

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Borkowskiej
pt. „Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka nerki: analiza *in vitro* i *in vivo*”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Borkowskiej została przygotowana w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych w Wojskowym Instytucie Medycznym, Państwowym Instytucie Badawczym. Promotorem rozprawy jest Pani prof. dr hab. Claudine Kieda, a promotorem pomocniczym Pani dr Halina Waś. Prace badawcze zaprezentowane w niniejszej rozprawie były finansowane w ramach dwóch projektów: Sonata Bis z Narodowego Centrum Nauki oraz grantu statutowego nr. 500 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, WIM-BIP. Kierownikiem obu projektów była promotor pomocniczy Pani dr Halina Waś. Stypendium doktoranckie finansowane było w ramach projektu „Program interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w medycynie spersonalizowanej” z Funduszy Europejskich, Wiedza Edukacja Rozwój – Unia Europejska Fundusz Społeczny.

Znaczenie i oryginalność tematu naukowego

Jedno z największych wyzwań z jakim mierzy się współczesna onkologia jest opracowanie skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw komórkowej odpowiedzi na chemo- czy radioterapię jest niezbędne do osiągnięcia tego celu. Z jednej strony, pozwala to na opracowanie nowych strategii terapeutycznych, które są ukierunkowane na eliminację konkretnych komórek nowotworowych; z drugiej strony umożliwia na określenie procesów zachodzących w komórce, które czynią ją oporną na stosowane leki.

Terapie przeciwnowotworowe tradycyjnie opierają się na takich strategiach, które z założenia są wysoce cytotoksyczne i prowadzą do eliminacji komórek nowotworowych, np. na drodze apoptozy. Chociaż z założenia strategia ta jest słuszna, to jednak wymaga stosowania wysokich dawek chemioterapeutyków, które także działają toksycznie na komórki prawidłowe, powodując skutki uboczne. Ponadto szereg nowotworów w trakcie onkogenezy czy terapii uruchamia mechanizmy pozwalające na unikanie apoptozy, co ogranicza możliwość ich eliminacji. Alternatywnym podejściem są terapie polegające na stosowaniu niższych dawek leków, które mają wpływ cytostatyczny na komórki nowotworowe i przyczyniają się do ograniczenia wzrostu guza. Jednym z procesów, który może być indukowany w wyniku terapii o efekcie cytostatycznym jest starzenie komórkowe, które w literaturze anglojęzycznej określa się mianem *therapy induced senescence* (TIS).

Starzenie komórkowe jest procesem prowadzącym do nieodwracalnego zatrzymania podziałów komórkowych, przy czym komórka pozostaje żywa i aktywna metabolicznie. Pomimo licznych przykładów świadczących o tym, że starzenie indukowane w trakcie terapii przeciwnowotworowej zwiększa jej skuteczność, istnieją liczne przesłanki świadczące o tym, że stare komórki nowotworowe mogą na nowo wznowić podziały (odzyskać potencjał proliferacyjny) i spowodować remisję choroby. Poznanie molekularnych mechanizmów, które są odpowiedzialne za nieodwracalną utratę potencjału proliferacyjnego przez stare komórki nowotworowe jest jednym z istotnych wyzwań biologii nowotworów.

Oprócz indukcji procesów starzenia komórkowego oraz apoptozy w odpowiedzi na stres, także związany z terapią przeciwnowotworową, może dojść do aktywacji autofagii. Autofagia to proces kataboliczny, który przy udziale lizosomów (a dokładniej enzymów lizosomalnych) odpowiedzialny jest za usuwanie uszkodzonych, zbędnych organelli komórkowych, makrocząsteczek (np. źle sfaldowanych białek) czy patogenów. Autofagia obserwowana na niskim, podstawowym poziomie w większości komórek, odpowiedzialna jest za utrzymywanie homeostazy komórkowej, a tym samym zapewnia prawidłowe funkcjonowanie komórki. Autofagia może być także aktywowana w odpowiedzi na różne bodźce np. niedobór czynników odżywczych, niedotlenienie czy związki przeciwnowotworowe. W efekcie autofagia może być rozpatrywana jako proces umożliwiający przeżycie komórki w niekorzystnych warunkach mikrośrodowiska lub przyczynić się do jej śmierci, gdy poziom autofagii jest zbyt wysoki. Biorąc pod uwagę wpływ autofagii na komórki nowotworowe, rozróżnia się autofagię cytoprotekcyjną, cytotoksyczną lub cytostatyczną. Od niedawna wiadomo, że autofagia jest procesem, który promuje starzenie komórkowe.

Rak nerki stanowi około 2-3 % wszystkich notowanych złośliwych nowotworów nablónkowych. Najczęściej występuje w krajach zachodnich, gdzie w ciągu ostatnich 20 lat odnotowano coroczny wzrost zachorowań. Rak nerkowo-komórkowy (ang. *renal cell carcinoma*, *RCC*) jest najczęściej rozpoznawanym złośliwym guzem nerki i stanowi ponad 90% wszystkich nowotworów złośliwych nerki. Stanowi niejednorodną histologicznie grupę

nowotworów wywodzących się z różnych elementów nabłonka nefronu. Nowotwór ten wykazuje wysoką oporność na chemo- i radioterapię.

Cechą charakterystyczną guzów litych jest ich niedotlenienie (hipoksja), które istotnie wpływa na biologię nowotworu oraz odpowiedź na chemo- i radioterapię. Niedotlenienie powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (ang. *Hypoxia-inducible factor 1*), który reguluje ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za szereg procesów fizjologicznych jak i patologicznych.

Dlatego kluczowym jest prowadzenie badań nad zrozumieniem roli starzenia komórkowego jak i autofagii w rozwoju chemooporności komórek nowotworowych, w tym raka nerki, z uwzględnieniem warunków tlenowych jakie występują w guzach nowotworowych.

Główna hipoteza badawcza, przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, zakłada, że poprzez hamowanie autofagii możliwe będzie zminimalizowanie niekorzystnego działania starych komórek nowotworowych i zwiększenie skuteczności chemioterapii. Hipoteza jest oryginalna, chociaż podobną problematykę badań podejmuje Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, a w której promotor pomocniczy Pani dr Halina Waś odbyła staż podoktorski. Przedstawiona do oceny praca jest rozwinięciem wcześniejszych badań prowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia kierowanej przez Panią prof. Ewę Sikorę.

Metodologia i znaczenie wyników

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 216 stron. Manuskrypt ma klasyczny układ i zawiera wszystkie wymagane elementy, typowe dla rozprawy doktorskiej: wstęp, cele, wyniki, dyskusję, wnioski oraz szczegółową metodologię. Cytowana literatura stanowi solidną podstawę badanej i omawianej tematyki, zacytowano 335 publikacji. W tekście zamieszczono 71 rycin, 19 tabel, na początku manuskryptu umieszczono spis rycin, wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu manuskryptu dołączono zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie.

We „Wstępie” Pani mgr Agata Borkowska wprowadza nas w tematykę swoich badań, przedstawia podstawowe informacje dotyczące raka nerki, opisuje dane epidemiologiczno-kliniczne nowotworu, omawia mikrośrodowisko guza oraz metody leczenia pacjentów z rakiem nerki. Opisuje mechanizmy działania trzech związków: winblastyny, gemcytabiny oraz 5-fluorouracylu, które są stosowane także w badaniach nad rakiem nerki. Następnie, Doktorantka omawia zjawisko niedotlenienia, które występuje w guzach litych oraz molekularne mechanizmy odpowiedzi na hipoksję. Przedstawia także informacje dotyczące chemooporności komórek nowotworowych. Następnie, kompleksowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą starzenia komórkowego, omawia proces starzenia indukowanego terapią (TIS), mechanizmy „ucieczki” komórek od tego procesu oraz strategię terapeutyczną opartą o senolityki (związki, których działanie polega na selektywnym eliminowaniu starzejących się komórek). Na końcu omawia proces autofagii, jej przebieg, regulację oraz skupia się na roli autofagii jako celu terapii przeciwnowotworowej.

Wstęp opatrzone jest rycinami, które pomagają w zrozumieniu omawianych zagadnień. Należy jednak dodać, że Doktorantka, nie uniknęła licznych błędów interpunkcyjnych, stylistycznych, gramatycznych, skrótów myślowych, często używa tzw. żargonu laboratoryjnego. Język naukowy powinien być klarowny, czytelny i zrozumiały dla odbiorcy. Ta uwaga odnosi się do całej rozprawy doktorskiej.

Rozdział „Materiały i metody” jest dość dobrze napisany i zawiera szczegółowe informacje na temat zastosowanych metod. Jasny i obszerny opis stosowanych metod stwarza możliwość powtórzenia opisanych doświadczeń. Doktorantka wykorzystwała typowe metody stosowane w biologii komórkowej, takie jak hodowle komórkowe, metody określania żywotności i proliferacji komórek, oceny markerów starzenia (np. ocena wielkości i ziarnistości komórek, analiza aktywności enzymu lizosomalnego β -galaktozydazy (ang. *Senescence associated- β -galactosidase*, SA- β -Gal), analiza cyklu komórkowego z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Zastosowano także metody biologii molekularnej, w tym western blot, ELISA, barwienie immunocytochemiczne, transfekcja, *real time* PCR, sekwencjonowanie RNA. Opis niektórych metod można by nieco skrócić, np. nie zamieszczając informacji dotyczących zasad działania metody western blot czy opisu działania cytometru przepływowego. Co ciekawe, Doktorantka opisując dość szczegółowo metodę western blot (strona 54-55) nie uniknęła błędu, twierdząc, że w czasie transferu białek na membranę nitrocelulozową, „białka o ładunku dodatnim migrują w kierunku elektrody o ładunku ujemnym (katody)”. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących określana skrótem SDS-PAGE (ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) odbywa się w obecności soli sodowej siarczany dodecylu (SDS),

który jest detergentem jonowym. SDS łącząc się z grupami hydrofobowymi aminokwasów nadaje białkom ładunek ujemny i sprawia, że białka migrują w kierunku dodatniej anody.

Należy podkreślić, że zastosowano także nowoczesne technologie wysokowydajnego sekwencjonowania, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) oraz analizę bioinformatyczną.

Materiał badawczy stanowiły dwie linie komórkowe tj. ludzka linia raka nerkowo-komórkowego, RCC4 oraz mysia linia raka nerki, RenCa. Linie różniły się statusem mutacji genu VHL (ang. von Hippel-Lindau).

Poprzez wykorzystanie specjalnych komór do hodowli komórek w kontrolowanych warunkach tlenu, w tym w normoksji i hipoksji, możliwe było badanie zjawiska starzenia w warunkach jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych, obserwowanych w guzach litych. Materiał badawczy uzyskano także z materiału zwierzęcego, gdzie użyto myszy syngenicznego modelu raka nerki. Ryciny przedstawiające schematy doświadczeń *in vitro* lub *in vivo* są bardzo przydatne. Użyte metody są poprawnie dobrane do rozwiązywania problemu będącego tematem rozprawy doktorskiej. Natomiast mam zastrzeżenia co do analizy statystycznej. Do analizy użyto testu t-Studenta, który wskazany jest przy analizie dwóch grup badawczych. Nie można porównywać ze sobą kilku grup, wykonując kilkakrotnie test t-Studenta, jak pokazano na rycinie 13, 14, 17, 19, 21, 23 i innych. Jeżeli mamy więcej niż dwie grupy to właściwsza jest analiza ANOVA lub jego nieparametryczny odpowiednik. Ponadto, przy opisie metod Doktorantka, nie uniknęła drobnych błędów i niedociągnięć, które podano poniżej, w uwagach szczegółowych.

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Borkowskiej było określenie roli dwóch istotnych procesów komórkowych, autofagii i starzenia w chemooporności komórek raka nerki w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Główny cel został sformułowany w następujący sposób: określenie czy zahamowanie autofagii uwrażliwia stare komórki raka nerki i indukcję w nich śmierci i/lub wpływa na potencjał proliferacyjny komórek oraz powstawanie komórek potomnych w różnych warunkach tlenowych tj. w normoksji i hipoksji. Aby zrealizować główny cel sformulowano siedem celów szczegółowych obejmujących:

- ocenę czy ludzkie i mysie komórki raka nerki ulegają procesowi starzenia w odpowiedzi na różne chemoterapeutyki;
- ocenę wpływu hipoksji na powstały fenotyp starzenia;
- zbadanie czy zahamowanie autofagii wpływa na proces indukcji starzenia komórek raka nerki;
- zbadanie czy zahamowanie autofagii wpływa na proces starzenia indukowanego terapią (TIS);
- ocena zmian ekspresji genów i analiza nadreprezentowanych ścieżek sygnałowych w komórkach poddanych starzeniu indukowanego terapią oraz po zahamowaniu autofagii;
- opracowanie zwierzęcego modelu starzenia indukowanego terapią w syngenicznym mysim modelu raka nerki;
- ocena wpływu zahamowania autofagii na zmiany molekularne i fenotypowe komórek w mysim modelu raka nerki.

Szkoda, że cele nie zostały sformułowane w jasny i klarowny sposób, powyżej przedstawione cele zostały skorygowane po kątem językowym. Należy jednak podkreślić, że podjęta tematyka badań jest uzasadniona i interesująca zarówno ze względów naukowych, jak również czysto praktycznych. Nowa wiedza uzyskana w czasie realizacji tego projektu może przyczynić się do głębszego zrozumienia biologii nowotworów i mechanizmów oporności na chemioterapię. W przyszłości może to stworzyć nowe perspektywy dla skuteczniejszej diagnostyki i terapii raka.

Główne osiągnięcia swoich badań Pani mgr Agata Borkowska przedstawiła w rozdziale „Wyniki”. W pierwszej kolejności wyznaczono subletalne dawki winblastyny (VIN), gemcytabiny (GEM) i 5-fluorouracylu (5-FU) dla dwóch linii komórkowych raka nerki, RCC4 oraz RenCa, które hodowano w różnych warunkach tlenowych. Do dalszych analiz wybrano dwa stężenia każdego leku, a które wpływały na przeżywalność i proliferację komórek. Wykazano, że obie linie komórkowe były bardziej wrażliwe na winblastynę oraz gemcytabinę niż na 5-fluorouracyl. Nie jest do końca jasne dlaczego te, a nie inne stężenia wybrano do doświadczeń. Zastanawia fakt, dlaczego przy doborze subletalnych dawek najpierw nie wyznaczono stężenie EC_{50} , przy którym liczba żywych komórek po podaniu każdego związku zmniejsza się o połowę w stosunku do kontroli. Wyznaczanie wartości EC_{50} stanowiłoby punkt odniesienia do dawek subletalnych indukujących starzenie komórkowe.

Następnie dokonano charakterystyki procesu starzenia komórkowego indukowanego cytostatykami. Doktorantka charakteryzowała fenotyp starzenia komórkowego poprzez oznaczanie klasycznych markerów starzeniowych, zaczynając od analizy aktywności β -galaktozydazy ($SA-\beta$ -Gal), przez ocenę wielkości i ziarnistości komórek po analizie cyklu komórkowego. Analizowano także poziom białek związanych z regulacją cyklu komórkowego (tj. inhibitor cyklu komórkowego białko p21^{CIP1/WAF1}, ufosforylowaną formę białka Rb czy poziom kinazy

zależnej od cyklin, białko CDK1, zwane też cdc2) oraz pojawienie się fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

Otrzymane wyniki wskazywały na dużą różnorodność odpowiedzi badanych komórek. Wykazano, że wszystkie badane związki wpływały na charakterystyczne dla starzenia zmiany morfologiczne, chociaż najsilniejszy wpływ miała winblastyna, a najłagodniejszy 5-fluorouracyl. W przypadku ludzkiej linii RCC4 nie zaobserwowano wpływu hipoksji na analizowane zmiany fenotypowe, co nie jest niczym dziwnym, ponieważ komórki te posiadają mutację w genie *VHL*, a białkowy produkt tego genu ma wpływ na stabilność, a zatem ilość podjednostki HIF-1 α . Do dalszych analiz wybrano już tylko dwa związki winblastyny i 5-fluorouracyl oraz tylko ludzką linię komórkową RCC4.

Analiza cyklu komórkowego wykazała, że winblastyna hamowała komórki w fazie G2/M, prowadziła do poliploidyzacji, zaobserwowano także pojawienie się populacji subG1, czyli populacji komórek apoptotycznych (ok. 10-15%). Zmiany te korelowały z aktywacją ścieżki p53/p21^{CIP1/NAF1} oraz szlaku sygnałowego, w którym uczestniczy białko Rb. Szkoda, że nie analizowano poziomu białka p16^{INK4}, który wpływa na poziom fosforylacji białka Rb. Zabrakło mi także analizy całkowitego białka Rb, czy analizy poziomu cyklin B i D, co wzbogaciłoby uzyskane wyniki. Pewnym utrudnieniem w analizie wyników western blot jest odmienny układ na wykresach słupkowych (przedstawiających analizę densytometryczną prążków) w stosunku do samych westernów (np. rycina 21), uwaga ta odnosi się także do innych rycin.

Z kolei po podaniu 5-fluorouracylu zmniejszał się procentowy udział komórek w fazie S, nie dochodziło do wzrostu liczby komórek poliploidalnych, zaobserwowano pojawienie się niewielkiej populacji komórek apoptotycznych, ale tylko w warunkach tlenowych. Dochodziło także do zahamowania fosforylacji białek Rb jak i cdc2, efekt ten był niezależny od warunków tlenowych.

Analiza fenotypu sekrecyjnego wykazała, że w komórkach stymulowanych winblastyną dochodzi do wzrostu wydzielania czynnika wzrostu śródbłonnka (VEGF), osteopontyny, białka wiążącego insulino-podobny czynnik wzrostu (IGFBP3) oraz katepsyny S niezależnie od warunków tlenowych. Ciekawe, że nie zaobserwowano wzrostu wydzielania interleukiny 8 (IL-8) należącej do kanonicznych białek wchodzących w skład SASP. Z kolei, na skutek działania 5-fluorouracylu obserwowano wzrost sekrecji jedynie osteopontyny i białka IGFBP-3 w warunkach normoksji. Czy Doktorantka może się ustosunkować dlaczego te, a nie inne białka zostały wybrane do analizy fenotypu wydzielniczego, SASP. Doktorantka powołuje się na dane, które nie są zamieszczone w doktoracie.

Kolejnym krokiem było zbadanie czy dochodzi do indukcji autofagii w komórkach stymulowanych cytotatykami. Analiza przekształcenia cytoplazmatycznej formy białka LC3-I do formy LC3-II, która wiąże się z błoną autofagosomów, wykazała, że dochodzi do akumulacji białka LC3-II jedynie po stymulacji komórek winblastyną. Korelowało to ze spadkiem poziomu białka p62/SQSTM1, które jest degradowane w autolizosomach oraz spadkiem fosforylacji rybosomalnego białka S6, co może wskazywać na zahamowanie ścieżki mTOR, negatywnego regulatora autofagii. Zabrakło mi analizy poziomu aktywnej kinazy p70S6K1, która bezpośrednio jest odpowiedzialna za fosforylację białka S6. Dodatkowa, analiza poziomu autofagii bezpośrednio w komórce poprzez ocenę dystrybucji białka LC3 lub fuzyjnego białka GFP-LC3 wzmocniłaby powyższe wyniki. Metoda ta jest powszechnie stosowana i pozwala na ocenę liczby autofagicznych wakuoli w komórce.

W następnej kolejności analizowano zmiany ekspresji genów i nadreprezentowanych ścieżek sygnałowych w komórkach poddanych starzeniu indukowanemu winblastyną w obu warunkach tlenowych. Porównywano różne grupy badawcze aby wyszczególnić geny, których ekspresja zmienia się pod wpływem winblastyny w normoksji lub hipoksji oraz te, które zmieniają się w „komórkach starych” pod wpływem hipoksji. Wyniki te przedstawiono jako mapy ciepła. Jestem ciekawa czy wymienione geny przy mapach ciepła są ważne, czy zaprezentowano przypadkowe geny? Jeśli przypadkowe, to dlaczego nie pokazano genów, które są omawiane w tekście (np. geny kodujące IL-8 czy IL-6). Co oznacza NA przy mapie ciepła? Następnie starano się zidentyfikować nadreprezentowane ścieżki w oparciu o bazę danych KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Na podstawie analiz wykazano, że w wyniku indukcji procesu starzenia transkryptom komórek hodowanych w odmiennych warunkach tlenowych jest bardzo podobny. Zidentyfikowano wspólne ścieżki związane z proliferacją i naprawą DNA, a także nadreprezentowane ścieżki, które są specyficzne tylko dla jednego warunku hodowlanego. W normoksji nadreprezentowane były szlaki związane z gospodarką kwasów tłuszczowych, podczas gdy w warunkach obniżonego tlenu ścieżki związane z metabolizmem cukrów. Zwraca uwagę fakt, że geny, których ekspresja jest obniżona (mimo, że jest ich mniej), pozwoliły na zidentyfikowanie większej liczby nadreprezentowanych ścieżek niż geny „regulowane w górę”, a których zdecydowanie jest więcej (Ryc. 27, 28, 29 oraz Ryc. 30 i 31). Dlaczego wśród ścieżek wytypowanych po analizie genów o podwyższonej ekspresji w normoksji znalazł się szlak sygnałowy związany z HIF-1 (Ryc. 31)?

Kolejnym celem rozprawy doktorskiej było określenie roli autofagii w starzeniu komórkowym indukowanym terapią. W pierwszej kolejności sprawdzano czy zahamowanie autofagii, na wczesnych jej etapach ma wpływ na indukcję starzenia. Doktorantka twierdzi, że genetyczna modulacja wczesnych etapów autofagii nie wpływa na proliferację i aktywność metaboliczną (żywołność) komórek traktowanych winblastyną lub 5-fluorouracyłem. Jednak w swojej pracy Pani mgr Agata Borkowska nie potwierdziła skuteczności wyciszenia genów *ATG* (*ATG5*, *ATG7*, *BECN1* czy *ULK1*) na poziomie mRNA czy białka. Nie analizowała także przekształcania białka LC3 do postaci LC3-II (markera indukcji autofagii) po zastosowaniu małych cząsteczek siRNA. Dlatego powyższy wniosek budzi moje wątpliwości.

Następnym krokiem było sprawdzenie czy zahamowanie autofagii na jej późnych etapach (tj. na etapie powstawania autolizosomów) może wpłynąć na żywołność „komórek starych” oraz na ich zdolność do odzyskania potencjału proliferacyjnego, tzw. „ucieczka” od starzenia. W tym celu testowano dwa związki chemiczne bafilomycynę (BafA1) i hydroksychlorochinę (HCQ), które hamują powstawanie oraz wpływają na funkcjonowanie autolizosomów. Wykazano, że BafA1 ma działanie cytotoksyczne na komórki raka nerki traktowanych winblastyną lub 5-fluorouracyłem. W dalszych swoich badaniach Doktorantka skupiła się na HCQ, która jest stosowana w leczeniu malarii i chorób autoimmunologicznych. Na podstawie doświadczeń analizujących wpływ HCQ na aktywność metaboliczną i proliferację „komórek starych” (tj. wcześniej poddanych działaniu winblastyny lub 5-fluorouracylu) oraz „komórek młodych” (bez wpływu cytostatyków, a poddanych działaniu tylko HCQ) Doktorantka starała się dobrać takie stężenie HCQ, które mogłoby selektywnie wpływać tylko na „komórki stare”. Analizowała wpływ HCQ na śmiertelność komórek jak i potencjał proliferacyjny komórek, wykazała, że HCQ nie działa selektywnie tylko na komórki stare, ponieważ zmiany obserwowano w komórkach „starych” jak i „młodych”. Co ciekawe, w obu typach komórek obserwowano pojawienie się populacji komórek apoptotycznych (ok. 10% dla „komórek młodych” i 40% dla „komórek starych”), zmieniał się także procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego. Powyższym zmianom towarzyszył spadek ufosforylowanej formy białka Rb. Natomiast w „komórkach starych” (traktowanych winblastyną) HCQ zwiększała procentowy udział komórek w fazie G2/M oraz wzrastał odsetek komórek poliploidalnych chociaż tylko w hipoksji. Zaobserwowano także istotne statycznie różnice w poziomie białek p53 i p21 w „komórkach starych” gdy dochodziło do zahamowania autofagii. W normoksji HCQ zmniejszała akumulację białka p53, podobny efekt obserwowano dla białka p21, ale w warunkach obniżonego tlenu. Na tej podstawie Doktorantka wnioskuję, że stare, poliploidalne komórki nowotworowe mogą odzyskiwać potencjał proliferacyjny tj. „uciekają” od starzenia po zahamowaniu autofagii. Nie jestem przekonana, że tak daleko idące wnioski można wyciągnąć na podstawie półilościowej metody jaką jest metoda western blot.

Aby poprzeć powyższą hipotezę Doktorantka przy udziale mikroskopu fluorescencyjnego analizowała zmiany w morfologii jąder komórkowych. Szczególną uwagę poświęca komórkom z „jądrami pączkującymi”, których obecność miałaby świadczyć o „ucieczce” komórek potomnych od starzenia. W komórkach traktowanych winblastyną zaobserwowano wzrost liczby komórek z „jądrami pączkującymi”, a zahamowanie autofagii istotnie zwiększało tę populację (do ok. 30%) w obu warunkach tlenowych. Doktorantka na tej podstawie wnioskuję, że dochodzi do generacji komórek potomnych. Należy nadmienić, że zjawisko wznowy proliferacji nowotworowych komórek poliploidalnych zachodzi bardzo rzadko i trudne jest do uchwycenia, czy to metodą obrazowania Time-laps czy za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Mikroskop konfokalny jest bardziej właściwy do analizy tak subtelnych zmian morfologicznych. Można byłoby także sprawdzić czy obserwowane subjądra komórkowe są pozytywne dla białka Ki67, markera proliferacji. Uważam, że na podstawie zmian morfologii jąder komórkowych nie można wnioskować, że dochodzi do powstania komórek potomnych.

Kolejnym krokiem było zbadanie czy rzeczywiście HCQ hamuje proces autofagii na końcowym jej etapie, to jest na etapie fuzji autofagosomu z lizosomem, które są źródłem kwaśnych hydrolaz. Akumulacja białka LC3-II z jednoczesnym brakiem degradacji białka p62/SQSTM1, potwierdza zablokowanie przepływu autofagii, który w literaturze anglojęzycznej określa się mianem *autophagic flux*. Co ciekawe, najsilniejszy efekt obserwowano w komórkach stymulowanych winblastyną w warunkach hipoksji. Z kolei analiza aktywności lizosomalnej jak i pomiar sekrecji katepsyny S (lizosomalnej proteazy cysteinowej) sugeruje, że blokada aktywności enzymów lizosomalnych w „komórkach starych” jest przejściowa i już po trzech dniach od stymulacji HCQ następuje wzrost ich aktywności w obu warunkach tlenowych, chociaż wyższy poziom obserwowano w warunkach niedoboru tlenu. Ponadto wykazano, wpływ HCQ na sekrecję białek wchodzących w skład SASP. Sekrecja IL-8, VEGF, osteopontyny wzrastała zarówno w „komórkach młodych” jak i „starych” głównie w hipoksji po zahamowaniu autofagii.

Kolejnym krokiem była pogłębiona analiza bioinformatyczna w celu wytypowania potencjalnych ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za odzyskiwanie potencjału proliferacyjnego, wynikającego z zahamowania autofagii, przez „komórki stare” hodowane w warunkach hipoksji. Dlatego porównano transkryptom dwóch grup

komórek: „komórek starych” z zahamowaną autofagią i hodowanych w normoksji lub hodowanych w warunkach hipoksji. Wykazano, że odmienne warunki tlenowe indukują zmiany w ekspresji 67 genów, z czego 7 genów miało obniżoną ekspresję, a 60 podwyższoną w warunkach hipoksji. Spośród 7 genów o obniżonej ekspresji, cztery z nich kodowały białka, w tym oksygenazę hemową (HO-1). Na podstawie analizy genów o podwyższonej ekspresji zidentyfikowano nadreprezentowaną ścieżkę sygnałową związaną z metabolizmem azotu, do którego przypisano geny kodujące białka anhidraz węglanowych (ang. *Carbonic Anhydrase*, CA), odgrywających kluczową rolę w obniżaniu pH w środowisku guza. Tak jak sama Doktorantka stwierdziła, to czy mogą one pełnić rolę w procesie „ucieczki” od starzenia wymaga dalszych analiz. W celu weryfikacji otrzymanych wyników z analizy NGS, przeprowadzono dla wybranych genów analizę ekspresji genów metodą *real time PCR*.

Podsumowanie. Badania prowadzone in vitro, wykazały, że stosując chemioterapię można zaindukować proces starzenia zarówno w ludzkich jak i mysich komórkach raka nerki. Zahamowanie autofagii może osłabić efekt działania związków indukujących starzenie i sprzyjać odzyskaniu potencjału proliferacyjnego przez komórki nowotworowe indukowane do starzenia. Efekt „ucieczki do starzenia” był bardziej wyraźny gdy komórki hodowano w warunkach niedoboru tlenowego.

Ostatnie dwa cele rozprawy doktorskiej miały za cel zweryfikować wyniki uzyskanych *in vitro*. W pierwszej kolejności starano się opracować zwierzęcy model starzenia indukowanego terapią w syngenicznym mysim modelu raka nerki.

Zaproponowano następujący schemat doświadczenia. W pierwszej kolejności implantowano mysie komórki raka nerki RenCa podskórnie, po 10 dniach od implantacji, gdy guzy zaczynały być wyczuwalne, zwierzęta poddawano dwuetapowemu leczeniu. W pierwszym etapie wszystkie myszy otrzymywały winblastynę w dawce 0.5 mg/kg ciała, lek podawano codziennie przez 5 dni, po czym następowała 3 dniowa przerwa w leczeniu, aby następnie cały cykl powtórzyć, chociaż z niższą dawką winblastyny tj. 0.38 mg/kg ciała. Ten etap powinien odzwierciedlać myszy model starzenia indukowanego terapią. Analiza objętości guza wykazała stabilny przyrost masy tkankowej guza pomiędzy 10 a 21 dniem od implantacji, aby pomiędzy 21 a 26 dniem nastąpił spadek objętości guza. Mogłoby to sugerować, że zahamowanie wzrostu guza nastąpiło na skutek działania chemioterapii i wynikającej z tego indukcji starzenia. Szkoda, że na potwierdzenie indukcji starzenia, nie wykonano barwienia histochemicznego na aktywność SA- β -galaktozydazy na skrawkach guzów pochodzących od zwierząt niepoddanych leczeniu i leczonych winblastyną. Ponadto bardzo duża śmiertelność zwierząt, z powodu wysoce toksycznych dawek winblastyny pokazuje, że model nie jest idealny i wymaga opracowania innego schematu doświadczenia i/lub doboru innych dawek. Spośród 52 zwierząt wziętych do eksperymentu, zaobserwowano zgon 15 osobników, a dodatkowo 8 musiało być wyłączone z doświadczenia przed przystąpieniem do ich randomizacji. U zwierząt tych zaobserwowano gwałtowny rozrost guzów i z przyczyn etycznych poddano eutanazji.

Drugi etap doświadczenia obejmował randomizację zwierząt, część zwierząt otrzymywała wyłącznie winblastynę w dawce 0,3 mg/kg ciała lub winblastynę z HCQ w dawce 30 mg/kg ciała, po 5 dniach od randomizacji doświadczenie zakończono. I na tym etapie zaobserwowano dużą śmiertelność, łącznie w obu grupach badawczych na drugim etapie zaobserwowano zgon 13 zwierząt przed zakończeniem doświadczenia. W sumie w całym eksperymencie tylko 14 zwierząt (ok 27%) dotrwało do końca doświadczenia. Pokazuje to, że doświadczenie wymaga opracowania lepszego schematu. Z kolei pośmiertna analiza nieprawidłowości anatomicznych organów zwierząt biorących udział w eksperymencie potwierdza silną toksyczność leków. Dziwi, że mimo problemów z przyswajaniem pokarmów oraz innych problemów zdrowotnych u zwierząt w trakcie doświadczenia, nie zaobserwowano różnic w masie ciała. Na podstawie analizy parametrów krwi jak i wagi organów, Doktorantka stwierdza, że nie było różnic w toksyczności stosowanych leków pomiędzy dwoma grupami zwierząt z guzem. Jestem ciekawa jak na tym tle wyglądają powyższe parametry u zwierząt, które mają guz, ale nie poddano leczeniu.

Z kolei analiza western blot markerów autofagii jak i białek autofagicznych wykazała, że HCQ indukuje autofagię *in vivo*, ale bez wpływu na przepływ autofagiczny (ang. *autophagic flux*), jak Doktorantka tłumaczy brak zahamowania autofagii? Czy należało by zmienić dawkę HCQ?

Analiza aktywności SA- β -galaktozydazy na skrawkach guzów pochodzących od zwierząt leczonych tylko winblastyną lub razem z HCQ sugeruje obecność komórek starych, co więcej nie stwierdzono różnic pomiędzy badanymi grupami. Barwienie to jednak nie daje odpowiedzi czy jest to rzeczywisty efekt winblastyny. Zabrakło mi wyników z barwienia tkanki nowotworowej pochodzącej od zwierząt niepoddanych leczeniu winblastyną. Z kolei analiza poziomu białek wchodzących w skład SASP, pokazała wzrost poziomu IL-8 i osteopontyny w guzach pochodzących od zwierząt, które otrzymywały dodatkowo HCQ. Tak jak poprzednio zabrakło mi analizy poziomu cytokin uzyskanych ze zwierząt z guzem, ale nieleczonych. Pokazałoby to szerszy obraz wpływu samej winblastyny

na produkcję białek SASP. Ponieważ Doktorantka analizowała materiał tkankowy, dlatego błędne jest stwierdzenie, że analizowano sekrecję cytokin SASP.

Starzenie komórkowe ściśle związane jest z zatrzymaniem podziałów komórkowych, dlatego w następnej kolejności analizowano poziom białek związanych z regulacją cyklu komórkowego. Analiza ufosforylowanej formy cdc2, cytokiny B oraz ilościowa analiza markera aktywnie proliferujących komórek, tj. białka Ki67 wykazała, że HCQ nie wpływa na proliferację komórek w guzie. Z kolei analiza western blot wykazała brak wpływu HCQ na aktywności ścieżki p53/p21^{CIP1/WAF1}, zaobserwowano jedynie obniżony poziom białka p16^{INK4}, który wpływa na poziom fosforylacji białka Rb. Nasuwa się pytanie, dlaczego nie pokazano zmian w fosforylacji tego białka. Z kolei analiza proteolizy białka PARP-1, wskazuje na pojawienie się tzw. „formy ciętej”, której obecność może świadczyć o śmierci apoptotycznej komórek indukowanej podaniem chemioterapeutyków (winblastyna i HCQ). Wyniki te korelują z wynikami uzyskanymi *in vitro*. Doktorantka, na podstawie powyższych wyników wnioskuje, że HCQ nie wpływa istotnie na proliferację komórek w guzie, ale obniżony poziom białka p16^{INK4} może wskazywać na wczesne oznaki „ucieczki” od starzenia.

Ostatnim zagadnieniem poruszonym w rozprawie doktorskiej jest analiza wpływu HCQ na mikrośrodowisko guza. Analizowany jest wpływ HCQ na poziom białek zaangażowanych w różne odpowiedzi komórkowe m.in. na stres oksydacyjny, przejście ektelialno-mesenchymalne (EMT), macierzystość, hipoksję i odpowiedź immunologiczną. Jedyną różnicę jaką zaobserwowano jest podwyższony poziom peroksydazy glutationowej (GpX1), co może świadczyć o aktywacji odpowiedzi antyoksydacyjnej. Wnioski w wielu przypadkach wyciągano na podstawie barwień immunohistochemicznych. Mam duże zastrzeżenie co do jakości zdjęć prezentowanych w rozprawie doktorskiej. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się na pokazanie zdjęć zrobionych przy większym powiększeniu i lepszej jakości, aby można było ocenić jakość barwienia. Na przykład czynnik transkrypcyjny HIF2 α powinien mieć lokalizację jądrową, a na podstawie zamieszczonego zdjęcia trudno to stwierdzić. Ponadto, nie należy wyciągać daleko idących wniosków na podstawie pojedynczego barwienia.

Badania prowadzone *in vivo*, częściowo przybliżyły Doktorantkę do celów, które postawiła sobie na początku doktoratu. Zaproponowany model starzenia indukowanego terapią w mysim modelu raka nerki wymaga jednak dalszych modyfikacji. Eksperymenty *in vivo* wykazały, że zastosowanie HCQ w perspektywie krótkotrwałej terapii nie przyczynia się do zwiększenia toksyczności chemioterapeutyków, nie wpływa także na potencjał proliferacyjny komórek, na poziom białek związanych z procesami takimi jak: EMT, macierzystość czy hipoksja. Ponadto analizy molekularne wykazały, że HCQ wpływa na białka SASP, IL-8 oraz osteopontyny, co korelowało ze spadkiem poziomu białka p16^{INK4} oraz podwyższonego poziomu białka antyoksydacyjnego GpX1. Co może sugerować aktywację procesów odpowiedzialnych za „ucieczkę” od starzenia. Wniosek ten wymaga jednak dalszego potwierdzenia.

W 18 stronicowym rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Na podkreślenie zasługuje wnikliwe odniesienie do praktycznie wszystkich dyskutowanych wątków pracy.

Wnioski płynące z ocenianej tu rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w formie podsumowania, niestety nie zostały zebrane w zwięzłe punkty, co pozwoliłoby czytelnikowi w jasny sposób ocenić zawartość całości doktoratu. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się na podsumowanie swoich wyników w formie schematu graficznego pokazującego najważniejsze uzyskane wyniki.

Zastosowane w doktoracie piśmiennictwo, jak wspomniano wcześniej jest bogate (ponad 300 pozycji) i zastosowane w sposób adekwatny do opisanych treści.

Pytania i uwagi

Oprócz pytań i uwag, które zostały przedstawione powyżej w recenzji, w czasie lektury rozprawy doktorskiej nasunęło się kilka pytań i wątpliwości, które mogą zasługuwać na dalsze omówienie podczas obrony.

1. Pewne wątpliwości budzi wybór ludzkiej linii komórkowej raka nerki, RCC4, posiadającej mutację genu VHL (ang. von Hippel-Lindau) w celu porównania wpływu różnych warunków tlenowych na proces starzenia. Brak funkcjonalnego białka VHL wiąże się z rozwojem „pseudohipoksji”. Dlatego mam pytanie, dlaczego do swoich doświadczeń nie wybrano linii komórkowej bez mutacji w genie VHL?

2. Doktorantka w swojej pracy nie pokazała dowodu, że rzeczywiście dochodzi do stabilizacji i akumulacji czynnika HIF1 α , w odpowiedzi na niski stopień zawartości tlenu w komórkach.

3. Wykazano, że winblastyna może nie tylko indukować starzenie, ale także indukuje proces autofagii. Dlatego nasuwa się pytanie, jakie mogą być wzajemne współzależności pomiędzy dwoma procesami, czy najpierw dochodzi do indukcji starzenia, a może autofagii, czy może oba procesy są indukowane jednocześnie? Jaka jest opinia Doktorantki.

Uwagi szczegółowe

1. W sekcji „Materiały i metody” (strona 43, 47, 69) Doktorantka odwołuje się do rozdziałów np. 4.1.1.1; 4.1 oraz 7.2.14.2, których nie ma w rozprawie doktorskiej. Pomyłono także nr rozdziału na stronie 64 oraz numery tabel na stronie 66. Nie podano numeru rozdziału na stronie 66.
2. W sekcji „Materiały i metody” (strona 49, 50) przy użyciu kriostatu z zamrożonego materiału wykonuje się skrawki histopatologiczne o grubości 6µm, a nie 6µM.
3. W sekcji „Materiały i metody” (strona 51) – pomyłono nazwy angielskie fali światła wzbudzającego z falą światła emitowanego.
4. W sekcji „Materiały i metody” (strona 66) w tabeli 9 podano skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do odwrotnej transkrypcji. Podane stężenie mieszaniny nukleotydów (dNTP) jest nieprawidłowe i powinno być 10 mM, a nie 100 mM.
5. W sekcji „Wyniki” (Ryc. 21B, strona 84), źle opisano wykres (zamiast VIN 75 powinno być 5-FU 75)
6. W sekcji „Wyniki” (strona 93, 94), błędnie cytowana jest figura 26, powinno być figura 28
7. W sekcji „Wyniki” (Ryc. 43, strona 112) – brak oznaczeń wykresów: A, B, C, D itd.
8. W sekcji „Wyniki” (strona 112) – zamiast Ryc. 43A,B powinno być Ryc. 44A, B
9. W sekcji „Wyniki” (strona 113) – pod koniec akapitu pomyłono numerację rycin, powinno być Ryc. 45 i Ryc. 46
10. W sekcji „Wyniki” (Ryc. 49, strona 120) – błąd w opisie ryciny, powinno być „Dane dotyczą komórek hodowanych w normoksji” a nie jak podano w hipoksji;
11. W sekcji „Wyniki” (Ryc. 49, Ryc. 50) – mylący opis rycin „Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (VIN N)”. Czy można nazywać komórki traktowane winblastyną jako nietraktowane?
12. W sekcji „Wyniki” (Ryc. 51, strona 122) – błąd w opisie ryciny, powinno być „Diagram Venna dla genów o obniżonej ekspresji B, Diagram Venna dla genów o podwyższonej ekspresji.”
13. Należy pamiętać, że nomenklatura genów jest odmienna od nomenklatury białek. Geny zwykle pisane są kursywą. Ponadto systemy nomenklaturowe rozróżniają również specyficzność człowiek-kontra-nie człowiek, stosując inną kapitalizację liter. Ludzkie geny i białka zapisujemy dużymi literami.

Na uwagę zasługuje fakt, że Pani mgr. Agata Borkowska jest współautorem pięciu prac: dwóch przeglądowych i trzech doświadczalnych, a w jednej z nich jest pierwszym autorem. Prace zostały opublikowane w prestiżowych, zagranicznych czasopiśmie (IF od 4.7 do 14.5).

Wniosek końcowy

Powyżej wymienione wątpliwości nie umniejszają jednak w moim odczuciu jakości i wagi dokonanych przez doktorantkę odkryć. Pani mgr Agata Borkowska podjęła się zbadania ciekawych zjawisk z użyciem szerokiego wachlarza metod. A uzyskane wyniki mogą otwierać nowe perspektywy badawcze na przyszłość.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U 2018 poz. 1668).**

W związku z powyższym wnoszę do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Agaty Borkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Iwona Ciechomska