

UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZIUniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Chemii Biomedycznej**Prof. dr hab. Krystyna Fabianowska-Majewska**

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

tel: (4842) 272 56 98;

e-mail: krystyna.fabianowska-majewska@umed.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej**pt: „Rola tetraspaniny CD151 w progresji raka gruczołu krokowego”****“The role of tetraspanin CD151 in prostate cancer progression”**

wykonanej przez mgr Alicję Grudowską

w Zakładzie Enzymologii Molekularnej w Katedrze Biotechnologii Medycznej
w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy wyjaśnienia czy białko transbłonowe, tetraspanina CD151, można będzie wprowadzić do diagnostyki klinicznej jako biomarker oceny stadium rozwoju raka gruczołu krokowego, przerzutowości i oceny progностycznej choroby pacjenta. Aspekt ten nabiera szczególnego znaczenia w związku z obserwowaną, w ostatnich latach, zwiększoną zachorowalnością na raka wielu narządów w tym także gruczołu krokowego wśród mężczyzn. Uwaga badaczy skierowana jest nie tylko na poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych lecz także na poszukiwaniu nowych morfologicznych i biochemicznych metod diagnostycznych, które pozwolą na dokładną ocenę stadium rozwoju nowotworu, zdolności przerzutowości komórek rakowych jak i pozwolą na ocenę prognozującą dalszy przebieg choroby.

Rozprawa doktorska mgr Alicji Grudowskiej (napisana w języku angielskim) posiada typowy układ następujących rozdziałów: Wstęp, Cel badań, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja i cytowana Literatura. We Wstępie, liczącym 36 stron i zawierającym 21 rycin (w większości z opublikowanych prac innych autorów za ich zgodą lub dostępnych w internecie) i 3 tabele, doktorantka przedstawiła obraz epidemiologiczny zachorowalności na raka gruczołu krokowego i procentową ocenę zgonów na świecie (głównie w krajach rozwiniętych, w tym Stanach Zjednoczonych) i w Polsce. W tym pierwszy podrozdziale interesującym byłoby, po pierwsze, podać lub zasugerować, na podstawie danych literaturowych, jakie są przyczyny tak dużej epidemiologicznej różnicy pomiędzy krajami Ameryki Północnej i Nowej Zelandii a krajami dalekiego Wschodu. Polska plasuje się pomiędzy tymi częściami globu w liczbie nowych zachorowań. Interesującym byłoby także wyjaśnienie czy jedynie wiek lub predyspozycje genetyczne warunkują zwiększone ryzyko zachorowalności. Czy są

dane literaturowe, które wskazują inne czynniki ryzyka, takie jak styl życia (palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, dieta), zanieczyszczenie środowiska lub infekcje wirusowe, które mogą być przyczyną zachorowalności jak i zgonów pacjentów z rakiem prostaty, co w przypadku zgonów wiąże się prawdopodobnie z występowaniem typu raka prostaty o zwiększonej agresywności i przerzutowości. Wyjaśnienie przyczyn zwiększonej zachorowalności byłoby cenną informacją umożliwiającą poprawę działań prewencyjnych i profilaktycznych.

W kolejnych podrozdziałach Wstępu doktorantka przedstawiła funkcję gruczołu krokowego oraz jego anatomiczną, biologiczną i kliniczną charakterystykę, w tym morfologiczne zmiany w czasie rozwoju guza, cechy łagodnego przerostu gruczołu (BPH) jak i nabłonkowego raka prostaty PCa. W tej części został przedstawiony mechanizm kancerogenezy komórek gruczołu krokowego oraz mechanizm prowadzący do inwazyjności komórek guza do innych tkanek, głównie do kości.

Kolejny podrozdział zawiera zwięzły opis stosowanych metod diagnostycznych raka gruczołu krokowego, w tym histologiczne metody, klasyfikujące stadium raka, oraz biochemiczne pozwalające na ocenę poziomu antygenu PSA (Prostatic-Specific Antygen), które to oznaczenie jest powszechnie stosowanym, badaniem przesiewowym. Doktorantka nadmienia także, że na świecie są prowadzone badania nad doborem nowych biomarkerów genetycznych (np. niekodujący mikro-RNA) lub białkowych, będących czynnikami wzrostu, czynnikami transkrypcyjnymi i ich receptorami, kinazami regulującymi szlaki przekazu sygnałów itp. Jednak nowe biomarkery, zdaniem doktorantki, wymagają precyzyjnego opracowania procedur badań diagnostycznych i walidacji wyników. Doktorantka opisuje także diagnostykę w oparciu o kliniczno-histologiczne badania, do których zaliczyła TNM oceniające: umiejscowienie guza pierwotnego, regionu węzłów limfatycznych oraz obecność lub nieobecność przerzutów. Ta ocena histologiczna jest zazwyczaj łączona z oznaczeniem poziomu PSA i oceną stadium rozwoju raka wyrażoną w skali Gleason'a, która obejmuje mikroskopową ocenę (w skali 1 - 5) różnicowania komórek guza.

W chwili obecnej w leczeniu raka gruczołu krokowego są powszechnie stosowane: prostatektomia, chemioterapia i radioterapia. Wielkie nadzieje są pokładane w terapii genowej, która będzie selektywnym leczeniem, ukierunkowanym na stymulowanie apoptozy komórek rakowych lub stymulowanie systemu immunologicznego pacjenta albo hamowanie procesu angiogenezy guza jak i hamowanie jego inwazyjności do innych tkanek pacjenta. Trzeba podkreślić, że terapia genowa to zindywidualizowana terapia zależna nie tylko od typu nowotworu ale dopasowana także do systemu odpornościowego pacjenta.

Interesujące od strony biologicznej i biochemicznej są kolejne podrozdziały Wstępu wyjaśniające współdziałanie białek w przekazie sygnałów w hormonalnej kontroli rozwoju raka gruczołu krokowego. Mechanizm tej regulacji może być zależny od androgenu i wtedy ważną rolę w regulacji pro-

gresji, wzrostu i przeżywalności komórek raka prostaty pełni receptor androgeny. Natomiast w mechanizmie niezależnym od androgeny uruchamiane są dwa szlaki przekazu sygnału PI3K i MAPK, które mogą indukować procesy proliferacji, migracji i przeżycia komórek raka. W kolejnych podrozdziałach doktorantka wyjaśniła mechanizmy w/w procesy, uwzględniając wzajemne zależności i komunikacji pomiędzy białkowymi komponentami mikrośrodowiska a cząsteczkami białek błony komórkowej raka prostaty lub interakcji komórek raka prostaty z osteoblastami.

Prawie 1/3 Wstępu stanowi charakterystyka białka transbłonowego, tetraspaniny CD151, które to białko jest przedmiotem pracy eksperymentalnej doktorantki. Charakterystyka CD151 obejmuje biologiczną funkcję białka, jego rolę w procesie progresji raka prostaty oraz jego wpływ na regulację aktywności integryn, receptorów czynników wzrostu i metaloproteaz macierzy. W części opisującej rolę białka CD151 w kooperacji z innymi białkowymi molekułami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnałów w komórkach raka gruczołu krokowego poszukiwałam aktualnej wiedzy na temat regulacji ekspresji CD151 zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Skoro, wg. danych literaturowych, najczęściej ekspresja tej tetraspaniny wzrasta wraz z agresywnością komórek raka to interesującym byłoby wyjaśnienie czy ta regulacja ma charakter epigenetyczny czy genetyczny i jakie czynniki uruchamiają wzmożenie ekspresji. To pytanie ma związek z uprzednio zadaniem o przyczyny zachorowalności na raka prostaty. Czy różnice w zachorowalności jak i zgonach pomiędzy krajami Ameryki Północnej a krajami dalekiego wschodu mogą być wynikiem różnic w diecie społeczeństw zamieszkujących wymienione kraje?

Celem prac eksperymentalnych mgr Alicji Grudowskiej było zbadanie roli białka CD151 w komunikacji i kooperacji pomiędzy komórkami nabłonkowymi raka gruczołu krokowego a komórkami stromy oraz komórkami rakowymi prostaty a białkami mikrośrodowiska kości.

W celu zrealizowania założeń badawczych doktorantka przede wszystkim musiała przygotować warsztat badawczy, którym były kultury komórek: BPH-1 (niezłośliwego przerostu prostaty), raka prostaty, fibroblastów związanych z guzem jak i prawidłowych fibroblastów gruczołu krokowego oraz hodowli osteoblastów. Hodowane były także komórki rekombinowane genetycznie w celu uzyskania komórek z nieaktywną tetraspaniną CD151. Dzięki takim rekombinacjom białka CD151 była możliwa ocena wpływu tetraspaniny na modulowanie aktywności innych białek i w efekcie końcowym dokonanie oceny roli CD151 w procesach proliferacji, migracji i metastazy komórek raka prostaty. Część doświadczalna zasługuje na szczególną uwagę ponieważ wymagała wielu godzin pracy laboratoryjnej związanej z hodowlami komórek jak i dobrej znajomości i praktycznych umiejętności przy wykonaniu wielu analiz biochemicznych w tym m.in. cytometrii przepływową, analizy białek metodą „Western blotting”, immunodetekcji białek, obrazowania mikroskopowego, analizy ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym oraz analizy migracji komórek przy użyciu

komory Boydena. To szerokie spektrum metod analitycznych jeszcze raz potwierdza dobre przygotowanie doktorantki do samodzielnej pracy badawczej.

Wyniki prac eksperymentalnych doktorantka przedstawiła w formie 17 rycin. W pierwszej części wyniki dotyczyły roli białka transbłonowego CD151 i jego oddziaływania na receptory czynników wzrostu w niezłośliwych komórkach nabłonkowych gruczołu krokowego (BPH-1), w drugiej zaś komórek inwazyjnej linii raka prostaty (PC3). Na podstawie wyników doktorantka wnioskuje, że w komórkach BPH-1 stymulowanych czynnikiem wzrostu FGF2 następuje pobudzenie migracji komórek w wyniku interakcji tetraspaniny CD151, receptora FGFR1 i aktywacji kinazy pro-migracyjnej Src. Natomiast w komórkach PC3, białko CD151 osłabia migrację i inwazyjność poprzez hamowanie pro-inwazyjnej osteoblastycznej stymulacji. Także w odpowiedzi na tę stymulację, CD151 hamuje ekspresję i wydzielanie metaloproteazy macierzy, MMP13.

Tak więc, tetraspanina CD151 pobudza pro-migracyjne zachowanie komórek nabłonkowych prostaty (BPH-1) w odpowiedzi na sygnał z komórek pierwotnego guza, osłabia zaś inwazyjność komórek raka prostaty w mikrośrodowisku zarówno guza jak i kości. Te obserwacje prowadzą do końcowego wniosku, że rola białka jest zróżnicowana i zależna od typu komórek oraz od stadium rozwoju guza i złośliwości jego komórek. Sądzę, że doktorantka mogła wzbogacić badania o pomiar ekspresji CD151 na poziomie mRNA i białka w badanych komórkach jak i materiale klinicznym. Szkoda, że rozdział z wynikami prac eksperymentalnych nie został zakończony kilkupunktowym podsumowaniem, wskazującym nowe elementy działania i kooperacji tetraspaniny CD151 w komórkach raka gruczołu krokowego.

W obszernej dyskusji doktorantka analizuje otrzymane wyniki, konfrontuje je z danymi literaturowymi, i często dostrzega rozbieżności. Zatem jeśli białko CD151 powinno być brane pod uwagę jako biomarker zarówno w celu poszerzenia diagnozowania i prognozowania przebiegu choroby a w przyszłości stać się celem terapii. Tak więc proponowany pomiar aktywności transkrypcyjnej genu białka CD151 wydaje się w pełni uzasadniony.

Bibliografia obejmuje 243 pozycje zebrane w kolejności cytowań, przy czym około 45% cytowań stanowią prace opublikowane w ostatnich 10. latach.

Uwagi zamieszczone w niniejszej recenzji podkreślają jedynie złożoność procesów i roli tetraspaniny CD151 w komunikowaniu się komórek raka prostaty z mikrośrodowiskiem guza i kości, a uwagi te w dużym stopniu są związane z zainteresowaniami badawczymi recenzenta, czyli aspektem epidemiologicznym jak i epigenetyczną regulacją aktywności genów w dużej mierze zależną od stylu życia i diety. Podsumowując stwierdzam, że badania przedstawione w pracy zostały rzetelnie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są wartościowe i mogą stanowić dobry punkt do dalszych badań aplikacyjnych. Wartość merytoryczną oceniam wysoko. Praca zawiera nowe elementy, wzbogacają-

ce wiedzę na temat biologii procesów migracji i przerzutowości komórek raka prostaty oraz stanowi o indywidualnym wkładzie doktorantki do piśmiennictwa dotyczącego zagadnienia będącego przedmiotem dysertacji.

Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Alicji Grudowskiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 11 czerwca 2015r.

KIEROWNIK
ZAKŁADU CHEMII BIOMEDYCZNEJ
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
K. Fabianowska-Majewska
Prof. dr hab. n. med. Krystyna Fabianowska-Majewska