

Akceptuję  
HŁ

Kraków, 02.01.2024 r.



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**PANI MGR INŻ. ALEKSANDRY MAJEWSKIEJ ZATYTUŁOWANEJ**  
**„ROLA PTEN W HIPOKSYJNYM MIKROŚRODOWISKU**  
**RAKA NERKI I CZERNIAKA”**

Zarówno w Polsce, jak i na świecie, nowotwory stanowią poważny problem zdrowotny i społeczny i są wciąż główną przyczyną zgonów. Choć mechanizmy nowotworzenia są intensywnie badane od wielu lat i znane są główne cechy komórek nowotworowych, tzw. „*hallmarks of cancer*” (wprowadzone przez D. Hanahan i R Weinberga), konieczne są dalsze badania nad złożonymi mechanizmami nowotworzenia a szczególnie badania wpływu czynników mikrośrodowiska (np. niedotlenienia) na różne procesy w komórkach nowotworowych, w tym funkcje genów supresorowych.

Pani mgr inż. Aleksandra Majewska postawiła za cel swojej pracy doktorskiej zbadać rolę czynnika PTEN w raku nerki i czerniaku, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu niedotlenienia. Swoje badania zrealizowała w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu Medycznego – Państwowego Instytutu Badawczego pod opieką Pani prof. dr hab. Claudine Kieda (promotor) i Pani dr Klaudii Brodaczewskiej (promotor pomocniczy).

**Formalny opis rozprawy**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska składa się z tekstów trzech publikacji naukowych, ściśle ze sobą powiązanych tematycznie i stanowiących spójną całość. Tytuł rozprawy pokrywa się z treściami publikacji. Pracę otwiera Wykaz skrótów, następnie przedstawiono Streszczenie w języku polskimi i angielskim, a kolejnym rozdziałem jest Wstęp wprowadzający w temat badawczy. Po przedstawieniu Celu i założeń pracy, Doktorantka zamieściła kopie trzech publikacji. Następnym rozdziałem jest Podsumowanie i wnioski. Końcowe rozdziały to Opinia (zgoda) komisji etycznej, informacje o dorobku naukowym oraz Referencje liczące 178 pozycji. Bardzo ważną częścią dysertacji są oświadczenia współautorów, wskazujące na wiodącą rolę mgr inż. Aleksandry Majewskiej w powstanie publikacji. Należy podkreślić, że w dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotcka.moi.uj.edu.pl/zdm>

autorem, w trzeciej publikacji dzieli pierwsze autorstwo z dr Brodaczewską, czyli promotorem pomocniczym.

Na szczególne pokreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka była Kierownikiem projektu Preludium z Narodowego Centrum Nauki a część wyników w rozprawie jest właśnie wynikiem realizacji tego grantu. Ponadto, badania były finansowane z projektów kierowanych przez Panią prof. Kieda i dr Brodaczewską.

Rozprawa jest napisana w języku polskim, jedynie teksty publikacji są w języku angielskim. Błędy językowe (interpunkcyjne, literowe) są nieliczne (np. str. 12 – w Wykazie skrótów, „pekursorowe miRNA” zamiast prekursorowe miRNA; str. 14 – „funkcja PTEN istotnie różni w obu badanych modelach” zamiast różni się w obu badanych; str. 19 – „przejścia eptelialno-mezenchymalnego” zamiast epitelialno-mezenchymalnego; str. 34 – powinno być w modelu przewlekłej białaczki limfocytowej a nie „w modelu przewlekłej białaczki limfocytowa”; str. 34 – niedotlenienie zamiast „niedotlenie”, str. 37 – CRISPR/Cas9 a nie „CRIPSR/Cas9”). Te drobne nieścisłości nie wpływają na wysoką ocenę opracowania językowego pracy.

### Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska, choć nie jest napisana w klasyczny sposób, jest dobrze przemyślanym i opracowanym zestawieniem aktualnej wiedzy dotyczącej możliwości i problemów terapii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu mikrośrodowiska guza, głównie niedotlenienia oraz roli mikroRNA i czynnika supresorowego PTEN.

Przedstawione publikacje są dowodem tego, że mgr inż. Aleksandra Majewska, wraz ze współautorami, przeprowadziła dobrze zaplanowane doświadczenia a na podstawie ich wyników sprecyzowała wnioski, odpowiadające postawionym hipotezom badawczym. Co istotne, prace przeszły rygorystyczny proces recenzji, zostały zaakceptowane przez ekspertów z danej tematyki i zostały opublikowane w dobrych czasopismach – dwie prace w 2023 roku w *Biochemistry and Cell Biology* i *Pharmacological Reports*, a jedna praca w 2022 roku w czasopiśmie *Biomolecules*.

**Wykaz skrótów** jest w większości prawidłowo przygotowany. Zastanawia mnie, dlaczego nie ma nazw polskich niektórych skrótów, np. PIP2/PIP3? Zdaję sobie sprawę z trudności w przetłumaczeniu skrótów z języka angielskiego, ale niektóre zaproponowane przez Doktorantkę określenia nie wydają mi się najlepsze. Przykładem może być skrót PDCD4 – czy nie lepszym tłumaczeniem jest

Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii  
Zakład Biotechnologii  
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7  
PL 30-387 Kraków  
tel. +48 12 664 8412  
fax. +48 12 664 8918  
agnieszka.loboda@uj.edu.pl  
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

gen kodujący czynnik programowanej śmierci komórki 4 a nie gen programowanej śmierci komórki 4?

**Wstęp** został podzielony na 3 główne rozdziały, w którym prezentowane są po kolei zagadnienia dotyczące kluczowych aspektów badanych w przedstawionych do oceny publikacjach, tzn. 1. Mikrośrodowiska guza; 2. Czynnika PTEN, 3. MikroRNA. Wstęp zajmuje 19 stron, jest zilustrowany 4 czytelnymi rycinami, trafnie obrazującymi zawarte w tej części treści. Lektura tej części pracy wskazuje, że Doktorantka dobrze orientuje się w tematyce przedmiotu, ma wiedzę dotyczącą konsekwencji i problemów z unaczynieniem w guzie nowotworowym i implikacji dla terapii.

Wstęp dobrze wprowadza czytelnika do dalszych części rozprawy. Do tej części pracy mam jedynie dwie uwagi. Autorka przedstawia informacje na temat tzw. komórek EPC (ang. *endothelial progenitor cells*). Zabrakło mi krytycznej analizy publikacji dotyczących tej tematyki oraz przynajmniej wspomnienia o problemach z nazewnictwem/definicją/identyfikacją tych komórek. Zastanawia mnie również, dlaczego Doktorantka na stronie 28 używa nazw w języku angielskim np. vimentin a nie wimentyna;  $\beta$ -catenin/E-cadherin a nie  $\beta$ -katenina i E-kadheryna.

W klasycznej rozprawie, kolejną częścią byłby rozdział **Materiały i metody**. W ocenianej dysertacji, opis procedur/metod został umieszczony w każdej z prac, ale niestety nie przedstawiono dokładnie, które eksperymenty były przeprowadzone przez Doktorantkę. Zakres metod w ocenianych pracach jest szeroki i obejmuje zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo*. Można wnioskować, że mgr inż. Majewska, jako pierwszy autor, przeprowadziła większość doświadczeń, ale trudno stwierdzić jednoznacznie, że biegle posługuje się wszystkimi technikami wykorzystanymi w publikacjach. Metody te, to między innymi hodowla komórek nowotworowych w warunkach normoksji i hipoksji, izolacja RNA, analizy RT-PCR, barwienia immunofluorescencyjne, Western Blot i test ELISA, czy analizy cytometryczne. Wykonywano również testy funkcjonalne, m.in. test klonogeny czy test tworzenia tubul na matryzeli. W badaniach wykorzystywano także system CRISPR/Cas9 w celu wyciszenia ekspresji *Pten* w komórkach nowotworowych. Czy modyfikacje te wykonywała Doktorantka? Jaki był udział mgr inż. Majewskiej w analizach NGS? Zastanawiam się również, czy Doktorantka uczestniczyła w badaniach *in vivo*? Czy posiada zgodę na wykonywanie doświadczeń na zwierzętach? W załączonej zgodzie komisji etycznej nie widnieje jako osoba biorąca udział w tych doświadczeniach.



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii  
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biocika.mol.uj.edu.pl/zdm>



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 8918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotcka.mol.uj.edu.pl/zdm>

Niezależnie od powyższych pytań, zakładam, że Doktorantka uczestniczyła w większości analiz i na tej podstawie stwierdzam duże zaangażowanie w pracę laboratoryjną.

W dalszej części pracy Doktorantka sformułowała główną **hipotezę rozprawy** doktorskiej. Aby sprawdzić czy aktywność PTEN istotnie różni się w modelu raka nerki i czerniaka, co może modyfikować mikrośrodowisko guza i wpływać na odpowiedź na terapie przeciwnowotworowe zrealizowała trzy **cele badawcze**:

- 1) określiła wpływ niedotlenienia na poziom i aktywność PTEN oraz potencjał proangiogeny w testowanych modelach *in vitro*,
- 2) zbadała rolę PTEN w raku nerki i czerniaku, wykorzystując komórki z nokautem PTEN, a szczególnie ich wrażliwość na leczenie *in vitro* oraz wpływ na progresję guzów *in vivo*,
- 3) sprawdziła wpływ mutacji PTEN i niedotlenienia na modyfikację mikrośrodowiska guza poprzez regulację ekspresji miRNA w modelu raka nerki (*in vitro* i *in vivo*).

Przeprowadzone doświadczenia i ich wyniki opisane zostały w trzech kolejnych publikacjach. W pierwszej pracy, opublikowanej w 2023 roku w czasopiśmie *Biochemistry and Cell Biology* (Majewska, A., Brodaczewska K, Filipiak-Duliban A, Kieda C. *Comparative analysis of the effect of hypoxia in two different tumor cell models shows the differential involvement of PTEN control of proangiogenic pathways*), Doktorantka analizowała odpowiedź angiogenną oraz poziom czynnika PTEN w dwóch liniach komórek nowotworowych - czerniaku B16F10 oraz komórkach raka nerki Renca w warunkach niedotlenienia. Wykazała, że indukowany niedotlenieniem potencjał proangiogeny był silniejszy w komórkach Renca niż B16F10. Co ciekawe, nie obserwowała skutecznego działania antynowotworowego aktywatora PTEN - ITPP w raku nerki, pomimo wykazanego wcześniej takiego efektu w modelu czerniaka.

Po lekturze tej pracy nasunęły mi się następujące pytanie:

- jednym z czynników, którego poziom zwiększał się pod wpływem niedotlenienia w obu liniach komórkowych była osteopontyna. W Dyskusji pracy podkreślono angiogenną rolę tego białka, wynikającą z aktywacji ścieżek PI3K/AKT oraz ERK1/2. Osteopontyna może jednak działać również na inne procesy ważne dla nowotworzenia. Proszę Doktorantkę o krótkie rozwinięcie tego tematu podczas obrony pracy.

W drugiej publikacji, również opublikowanej w 2023 roku, Doktorantka wraz ze współautorami skupiła się na określeniu roli PTEN w oporności komórek czerniaka i raka nerki wykazując ich zróżnicowaną odpowiedź zgodnie z tytułem publikacji "*Pten knockout affects drug resistance differently in melanoma and kidney cancer.*" (Brodaczewska, K., Majewska A., Filipiak-Duliban A, Kieda C. Pharmacol Rep. 2023). Chociaż nie zaobserwowano zmian w proliferacji komórek *in vitro* ani *in vivo* obu typów nowotworów z mutacją *Pten*, to różna była ich wrażliwość na leczenie cisplatyną, odmienny wzór ekspresji p53 czy wydzielanie czynnika PAI-1. Autorki publikacji konkludują, że taka heterogenna odpowiedź komórek na utratę PTEN może być niezwykle istotna dla opracowania indywidualnych schematów leczenia pacjentów onkologicznych. Z ciekawości chciałam dopytać, czy cisplatyna jest standardowo stosowanym lekiem w terapii pacjentów z nowotworami nerki i czerniakiem?

Ostatnia praca (Majewska, A., Brodaczewska K, Filipiak-Duliban A, Kajdasz A, Kieda C. *miRNA Pattern in Hypoxic Microenvironment of Kidney Cancer-Role of PTEN*. Biomolecules, 2022) wiąże się tematycznie z poprzednimi, ale koncentruje się na zbadaniu wpływu hipoksji i nokautu *Pten* na poziom mikroRNA, małych, niekodujących cząsteczek RNA, niezwykle istotnych regulatorów ekspresji genów, w raku nerki. W tych eksperymentach wykorzystano nie tylko mysie komórki Renca, ale również ludzkie komórki różniące się statusem czynnika PTEN – linię z ekspresją PTEN - Caki-1 oraz linię ze zmutowanym PTEN - 786-O. Tak jak w poprzednich pracach, nokaut genu *Pten* w linii Renca uzyskano za pomocą systemu CRISPR/Cas9. Wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji wykonano globalną analizę ekspresji mikroRNA. Obserwowano m.in. zwiększoną ekspresję miR-210 w hipoksji a także deregulację miR-100 oraz miR-155 wynikającą z mutacji *Pten*.

W mojej ocenie wszystkie prace są ciekawe, zastosowano w nich szeroki wachlarz metod, w tym co istotne, przeprowadzono nie tylko analizy *in vitro* ale również badania *in vivo*. Wyniki poddano wnikliwej analizie statystycznej. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o streszczenie każdej z prac i wskazania głównych problemów badawczych. Końcowe **Podsumowanie** całej rozprawy jest lakoniczne i można odczuć niedosyt szerszego omówienia przeprowadzonych badań, wskazania ewentualnych problemów, narysowania dalszych perspektyw i planów badawczych. Oczywiście w każdej publikacji zamieszczono dyskusję wyników, jednak dodatkowe informacje w rozprawie, traktujące wszystkie trzy publikacje całościowo, byłyby cenną częścią wskazującą na globalną analizę badań.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii  
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 8412

fax. +48 12 664 8918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.moi.uj.edu.pl/zbm>

Po lekturze publikacji zastanawiają mnie następująca kwestia. Badania przeprowadzono głównie z wykorzystaniem mysich modeli nowotworów: raka nerki (Renca) i czerniaka (B16F10). Jedynie w ostatniej publikacji wykonano również analizy w ludzkich liniach nowotworowych. Proszę Doktorantkę o przedstawienie swojej opinii na pytanie, na ile dane uzyskane z mysich linii mają przełożenie na ludzkie nowotwory nerki i czerniaka?

## Podsumowanie

Stwierdzam, iż uzyskane przez Panią mgr inż. Aleksandrę Majewską wyniki poszerzają wiedzę biologii komórek nowotworowych oraz dają wskazówki do lepszego opracowania spersonalizowanych terapii czerniaka i raka nerki.

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

W mojej opinii, praca stanowi dowód na posiadaną przez Doktorantkę wiedzę teoretyczną i praktyczną znajomość technik metod biologii molekularnej niezbędnych do prowadzenia pracy badawczej. Pani mgr inż. Aleksandra Majewska wykonała szereg doświadczeń *in vitro* i *in vivo* a ich wyniki opublikowała w postaci trzech oryginalnych prac naukowych.

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

Potwierdzam, że 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 Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom rozprawy, fakt opublikowania wyników badań w dobrych, recenzowanych czasopismach i pierwsze autorstwa Doktorantki, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,



Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 8412

fax. +48 12 664 8918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioteka.mol.uj.edu.pl/zbm>