrostu”. Czy nie trafniejsze byłoby określenie ‘deprywacji’?

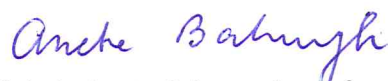
Rozprawa została wykonana w ramach polsko-norweskiej współpracy badawczej, projektu MOMENTO. Dorobek naukowy Pani mgr Marty Wawro znakomicie odzwierciedla Jej pasję do nauki i zaangażowanie w pracę badawczą i obejmuje: 5 prac oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, 2 prace przeglądowe opublikowane w *Postęпах Biochemii*, 2 wystąpienia ustne i 17 doniesień konferencyjnych. Ponadto Doktorantka uczestniczyła w 2 projektach międzynarodowych i 1 uczelnianym dedykowanym młodym naukowcom, w którym sprawuje funkcję kierownika projektu.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Marty Wawro pt.: „Rola podjednostek tubulin klasy β w przemianie śródbłonkowo-mezenchymalnej”. Na wysoką wartość merytoryczną pracy, składają się zarówno oryginalna tematyka badawcza, umiejętnie dobrane metody weryfikujące postawione cele badawcze, jak i zakres przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością zagadnień etiologii i biologii chorób

nowotworowych i schorzeń o podłożu zwłóknieniowym w zakresie obejmującym temat Jej badań, znajomością szeregu technik badawczych oraz umiejętnością krytycznej analizy i interpretacji wyników.

W mojej opinii przedłożona do oceny rozprawa mgr Marty Wawro stanowi znaczący wkład w rozwój uprawianej przez Nią dziedziny i odpowiada warunkom dla rozprawy na stopień doktora określonym przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym bez żadnych zastrzeżeń popieram wnioski o nadanie mgr Marcie Wawro stopnia doktora nauk medycznych i zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Wawro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę oryginalność pracy i jej bardzo wysokie walory poznawcze oraz publikację wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Wawro w przyjęty na Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi sposób.



dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki