



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Kierownik

Prof. dr hab. HANNA ROKITA

Kraków, 19 kwietnia 2021 r.

Recenzja

pracy doktorskiej p. mgra Alexandra Corteza

**pt „WPŁYW BIAŁKA ITGBL1 NA FENOTYP KOMÓREK RAKA
JAJNIKA”**

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy określenia wpływu nadekspresji białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika. Wg World Ovarian Cancer Atlas 2020, każdego roku u 7-miu na 100 tysięcy kobiet może rozwinąć się rak jajnika. W 2018 r. Polska była na 10-tym miejscu na świecie pod względem liczby zachorowań na tego raka. W 2020 r. w USA było 21 750 nowych przypadków i 13 940 przypadków śmiertelnych. W tym samym roku pięcioletni wskaźnik przeżycia dla najwyższego stopnia zaawansowania wyniósł jedynie 17%. Leczenie raka jajnika napotyka jednak na wiele przeszkód wynikających nie tylko z późnej diagnozy, ale także braku czułych i swoistych markerów molekularnych.

Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią kontynuację wcześniejszych badań prowadzonych przez zespół promotorki rozprawy, p. prof. Katarzyny Lisowskiej, w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddziale w Gliwicach. Punktem wyjścia do badań zawartych w rozprawie stała się wcześniejsza obserwacja tego zespołu, że dla pacjentek z rakiem jajnika charakteryzującym się wyższą ekspresją białka ITGBL1 w guzie, czas całkowitego przeżycia jest znacznie krótszy.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska stanowi połączenie opublikowanych już w języku angielskim dwóch prac i trzech doniesień konferencyjnych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku

oddziaływania tych 5-ciu publikacji wynoszącym prawie 28. Publikacje te stanowią główny trzon rozprawy. We wszystkich tych publikacjach mgr Alexander Cortez jest pierwszym autorem a jego wiodący udział w powstaniu tych prac został potwierdzony przez Niego, p. prof. Lisowską i czwórkę pozostałych współautorów, którzy precyzyjnie określili swoje udziały w poszczególnych publikacjach. Z kolei zamieszczony na samym końcu rozprawy wykaz dorobku naukowego pozwala zorientować się, że p. mgr Cortez jest dotychczas współautorem dziewięciu oryginalnych publikacji anglojęzycznych i jednej pracy przeglądowej opublikowanej w Cancer Chemotherapy and Pharmacology w 2018 r., 3 publikacji w języku polskim oraz 53 doniesień konferencyjnych.

Rozprawa zawiera listę publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz kilkunastostronicowe Streszczenie w języku polskim, stanowiące zwięzłe omówienie wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy. Rozdział ten obejmuje wprowadzenie do tematyki rozprawy, opis heterogenności raków jajnika, opis tytułowego białka nr 1 podobnego do integryn β (ITGBL1) i badań nad tym białkiem oraz podsumowanie. Streszczenie zostało uzupełnione spisem 50-ciu cytowanych w tym rozdziale pozycji piśmiennictwa. Rozdział jest napisany ładnym precyzyjnym językiem i bardzo dobrze zredagowany. Mam jedną uwagę dotyczącą sposobu podania czasów przeżycia chorych reprezentujących dwa podtypy molekularne nisko zróżnicowanego raka surowiczego jajnika; tzw. mediana całkowitego czasu przeżycia (OS) została wyrażona prawdopodobnie w dniach (czego nie podano, str. 5), podczas gdy w **Publikacji nr 1** te czasy są wyrażane w miesiącach.

Ocena merytoryczna

Publikacja nr 1, to praca przeglądowa (Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM, Advances in ovarian cancer therapy. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2018, 81(1), 17-38), przedstawiająca postępy w leczeniu raka jajnika do 2018 r. Publikacja ta była dotąd cytowana aż 160 razy (Web of Knowledge, stan na 18 kwietnia 2021 r.), co bardzo dobrze odzwierciedla wagę tego opracowania dla specjalistów zajmujących się badaniem i leczeniem raka jajnika. W liczącej ponad 20 stron publikacji omówiono standardowe leczenie raka jajnika, chemioterapię dootrzewnową połączoną z hipertermią oraz nowe cele terapii raka jajnika z uwzględnieniem inhibitorów angiogenezy, hamowania

VEGF-u i inhibitorów receptorów VEGF. Ponadto opisano inhibitory PARP, kinaz tyrozynowych receptorów EGF-u, inhibitory receptora kwasu foliowego α i immunoterapię raka jajnika. Dodatkowo przedstawiono leczenie paliatywne w przypadku złośliwej formy tego raka w postaci wysięków dootrzewnowych.

Do tej publikacji mam uzupełnienie dotyczące immunoterapii raka jajnika (właściwie onkolitycznej wiroterapii). Prace współpracującej z Uniwersytetem Jagiellońskim prof. Danuty Kozbór z Roswell Park Comprehensive Cancer Center (Buffalo, NY, USA) pokazują, że zastosowanie w modelu przedklinicznym onkolitycznego wirusa vaccinia wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4 w kontekście części Fc IgG, pozwala na zastosowanie go w leczeniu opornego na związki platyny raka jajnika. W ten sposób powstało nowe podejście immunoterapeutyczne celujące do supresyjnego mikrośrodowiska guzów opornych na chemioterapię. Metoda ta jest obecnie wprowadzana w etap I fazy badań klinicznych w RPCCC.

Publikacja nr 2 jest obszerną pracą doświadczalną przedstawiającą wyniki badań nad rolą białka ITGBL1 w komórkach raka jajnika. Wcześniejsze badania zespołu p. prof. Lisowskiej wskazały na przynależność genu *ITGBL1* (ang. *Integrin beta-like 1*) do negatywnej sygnatury prognostycznej nisko zróżnicowanego raka surowiczego jajnika. Jak wspomniano we wstępie tej recenzji, dla pacjentek z rakiem jajnika charakteryzującym się wyższą ekspresją białka ITGBL1 w guzie, czas całkowitego przeżycia był znacznie krótszy. Już w 2013 r. wykazano potencjalne właściwości onkogenne tego białka, które wzmagало tempo migracji komórek raka jajnika (Kujawa KA, Cortez AJ, Maciola A, Olbryt M, Kujawa T, Lisowska K, Eur J Cancer, 2013). Na potrzeby rozprawy doktorskiej, biorąc pod uwagę brak jednoznacznych badań nad ITGBL1, Doktorant podjął się dalszej charakterystyki funkcji genu *ITGBL1* w liniach komórkowych raka jajnika w warunkach hodowli *in vitro*.

Do **najważniejszych wyników** uzyskanych przez Doktoranta należy oznaczenie wzoru ekspresji 4 różnych wariantów mRNA *ITGBL1* w pięciu różnych liniach komórkowych raka jajnika, który pozwolił udowodnić, że jedynie linia OVPA8 (wyprowadzona przez zespół p. prof. Lisowskiej) wykazuje ekspresję wszystkich 4 wariantów transkryptu tego genu. Z kolei dwie linie OAW42 i SKOV3 z niemal niewykrywalną ekspresją mRNA *ITGBL1*, wykorzystano w stworzeniu modelu komórkowego nadekspresji *ITGBL1*. Wyprowadzenie tych

dwóch genetycznie zmodyfikowanych linii komórkowych ze stabilną nadekspresją *ITGBL1*, OAW42 i SKOV3, pozwoliło prowadzić testy funkcjonalne i globalną analizę ekspresji genów na szerszą skalę.

Ważną grupę wyników stanowią właśnie **testy funkcjonalne** zmodyfikowanych genetycznie komórek. Testy adhezji do podłoża i rozplaszczania się pokazały, że nadekspresja *ITGBL1* powoduje obniżenie adhezji w jej początkowej fazie, ale przyspiesza rozplaszczanie się komórek. Następnie pokazano, że komórki wykazujące nadekspresję *ITGBL1* są bardziej ruchliwe i zdolne do inwazji, co potwierdziło hipotezę Autorów publikacji o pozytywnym wpływie *ITGBL1* na te obie właściwości komórek raka jajnika. Analiza tempa proliferacji komórek z nadekspresją *ITGBL1* wykazała brak wpływu zwiększonej obecności badanego białka na ten proces, chociaż strukturalne podobieństwo budowy tego białka do EGF-u pozwalało snuć takie przypuszczenie. Z kolei wyznaczenie faz cyklu komórkowego pokazało, że białko *ITGBL1* nie wpływa na rozkład faz tego cyklu.

Ponadto wykazano, że obie linie komórkowe z nadekspresją *ITGBL1* są nieznacznie, ale bardziej odporne na dwa leki stosowane w chemioterapii pierwszego rzutu raka jajnika – cisplatynę i paklitaksel, chociaż klasyczne szlaki związane z chemioopornością nie były reprezentowane w analizowanych mikromacierzach.

Zastosowanie mikromacierzy DNA dostarczyło sporo danych wskazujących na zmiany pod wpływem nadekspresji *ITGBL1* w komórkowych ścieżkach sygnałowych w obu badanych liniach. Co najistotniejsze, zmiany funkcjonalne tych zmodyfikowanych genetycznie komórek zostały potwierdzone w analizie szlaków wewnątrzkomórkowych. Na podstawie zastosowanej metody nienadzorowanej pogrupowano próbki i wyodrębniono zestawy genów dokonując następnie hierarchicznego grupowania próbek. W obu liniach komórkowych zidentyfikowano po kilkadziesiąt zmienionych znamienne ścieżek sygnałowych, z których część była związana z budową i funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej, komunikacją komórkową, tworzeniem ognisk przylegania czy sygnalizacją za pośrednictwem integryn. Supplement nr 5 i 6 publikacji nr 2 zawiera szczegółowe wyniki tej analizy, które mogą być

podstawą dalszych prac skoncentrowanych na identyfikacji potencjalnych białek zdolnych do oddziaływania z ITGBL1.

Istotne uzupełnienie publikacji nr 2 stanowi siedem suplementów zawierających: analizę kilkunastu publikacji innych autorów nt ITGBL1 (Suppl. Material 1, SM 1); szczegółowe wyniki analizy ilościowej izoform mRNA *ITGBL1* (RT-PCR) (SM 2); prezentację nieprzetworzonych autoradiogramów uzyskanych metodą western blotting (SM 3) czy szczegóły testu proliferacji komórek i pomiaru profilu faz cyklu komórkowego (SM 4). Obszerny SM 5, to analiza PCA, hierarchicznego „klastrowania” i ścieżek sygnałowych w komórkach OAW42 i SKOV3. SM 6, to porównanie własnych wyników profilowania ekspresji genów z wynikami pracy Huang i in. (2020) a SM 7 zawiera omówienie wyników western blotting i immunohistochemii w kilkunastu publikacjach przedstawiających wyniki badań nad ITGBL1. Ten ostatni materiał uświadamia nam, jak trudno niekiedy korzystać z opublikowanych skądinąd w znakomitych czasopismach danych, które pozbawione są wielu potrzebnych szczegółów, np. takich jak markery wielkości białek czy prawidłowo dobrane tkanki kontrolne.

Należy podkreślić, że **metodyka** rozprawy doktorskiej jest bardzo rozbudowana. Stosowane metody, to klonowanie ludzkiego genu *ITGBL1*, wyprowadzenie stabilnych klonów dwóch linii komórkowych raka jajnika wykazujących nadekspresję genu *ITGBL1*, czy izolacja i analiza metodą western blotting białek komórkowych. Izolacja RNA posłużyła do ilościowej analizy wybranych transkryptów oraz analizy mikromacierzy DNA. Testy funkcjonalne badanych linii komórkowych, to test cytotoksyczności, zarastania rany, migracji, inwazji w Matrigelu, proliferacji, przyczepności do podłoża, rozplaszczania się czy oznaczanie profilu faz cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej. Rozbudowana analiza bioinformatyczna i statystyczna wyników mikromacierzy została wykorzystana do globalnej analizy szlaków sygnałowych zmienionych pod wpływem nadekspresji badanego genu.

We wszystkich doświadczeniach zastosowano odpowiednie kontrole, jak np. wyprowadzenie komórek kontrolnych, wykazujących ekspresję pustego wektora retrowirusowego użytego do uzyskania nadekspresji genu *ITGBL1*. To samo dotyczy testów funkcjonalnych.

Dyskusja publikacji nr 2 zasługuje na uwagę, ze względu na jej precyzję i umiejętność porównania własnych wyników z wynikami innych autorów oraz wskazania dalszych kierunków badań na białkiem ITGBL1. W oparciu o dane doświadczalne oraz analizy *in silico*, stwierdzono, że ITGBL1 jest zaangażowane w szlaki komórkowe, w których uczestniczy Wnt, FAK, TGF β , TNFAIP3/NF- κ B czy PI3K/Akt. Doktorant słusznie założył, że jak najbardziej precyzyjne ustalenie białek partnerskich ITGBL1 może przyczynić się do wyjaśnienia onkogennej funkcji tego białka.

Publikacja nr 3, to doniesienie konferencyjne z 2020 r. na temat ekspresji wariantów mRNA *ITGBL1* w różnych liniach raka jajnika. **Publikacja nr 4** opisuje stymulację inwazyjności komórek OAW42 i SKOV3 z nadekspresją ITGBL1 a **publikacja nr 5** przedstawia brak wpływu nadekspresji *ITGBL1* na proliferację tych komórek oraz możliwy w warunkach nadekspresji *ITGBL1* wzrost oporności tych komórek na cisplatynę i paklitaksel.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. **mgr Alexandra Cortez'a** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z tego względu wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie p. mgra Alexandra Cortez'a do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę dotychczasowe osiągnięcia p. mgr Corteza, ale przede wszystkim ze względu na wagę uzyskanych na potrzeby rozprawy doktorskiej wyników, ich nowatorstwo i znakomite przedstawienie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną **nagrodą**.



Hanna Rokita