

Łódź dn.15.05. 2016.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota
Kierownik Zakładu Molekularnych Podstaw Medycyny
I Katedra Chorób Wewnętrznych UM w Łodzi

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Rudzińskiej

p.t. „Rola Prox1 w ścieżkach sygnalizacyjnych kontrolujących przerzutowanie zróżnicowanych raków tarczycy ”

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Barbara Czarnocka
Kierownik Zakładu Biochemii I Biologii Molekularnej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Wypełniając obowiązki Recenzenta w przewodzie doktorskim Pani mgr Magdaleny Rudzińskiej , przedkładałam recenzję rozprawy doktorskiej pt. „Rola Prox1 w ścieżkach sygnalizacyjnych kontrolujących przerzutowanie zróżnicowanych raków tarczycy ”, przygotowanej pod kierownictwem Pani Prof. dr hab. n. med. Barbary Czarnockiej.

Nowotwory tarczycy uznane są za najczęstsze nowotwory gruczołów wydzielania wewnętrznego. Wśród nich raki tarczycy – stanowiące ok 95% wszystkich nowotworów złośliwych tarczycy – mogą stanowić poważny problem medyczny ze względu na swoją heterogenność biologiczną, złożoną patogenezę i przebieg kliniczny. Wciąż poszukuje się nowych metod diagnostycznych, które wspomagałyby rutynową diagnostykę nowotworów złośliwych tarczycy.

Warto też podkreślić, że badania dotyczące mechanizmów nowotworzenia na każdym jego etapie, identyfikacja zaangażowanych w ten proces genów czy komórkowych szlaków sygnalizacyjnych ma oprócz aspektu diagnostycznego, istotne znaczenie terapeutyczne, jako podstawa dla opracowania nowych metod leczniczych. Dlatego też, diagnostyka i terapia raka tarczycy wymaga współpracy specjalistów wielu dyscyplin naukowych z zakresu medycyny jak i biologii molekularnej i genetyki.

Postęp, który nastąpił w ostatnim czasie w zakresie biologii molekularnej, stwarza realne możliwości opracowania wielu nowoczesnych metod diagnostycznych służących przede wszystkim poszukiwaniu wczesnych markerów diagnostycznych, czy markerów prognostycznych, związanych ściśle ze zróżnicowaną biologią i mechanizmami rozsiewu raków tarczycy. I właśnie temu zagadnieniu poświęcona jest niniejsza rozprawa doktorska.

Głównym celem badawczym założonym w pracy była ocena czynnika transkrypcyjnego typu homeobox (Prox-1) w procesie przerzutowania zróżnicowanych raków tarczycy (raka brodawkowatego; PTC i pęcherzykowego tarczycy; FTC), z uwzględnieniem oceny wybranych markerów proliferacji, przeżywalności, potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek nowotworowych.

Oceniana praca mgr Magdaleny Rudzińskiej ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. W części wstępu w sposób bardzo jasny uzasadniono założenia pracy, precyzyjnie nakreślone zostały cele badawcze, zamieszczono dokładny opis metod badawczych, wyczerpująco omówione zostały wyniki oraz przedstawiono interesującą i dojrzałą dyskusję. Wyniki pracy badawczej pozwoliły na sformułowanie 5 wniosków, będących trafnym zwieńczeniem dysertacji doktorskiej. Recenzowana rozprawa zawiera 128 stron tekstu. W tym: wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy (5 str.), wprowadzenie-wstęp (26 str.), cele pracy (1 str.), materiał i metody (24 str.), oraz najobszerniejszą część - wyniki (36 str.), dyskusja i wnioski (14 str.), streszczenie w języku polskim (2 str.) i angielskim (3 str.), piśmiennictwo (9 str.). We wstępie Autorka zamieszcza aktualne dane epidemiologiczne dotyczące raków tarczycy w Polsce i na Świecie. Przedstawia klasyfikację histologiczną nowotworów złośliwych gruczołu tarczowego. Charakteryzuje także rolę procesu angiogenezy i limfangiogenezy w chorobach nowotworowych, opisuje szereg istotnych markerów angiogenezy i limfangiogenezy, markerów dla komórek śródbłona limfatycznego (LECs; *lymphatic endothelial cells*),

włączając czynnik transkrypcyjny typu homeobox związany z Prospero-1 (Prox1). Charakteryzuje jego strukturę i istotną rolę w procesach związanych z przerzutowaniem w różnych typach nowotworów złośliwych u ludzi (rak jelita grubego, nowotworów głowy i szyi, czy OUN), podkreślając niedostateczną wiedzę co do znaczenia Prox1 w procesie naciekania i przerzutowania zróżnicowanych raków tarczycy. W dalszej części wstępu charakteryzuje etapy nowotworzenia, łącząc je z szeregiem zmian genetyczno-epigenetycznych. Dokładnie charakteryzuje proces przerzutowania komórek rakowych, kładąc szczególny nacisk na procesy inwazji i migracji komórek nowotworowych, oddziaływania z macierzą zewnątrzkomórkową ECM (ang. *extracellular matrix*), jak i rolę przejścia nabłonkowo- mezenchymalnego EMT (ang. *epithelial -mesenchymal transition*) w onkogenezie. Charakteryzuje znaczenie białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe i kontakt z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) w tym: E-kadheryn, cytokeratyn, lamininy-1, integryn jak i kinazy tyrozynowej ogniskowo-adhezyjnej FAK (ang. *focal kinase adhesion*) uczestniczącej w przekazywaniu sygnału pochodzącego z receptorów

integrynowych, biorących udział w adhezji, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek.

Wszystkie podrozdziały wstępu są dobrze zaplanowane, ilustrowane dużą liczbą rycin i zdjęć. Taki sposób prezentacji tematu świadczy o zrozumieniu złożonych zależności uczestniczących w procesie transformacji nowotworowej oraz o dojrzałości Doktorantki jako początkującego naukowca. W świetle przedstawionego przeglądu literaturowego, cele badawcze postawione w pracy są trafnie sformułowane i nowatorskie; obejmowały:

- Analizę poziomu ekspresji mRNA/białka Prox1 w liniach komórkowych wyprowadzonych ze zróżnicowanych raków tarczycy , określenie komórkowej lokalizacji Prox1
- Zbadanie roli czynnika Prox1 w procesach związanych z biologią guza
- Zbadanie molekularnych mechanizmów regulujących ekspresję Prox1 oraz ścieżek sygnalizacyjnych związanych z aktywacją tego genu.
- Analiza wpływu Prox1 na regulację angiogenezy *in vitro*

Atutem pracy jest wykorzystanie przez Doktorantkę wielu nowoczesnych i wyspecjalizowanych technik badawczych biologii molekularnej. Godny uznania jest zakres eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę, jak i jakość ich

wykonania. Praca wzbogacona bardzo dobrej jakości zdjęciami wykonanymi pod mikroskopem fluorescencyjnym, zdjęcia te znacząco wzbogacają jakość pracy, jasno prezentując otrzymane wyniki.

Materiał i metody zastosowane w pracy opisano w sposób szczegółowy na 24 stronach tekstu. Doktorantka w pracy przedstawiła wykaz stosowanych odczynników oraz dokładnie opisała stosowane w pracy metody badań laboratoryjnych: izolowanie RNA/DNA z linii komórkowych, reakcję odwrotnej transkrypcji, reakcję real-time PCR, fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* mRNA, technikę Western blotting, elektroforezę dwukierunkową, frakcjonowanie białka, immunofluorescencje, transfekcje siRNA, transfekcję wektorami plazmidowymi, testy oceny potencjału inwazyjnego i migracyjnego: m.in. testy wykorzystujące zjawisko chemoatraktancji, test zarastania rany *in vitro*, adhezji, test zdolności komórek do wzrostu niezależnie od podłoża: test w półpłynnym agarze. Za pomocą cytometrii przepływowej badano: przeżywalność komórek, oraz cykl komórkowy, analiza morfologiczna i organizacji cytoszkieletu została przeprowadzona metodą immunofluorescencji w mikroskopie konfokalnym. Analizę metylacji wysp CpG za pomocą metody Q-MSP (ang. *quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*).

Materiałem biologicznym przeznaczonym do badań molekularnych były linie komórkowe wyprowadzone z ludzkich zróżnicowanych raków tarczycy DTC, oraz komórki pochodzące z prawidłowej tarczycy; linie raka brodawkowego tarczycy BcPAP, TPC1, linie raka pęcherzykowego tarczycy FTC-133, CGTH-W-1, linię prawidłowej tarczycy Nthy-ori 3-1 oraz komórki śródbłonna żyły pępowinowej HUVECs.

Wyniki badań przedstawione zostały na 35 stronach maszynopisu, oraz zilustrowane zostały za pomocą 23 przejrzystych rycin, co pozwala na dokładną analizę wyników. Praca została napisana poprawnym językiem. Piśmiennictwo obejmuje 164 pozycje literaturowe opublikowane w większości w ostatnich latach w renomowanych pismach o wysokim *Impact Factor* (IF). Pracę wyróżnia wielowątkowość podjętych badań.

Spośród uzyskanych wyników badań, z punktu widzenia klinicznego interesujący jest fakt, że nadekspresja mRNA i białka Prox1 (zlokalizowanego jądrowo), jest znacznie wyższa w liniach komórkowych raka pęcherzykowego w

porównaniu do komórek raka brodawkowego. Łącząc tę obserwację z odmienną lokalizacją: jądrową w FTC i jądrowo-cytoplazmatyczną w PTC, można przyjąć, że białko Prox1 ma w FTC większą stabilność i wyższy potencjał, jako czynnik transkrypcyjny. Dodatkowo, bardzo interesującym wynikiem badań Doktorantki jest fakt udowodnienia, że poziom ekspresji Prox1 reguluje biologię komórek pęcherzykowych nowotworu, nadekspresja Prox1 w komórek linii FTC -133 nasila zdolność komórek do migracji i inwazji. Łącząc te fakty z wynikami innych autorów, że wysoka ekspresja Prox1 koreluje w wielu typach nowotworów u ludzi z ich progresją i inwazyjnością oraz fakt że FTC ma skłonność do przerzutowania odległego (jest to jeden z niezależnych czynników rokowniczych FTC) - nadekspresja Prox1 mogłaby mieć istotne znaczenie prognostyczne w raku tarczycy.

Bardzo cennym wynikiem pracy z punktu widzenia klinicznego i przyszłego postępowania terapeutycznego jest wykazanie w badaniu funkcjonalnym, że wyciszenie *PROX1* siRNA koreluje z wyższą ekspresją regulatorów zdolności do migracji i inwazji komórek rakowych. Szczególnie cenne jest wykazanie wzrostu ekspresji E-kadheryny, której utrata aktywności jest kluczowa w procesie przerzutowania (w przypadku FTC występuje w ok 72% przerzutów), co koreluje z utratą epitelialnego fenotypu. Z drugiej strony zaobserwowano, że wyciszenie *PROX1* wiąże się ze wzrostem ekspresji kinazy FAK czy kaweoliny, a także czynników wzrostu fibroblastów (FGF2), istotnego w limf- i angiogenezie sugeruje kluczowy udział Prox1 w tworzeniu przerzutów. Obserwacje Autorki co do potencjału terapeutycznego *PROX1* w raku tarczycy potwierdził także zespół Choi et al. 2016, w których udowodniono, że modulowanie ekspresji *PROX1* może stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w celu zahamowania progresji guza. Nowatorskim kierunkiem badań podjętym w pracy jest ocena mechanizmów epigenetycznych regulacji ekspresji *PROX1* takich jak metylacja DNA, acetylacja i deacetylacja histonów. Doktorantka udowodniła, że istotnym mechanizmem regulacji ekspresji genu *PROX1* w komórkach raka brodawkowego tarczycy (wzięty pod uwagę w badaniu ze względu na niski poziom ekspresji badanego genu), jest acetylacja histonów. W części pracy dotyczącej dyskusji Doktorantka w sposób dojrzały skonfrontowała otrzymane wyniki badań z opublikowanymi wynikami innych autorów.

W tym miejscu z obowiązku Recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych **uchybień edytorskich i nomenklaturowych oraz własne zapytania i sugestie:**

1. W części dotyczącej spisu treści brakuje podrozdziałów: spis tabel, spis rycin, które podrozdziały znajdują się na końcu pracy. W spisie treści pomyłona została numeracja, zamiast pozycji 6.3.1 jest pozycja 6.3.1.1,
2. W części pracy dotyczącej skrótów Doktorantka w niektórych przypadkach nie zastosowała się do prawidłowego nazewnictwa biochemicznego czy rozwinięcia skrótu w j. polskim: np.: dATP- adenina /a powinna być 2'-deoksyadenozyno-5'-trifosforan , dCTP- cytozyna /a powinna być 2'-deoksycytidyno-5'-trifosforan, podobnie pozostałe nukleotydy. RNaz - enzym degradujący RNA /powinno być RNaza – rybonukleaza, enzym degradujący RNA. Podobnie w innych miejscach MTC - jest rak rdzeniasty/ a powinno być zgodnie ze skrótem rak rdzeniasty tarczycy, PTC - rak brodawkowy/ a powinno być rak brodawkowy tarczycy. W skrócie MET – jest tranzycja mezenchymalno-nabłonkowa / a powinno być przejście mezenchymalno-nabłonkowe.
3. W części materiał badawczy: strona 50 oraz część streszczenie str 12 zamiast ludzkie zróżnicowane nowotwory tarczycy (DTC), powinno być ludzkie zróżnicowane raki tarczycy.
4. W części wyniki str 98 wykres 34 dotyczący poziomu ekspresji czynnika wzrostu fibroblastów 2(FGF2) brak oznaczenia jednostek
5. Kilka „literówek” w tekście i powtórzeń słów lub symboli str 8, 23 (3 wers od dołu),32 (11 wers od dołu)
6. W przypadku prezentowanych licznych schematów w pracy, i powoływania się na zapożyczenie z artykułu (tu podany autor pracy) proszę o wyjaśnienie czy były one modyfikowane na użytek opracowywanego w Doktoracie tekstu ?, jeśli tak to brak adnotacji - zmodyfikowano.
7. W części streszczenia pracy dotyczącej wyników, Autorka umieściła informacje co do poziomu ekspresji genu *PROX1* w liniach FTC, brak informacji o poziomach ekspresji w pozostałych liniach (PTC, tarczyca prawidłowa) , pomimo iż we wnioskach odnosi się do ich porównania we wszystkich badanych liniach (wniosek 1)
8. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego Doktorantka w ocenie poziomu ekspresji badanego genu zastosowała sondy oparte na barwniku SYBER GREEN a nie zastosowała metody z użyciem sond TaqMan .

9. Jak Autorka pracy wytłumaczy z punktu widzenia mechanizmów molekularnych w komórce, dlaczego mRNA /białko Prox1 ulega wyższej ekspresji w komórkach linii FTC vs PTC i czy te wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów?
10. Doktorantka w pracy przeprowadziła analizę czynników epigentycznych wpływających na obniżenie ekspresji genu *PROX1* w badanych liniach komórkowych. W analizie wpływu deacetylacji histonów na obniżanie ekspresji *PROX1* Doktorantka wykazała, że zastosowanie inhibitorów deacetylaz wpływa znacząco na podwyższenie ekspresji danego genu. Czy w oparciu o stosowaną w pracy metodę można zweryfikować czy na podwyższenie ekspresji genu w badanych liniach komórkowych ma bezpośredni wpływ inhibicja deacetylacji histonów w pobliżu badanego genu, czy może zwiększenie ekspresji innego genu/czynnika regulującego ekspresję *PROX1*?
11. Obok metody zastosowanej w pracy, deacetylacja histonów mogłaby również zostać zbadana przy użyciu metody immunoprecypitacji chromatyny. Która metoda zdaniem Doktorantki pozwoliłaby na uzyskanie bardziej jednoznacznych wyników badań ?

Przytoczone powyżej drobne uwagi, natury redakcyjnej a nie merytorycznej nie umniejszają w żadnym stopniu wartości i nowatorstwa ocenianej rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca jest bardzo wartościową rozprawą doktorską, a Doktorantka wykazała się wyjątkowym przygotowaniem metodycznym i teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz wysokim stopniem samodzielności naukowej i eksperymentalnej. Praca jest nowatorska a przedstawione wyniki badań wskazują na całkowitą realizację celów założonych w pracy. Uwzględniając nowatorskie idee i koncepcje badawcze oraz nowoczesny warsztat badawczy zastosowany w pracy, z prawdziwą przyjemnością stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa spełnia ustawowe (art.13 ustawy z dn. 14 marca 2013 i o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny

Rudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie ze względu na wartości poznawcze przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej i znaczenie praktyczne wyników badań dla onkologii wnioskuję o wyróżnienie pracy.