

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

tel/fax:+48 42 677-91-30

e-mail: ewa.balcerczak@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Łódź, 22 lipca 2020 r.

Ocena

Rozprawy doktorskiej: „Badanie efektu modulacji telomerazy w warunkach in vitro na ścieżki związane z procesami proliferacji i adhezji w komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231” mgr anal. med. Aleksandry Romaniuk-Drapały na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Recenzję przygotowano w związku z pismem nr DWF-571a-194/20 Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, prof. dr hab. Edmunda Grześkowiaka.

Przedstawiona do recenzji praca poświęcona jest: zweryfikowaniu udziału podjednostki hTERT w procesach związanych ze wzrostem i migracją komórek nowotworowych przy wykorzystaniu linii raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 jako modelu eksperymentalnego.

Założenia pracy wpisują się w jeden ze współczesnych, istotnych klinicznie, nurtów naukowych jakim jest poszukiwanie nowych tarcz dla terapii celowanej, zwłaszcza w leczeniu pacjentów z chorobą nowotworową. W tym zakresie podejmowane są działania mające na celu poznanie metabolizmu nowotworu na poziomie molekularnym pod kątem poszukiwania punktów uchwytu dla leków które mogłyby ograniczyć zdolność komórek nowotworowych do nieograniczonych podziałów i zahamować ich potencjał adhezyjny. Jednym z nich jest

telomeraza, zwłaszcza zaś podjednostka katalityczna tego enzymu, hTERT, która oprócz udziału w procesie odbudowy telomerów, pełni również inne poza-telomerowe funkcje.

Do realizacji celu głównego zostało, przez Doktorantkę, określonych siedem celów szczegółowych polegających na: stworzeniu wydajnego i stabilnego systemu wyciszającego podjednostkę katalityczną telomerazy, hTERT; ocenie wzrostu wrażliwości komórek, z zahamowaną telomerazą, po ekspozycji na doskorubicynę, poznaniu wpływu modulacji telomerazy na badane komórki w odniesieniu do cyklu komórkowego; ocenie zmian w potencjale proliferacyjnym wynikającym z obniżenia aktywności telomerazy oraz procesu starzenia komórkowego; zbadaniu wpływu modulacji telomerazy na aktywację szlaków programowanej śmierci typu I i II; ocenie zmian w potencjale adhezyjnym i migracyjnym komórek oraz ocenie zmian w profilu białek należących do szlaku regulacji procesu adhezji i migracji pod wpływem obniżenia ekspresji podjednostki hTERT.

Praca doktorska mgr Aleksandry Romaniuk-Drapała jest 123 stronicowym opracowaniem, składającym się części teoretycznej zawierającej wstęp, części praktycznej w której umieszczono cel pracy, materiały i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski. Ostatnią część pracy stanowi streszczenie oraz piśmiennictwo obejmujące 201 pozycji, w tym większość z ostatnich dziesięciu lat, pozostałe publikacje stanowią istotne uzupełnienie, pokazując uzasadnienie podjęcia tematu badawczego i jego wagi na przestrzeni wielu lat badań naukowych. Do pracy zostały dołączone wykazy użytych odczynników oraz wykorzystanych przeciwciał I i II rzędowych, co w sposób istotny ułatwia poruszanie się po dysertacji.

We wstępie pracy omówiono telomery i telomerazę z uwzględnieniem regulacji ekspresji podjednostki hTERT, mechanizmów przywracających ekspresję tej podjednostki w komórkach nowotworowych jak również poza telomerowe funkcje podjednostki hTERT. Następnie omówiono interferencję RNA.

Na koniec wstępu Autorka przedstawia założenia narodowej strategii onkologicznej, który można było wzbogacić o aktualne dane statystyczno-epidemiologiczne dla Polski z uwzględnieniem raka piersi.

We Wstępie zabrało podrozdziału wyjaśniającego jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę do wykorzystania w pracach eksperymentalnych modelu komórkowego raka piersi. Brak również informacji o klinicznym znaczeniu badanych w pracy procesach co podkreśliłoby wagę zaplanowanych badań jak również użycie leku jakim jest doksorubicyna.

Pomimo drobnych uchybień, Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej.

Część doświadczalna pracy obejmuje 51 stron. Doktorantka przeprowadziła badania na liniach komórkowych MCF7 oraz MDA-MB-231. W pracy badawczej wykorzystano technologie otrzymywania wektorów lenitiwirusowych oraz metody z zakresu biologii molekularnej.

W części poświęconej metodyce w sposób jasny omówiono między innymi procedury produkcji wektorów, ich mianowania, transdukcji komórek linii otrzymanymi wektorami oraz techniki izolowania RNA, białek, odwrotnej transkrypcji, amplifikacji cDNA metodą real-time PCR, metodę western blot, test MTT, cytometryczną ocenę cyklu komórkowego czy też technikę oceny poziomu aktywności telomerazy. Z obowiązku recenzenta zamieszczam drobne uwagi dotyczące tej części pracy. W podrozdziale 3.4.1 nie podano informacji której linii dotyczą omówione warunki hodowli, być może były one takie same w obu przypadkach. W podrozdziale 3.4.7 nie zamieszczono przykładowej krzywej amplifikacji, nie została ona również dodana w sekcji wyniki. Tą niezwykle cenną część pracy wzbogaciłyby ryciny ilustrujące proces techniczny otrzymywania wyników na poszczególnych etapach.

Należy podkreślić, że w pracy Doktorantka wykorzystwała z sukcesem szeroki wachlarz zróżnicowanych technik badawczych co pozwoliło na uzyskanie niezwykle ciekawych wyników i realizację celu pracy. Do analizy otrzymanych wyników w sposób prawidłowy dobrano testy statystyczne.

Wyniki uzyskane w recenzowanej pracy zostały bardzo dobrze udokumentowane w postaci 22 ryciny obrazujących: analizy poziomu podjednostki białkowej hTERT, względnych poziomów ekspresji tej podjednostki oraz aktywności telomerazy w liniach komórkowych; ocenę wydajności wyciszenia podjednostki hTERT na poziomie mRNA, wpływ wyciszenia na poziom kodowanego białka, aktywność telomerazy, analizy poziomu regulatorów cyklu komórkowego.

W tabeli zamieszczono wyniki z eksperymentu oceniającego wpływ wyciszenia katalitycznej podjednostki telomerazy hTERT na odpowiedź komórek po podaniu doksorubicyny, zilustrowano również na wykresach żywotność komórek oraz zdolność do tworzenia kolonii po wyciszeniu i traktowaniu lekiem oraz potencjał proliferacyjny czy też zdolność komórek do adhezji jak i migracji.

W rozprawie znalazły się również zdjęcia dokumentujące wpływ wyciszenia podjednostki hTERT na indukcję procesu starzenia w komórkach badanych linii, zdjęcia z mikroskopu elektornowego oraz odwróconego mikroskopu świetlnego.

Sposób prezentacji wyników pozwala śledzić postępy pracy i realizacji jej kolejnych celów. Nie zakłócają tego drobne edytorskie niedociągnięcia.

Autorka w pracy doktorskiej wykazała że wyciszenie ekspresji podjednostki hTERT przy użyciu systemu lentiwirusowego w komórkach linii raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 skutkuje obniżeniem poziomu białka hTERT i aktywności całego kompleksu telomerazy co prowadzi do ich uwrażliwienia na działanie doksorubicyny

Doktorantka zaobserwowała również, że wyciszenie podjednostki hTERT prowadzi do obniżenia potencjału proliferacyjnego oraz wpływa na przebieg i regulację cyklu komórkowego indukuje proces starzenia bądź autofagii, a efekt ten może być zależny od wariantu białka p53.

Niezwykle interesująca jest obserwacja pokazując że obniżenie poziomu hTERT za pomocą RNAi prowadzi do spadku zdolności adhezyjnych i migracyjnych komórek nowotworowych w wyniku zaburzenia transdukcji sygnału na osi $\beta 1$ -integryna/paksylina.

Doktorantka zaobserwowała również zaangażowanie podjednostki hTERT w regulację procesów adhezji i migracji.

Te ciekawe i nowatorskie obserwacje mogą stanowić obiecujący wstęp do dalszych badań, mają też potencjał aplikacyjny stanowiąc podstawę dla badań nad rozwojem bardziej efektywnych terapii przeciwnowotworowych hamujących proces przerzutowania.

mgr anal. med. Aleksandry Romaniuk-Drapała w sposób prawidłowy zaplanowała, zaprojektowała i przeprowadziła badania oraz z sukcesem w sposób niezwykle czytelny zaprezentowała w postaci logicznej całości wyniki i dokonała ich interpretacji. Postawiony cel główny oraz cele szczegółowe zostały osiągnięte dzięki dobrej organizacji pracy, jak i wsparciu oraz doświadczeniu Promotora oraz Promotora Pomocniczego.

Uzyskane wyniki zostały podsumowane w dyskusji, która jest wartościowym elementem recenzowanej pracy i pokazują dojrzałość naukową mgr Aleksandry Romaniuk-Drapały. Doktorantka przedstawiła w niej przekonujące omówienie wyników wpływających z własnych badań w porównaniu z danymi dostępnymi w cytowanych publikacjach.


Dorobek naukowy Doktorantki stanowi współautorstwo w 15 pracach oryginalnych i siedem prac poglądowych, gdzie w jednej mgr Aleksandra Romaniuk-Drapała jest pierwszym autorem. Sumaryczny IF wynosi 65.151, a punktacji MNiSW 1028. Wyniki zostały również zaprezentowane na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych.

Podsumowując praca została przygotowana w sposób właściwy, a pojedyncze błędy nie wpływają na jej ostateczną, wysoką ocenę

Z ogromną przyjemnością stwierdzam zatem, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr anal. med. Aleksandry Romaniuk-Drapały i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W osobnym piśmie przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

z poważaniem,

KIEROWNIK
Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak