

Prof. dr hab. Jacek Bigda

Zakład Biologii Komórki i Immunologii

Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Borkowskiej:

pt. **„Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka nerki: analiza *in vitro*
i *in vivo*”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Claudine Kieda jako promotora i dr Haliny
Waś jako promotora pomocniczego

Rak nerki stanowi poważny problem medyczny i pomimo znaczących postępów diagnostyki i terapii wciąż jego rozpoznanie zwłaszcza w późniejszych, przerzutowych fazach rozwoju zapowiada bardzo niekorzystne rokowanie dla chorego. Co istotne, głównym sposobem leczenia pozostaje wciąż leczenie chirurgiczne, chemioterapeutyki mają bardzo ograniczoną skuteczność, stosowanie zaś cytokin – interferonu alfa czy interleukiny 2 jest obarczone znaczną toksycznością. Nowe możliwości daje zastosowanie inhibitorów angiogenezy oraz modulatorów odpowiedzi immunologicznej, przeciwciała interferujących z molekułami CTLA4 czy PD-1. W trakcie powyższych terapii może jednak pojawiać się oporność na stosowane leczenie. Należy jednak podkreślić, że same komórki nowotworowe raka nerki wykazują wysoką oporność na dostępne i skuteczne w przypadku innych terapii nowotworowych chemioterapeutyki. Może to wynikać zaburzeń szlaków związanych z reakcją komórek raka nerki na hipoksję, stosunkowo wysokim stopniem angiogenezy w nowotworach nerki, znaczącą aktywacją czynników uruchamianych w procesie hipoksji, które mogą powodować ostatecznie zmiany komórek w kierunku starzenia. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany, a podjęte badania miały stanowić asumpt do jego lepszego zrozumienia.

Podjęty problem badawczy uważam za aktualny i bardzo interesujący nie tylko z punktu widzenia szczególnych cech biologicznych komórek raka nerki, ale także z powodu dużego znaczenia oporności na chemioterapeutyki w efektywnym stosowaniu

leków przeciwnowotworowych, w tym także nowoczesnych inhibitorów kinaz tyrozynowych przyczyniających się w znaczącej mierze do ogromnego rozwoju terapii ukierunkowanych molekularnie.

W przedłożonej rozprawie autorka podjęła się weryfikacji hipotezy zakładającej, że inhibicja procesu autofagii w starzejących się komórkach raka nerki w określonych warunkach dostępności tlenu może spowodować indukcję śmierci tych komórek bądź wznowienie ich proliferacji. W tym celu autorka wykonała szereg analiz *in vitro*: indukcję starzenia komórkowego *in vitro*, ocenę wpływu hipoksji na ten proces, ocenę wpływu inhibicji autofagii na ten proces, ocenę zmian ekspresji genów i poziomu białek zaangażowanych w procesy indukcji starzenia i inhibicji autofagii, w tym za pomocą analizy sekwencjonowania nowej generacji. Prowadziła prace *in vivo* na modelu mysiego raka nerki oceniając wpływ zahamowania autofagii na zmiany molekularne i fenotypowe związane ze starzeniem komórkowym.

Dokumentacja powyższej pracy zawarta jest na 216 stronach maszynopisu w typowym układzie: wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja, zawierającym 71 rycin i 19 tabel, wyodrębniony spis skrótów, wniosków, streszczenie w języku polskim oraz spis rycin, tabel oraz 335 aktualnych i adekwatnie dobranych pozycji bibliograficznych. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a język poprawny i zrozumiały, z niewielką liczbą literówek, błędów interpunkcyjnych. Ich obecność nie przeszkadza w zrozumieniu pracy. Dość często przewijającą się niezręcznością jest stosowanie pojęcia „leczenie” do stosowania terapeutyków wobec komórek w warunkach *in vitro*. Zalecałbym raczej stosowanie pojęcia „traktowanie”, a słowo „leczenie” pozostawiłbym dla zastosowań terapeutycznych „*in vivo*” bądź ewentualnie „*ex vivo*” w przypadku rzadkich w praktyce zastosowań terapii adoptywnej.

Wstęp rozprawy zawiera krótki opis biologii raka nerki, jego typów histologicznych, mikrośrodowiska, metod terapii. W dalszej części wstępu doktorantka koncentruje się na opisie zjawiska hipoksji, jego potencjalnego znaczenia dla rozwoju chemooporności komórek raka nerki, a także starzenia komórkowego, cech starych i podstaw molekularnych powstawania tzw. fenotypu starzeniowego oraz macierzystości komórek nowotworowych, a także procesu ucieczki od starzenia. W dalszej części opisuje proces autofagii, jego mechanizm i przedstawia informacje uzasadniające podjęcie badań w przedłożonej pracy weryfikujące znaczenie inhibicji

autofagii w komórkach raka nerki dla ich dalszych losów – indukcji śmierci bądź przywrócenia potencjału proliferacyjnego.

Wstęp jest rzeczowy, jasno napisany, ograniczony do rzeczywiście niezbędnych faktów. Autorka wykazuje nie tylko głęboką znajomość przedmiotu, ale także umiejętność właściwego doboru informacji niezbędnych dla zrozumienia postawionych celów pracy.

Opis materiałów i metod jest wystarczająco szczegółowy, by umożliwić ich niezależne powtórzenie. Autorka zastosowała liczne, zaawansowane metody biologii komórki i biologii molekularnej, przeprowadziła również złożoną analizę wzrostu guzów nowotworowych u nosicieli myszy Balb/c. Wachlarz metod jest szeroki i świadczy o wysokiej biegłości technicznej autorki.

W obszernym rozdziale poświęconym wynikom autorka w przystępny sposób opisuje indukcję starzenia w warunkach hipoksji i normoksji w liniach komórkowych raka nerki za pomocą winblastyny, gemcytabiny i 5-fluorouracylu. Oceniała następnie wpływ najbardziej i najmniej efektywnego chemoterapeutyku, winblastyny i 5-FU, odpowiednio, na progresję cyklu komórkowego i jego molekularnych wyznaczników, a także wydzielania substancji z grupy SASP charakterystycznych dla starzejących się komórek – w tym m. in. IL-8, osteopontyna, VEGF-A. W tym miejscu (str. 87) sformułowaniem na wyrost jest „analiza sekretomu”, jeśli oceniano wybrane czynniki. Następnie autorka wykazała zachodzenie procesu autofagii w starzejących się komórkach raka nerki. W kolejnej części wyników doktorantka opisała zmiany ekspresji genów zachodzące w wyniku indukcji starzenia po traktowaniu winblastyną w normoksji i hipoksji. W dalszych doświadczeniach autorka oceniła wpływ zahamowania autofagii na starzenie komórek raka nerki. Stwierdziła, że jej inhibicja na wczesnych etapach nie wpływa na starzenie komórkowe, natomiast zahamowanie późnych etapów autofagii hamowało aktywność metaboliczną i proliferację poddanych starzeniu komórek raka nerki. W warunkach hipoksji zaobserwowała, że zahamowanie autofagii może sprzyjać ucieczce od starzenia i powstawaniu potomnych komórek. Mogło to wynikać z zahamowania późnego etapu autofagii, tj. fuzji autofagosomów z lizosomami, co potwierdziło się w kolejnych doświadczeniach. Przeprowadzona następnie analiza ekspresji genów porównująca transkryptomy komórek traktowanych winblastyną oraz wiblastyną i inhibitorem autofagii w różnych

warunkach tlenowych miała pozwolić na identyfikację genów potencjalnie zaangażowanych w obserwowaną w hipoksji szybszą ucieczkę od starzenia i generację komórek potomnych. Autorka zidentyfikowała potencjalne geny związane z regulacją metabolizmu, reorganizacją chromosomalną i cytokinezą. W dalszej części rozdziału autorka opisała wyniki doświadczeń prowadzonych *in vivo*, w których planowała ocenić wpływ inhibicji autofagii na proces starzenia komórek nowotworowych indukowany chemioterapią. W guzach badanych nosicieli nowotworów wykazała cechy starzenia komórkowego, a także pewne cechy modulacji autofagii po zastosowaniu jej inhibitora oraz niektóre cechy molekularne komórek uciekających od starzenia. Doświadczenia te były prowadzone na komórkach mysich różniących się od ludzkich posiadaniem funkcjonalnego genu kodującego pVHL, co mogło jednak wpłynąć na inny obraz reakcji na hipoksję w warunkach *in vivo*, a także ostatecznie na działanie inhibitora autofagii.

Rozdział poświęcony wynikom jest napisany starannie, bez językowych zawiłości. Wyniki ilustrowane są klarownymi, starannymi rycinami i tabelami, zawierającymi proste i precyzyjne wskazówki wynikające z analizy statystycznej.

Dyskusja jest rzeczowa i zwięzła. Autorka umiejętnie skonfrontowała w niej uzyskane wyniki z danymi literaturowymi oraz przekonująco zinterpretowała własne dane. Wykazała jednocześnie głęboką znajomość dostępnej literatury. Doktorantka przedstawiła wnioski podsumowujące uzyskane rezultaty, odpowiadające celom postawionym w pracy oraz znajdujące w moim przekonaniu uzasadnienie w przedstawionych wynikach.

Reasumując: autorka wykazała możliwość indukcji procesu starzenia komórkowego w komórkach raka nerki, wskazała również na zestaw nowych genów oraz wcześniej nieidentyfikowanych szlaków sygnalizacyjnych, których przyszła wnikliwa ocena może pozwolić na lepsze zrozumienie procesu starzenia komórkowego. Autorka zidentyfikowała również również sposób inhibicji autofagii starzejących się komórek i opisała jego konsekwencje, między innymi ucieczkę od starzenia. Kontynuacja tych badań może przynieść informacje o istotnym znaczeniu dla opracowania nowych koncepcji terapeutycznych.

Obok proponowania wniosków noszących niewątpliwie znamiona oryginalności naukowej, doktorantka udokumentowała uzyskanie znacznych umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy badawczej. Wykazała również umiejętność interpretacji złożonych wyników oraz konfrontacji uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. W związku z powyższym przedstawiam opinię, że rozprawa odpowiada warunkom określonym w stosownych zapisach ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty Borkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 27 sierpnia 2023 roku

prof. dr hab. Jacek Bigda