



Wrocław, 18 września 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Górskiej-Arcisz zatytułowanej
„FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 – znaczenie w luminalnym raku
piersi”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Górskiej-Arcisz, została przygotowana w Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej w Instytucie Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana dr hab. Rafała Sądeja, prof. GUMed. Przedmiotem badań było scharakteryzowanie roli FGFR2 w regulacji aktywności kompleksu p62/Keap1/Nrf-2 w luminalnym raku piersi i zmianie wrażliwości komórek nowotworowych na leki skierowane wobec ER. Tak więc, tematyka badawcza jest bardzo aktualna, w szczególności w świetle intensywnie prowadzonych prac nad zrozumieniem procesu nabywania oporności przez komórki rakowe na stosowane terapie, a realizacja pracy pod opieką doświadczonego promotora, specjalizującego się w badaniach roli FGFR2 we wzroście, progresji i oporności nowotworów piersi, zapewniła dostęp do wszelkich niezbędnych metod i prawidłowego zaplanowania prac eksperymentalnych.

Rozprawa doktorska mgr Górskiej-Arcisz jest napisana w języku polskim, liczy 133 strony, podzielona jest na siedem głównych rozdziałów, które stanowią: *Wstęp*, *Cel pracy*, opis zastosowanych materiałów i metod, prezentacja uzyskanych wyników, *Podsumowanie*, *Dyskusja* oraz spis cytowanej literatury (ponad 200 pozycji). Ponadto w pracy zawarto, wykaz zastosowanych symboli i skrótów, a także streszczenia w języku polskim i angielskim.

We *Wstępie* Doktorantka szczegółowo omówiła najważniejsze, dla przedstawionych w rozprawie badań, zagadnienia. Zawarła w nim wyczerpujące informacje na temat raka piersi, jego etiologii, klasyfikacji i aktualnych form leczenia. Przedstawiała znaczenie mikrośrodowiska guza w rozwoju nowotworów, a także przybliżyła rodzinę receptorów fibroblastycznych czynników wzrostu. W kolejnym podrozdziałach skupiła się na procesie

autofagii oraz opisała funkcje czynnika transkrypcyjnego Nrf-2, a także jego rolę w transformacji nowotworowej i nabywaniu oporności na stosowane terapie. Cały rozdział napisany jest kompetentnie, dobrze wprowadza w poszczególne aspekty rozprawy doktorskiej i świadczy o znajomości tematu przez Doktorantkę. Szkoda jedynie, że zawiera on niewielką ilość rysunków i schematów (trzy ryciny). Liczniejsze ilustracje zdecydowanie ułatwiłyby odbiór tej części pracy. Poprosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego informacje na temat receptorów FGF umieściła w rozdziale poświęconym mikrośrodkowisku guza, a także o przybliżenie procesu zmiany izoformy (ang. *isoform switching*) FGFR2 w procesie nowotworzenia i EMT.

Cel pracy został precyzyjnie określony, choć osobiście uważam, że określenie „regulacja współzależności” nie jest zbyt fortunne. Zadaniem Doktorantki było zweryfikowanie udziału FGFR2 w procesie autofagii, a następnie przybliżenie molekularnego mechanizmu jego działania w modelowych liniach luminalnego A raka piersi. W kolejnym kroku zaplanowano prace, które miały zbadać wpływ aktywacji FGFR2 i zależnej od niego autofagii na odpowiedź komórek raka piersi na leki skierowane wobec ER. Dalsze cele rozprawy obejmowały analizę wpływu sygnalizacji FGFR2 na kompleks Keap1/Nrf-2 oraz znaczenia aktywności Nrf-2 (w odpowiedzi na aktywację FGFR2) w kontekście działania leków antyestrogenowych w komórkach raka piersi. Dodatkowo w pracy zaplanowano analizę wartości prognostycznej poziomu ekspresji FGFR2 i Nrf-2 na podstawie materiału klinicznego, pochodzącego od pacjentek z luminalnym A rakiem piersi.

W rozdziałach *Materiały* i *Metody* szczegółowo opisano wykorzystane w pracy odczynniki, bufony, komercyjne zestawy, sprzęt laboratoryjny oraz zastosowane techniki z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki, mikroskopii fluorescencyjnej, a także analiz danych klinicznych. Rozdział ten pokazuje, że Doktorantka rzetelnie opanowała warsztat badawczy i swobodnie posługuje się zaawansowanymi metodami doświadczalnymi. Mam kilka pytań dotyczące tej części pracy. (i) Czy uzyskano stabilne linie komórek MCF2 i T47D zarówno nadprodukujące p62, jak i z wyciszoną ekspresją tego genu? Opis w rozdziale *Metody* nie jest do końca spójny z danymi przedstawionymi w rozdziale *Wyniki*. (ii) Znaczna część eksperymentów przeprowadzona była w obecności rekombinowanego białka FGF7. Czy podczas stymulacji komórek FGF7 w medium obecna była heparyna? Jeśli nie, to czy weryfikowano stabilność tego białka w pożywce? Ma to szczególnie istotne znaczenie przy eksperymentach trwających wiele dni (np. testy proliferacyjne). (iii) W jaki sposób weryfikowano istotność statystyczną uzyskanych wyników? Doktorantka podaje, że

stosowano test t-Studenta. Czy test ten był jednostronny/dwustronny, parowany/nieparowany? Czy dla wszystkich eksperymentów stosowano ten sam rodzaj testu?

Rozdział poświęcony wynikom jest rzetelnie zredagowany i zawiera szereg wartościowych danych. Doktorantka wykazała, że aktywacja receptora FGFR2 powoduje indukcję autofagii w komórkach raka piersi. Co ciekawe proces ten chroni komórki raka piersi przed działaniem leków antyestrogenowych (tamoksifen, fulwestrant), a zastosowanie inhibitora autofagii przywraca wrażliwość komórek na te leki. Mgr Górska-Arcisz wykazała, że aktywacja FGFR2 prowadzi do aktywacji białka p62, co promuje dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2 i w jej następstwie translokację czynnika transkrypcyjnego Nrf-2 do jądra komórkowego. Uzyskane dane sugerują, że aktywność Nrf-2 przyczynia się do ochrony komórek przed działaniem leków skierowanych wobec ER, podczas gdy wyciszenie jego aktywatora – białka p62 – przywraca cytotoksyczność tych leków. W ostatniej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka skupiła się na analizie czasu wolnego od nawrotu choroby w kontekście ekspresji genu *NFE2L2* (kodującego białko Nrf-2) oraz genu *FGFR2* na podstawie danych klinicznych pochodzących z bazy danych METABRIC. Zaobserwowała, że analiza poziomu ekspresji genu *NFE2L2* umożliwia klasyfikację pacjentek o wysokiej ekspresji FGFR2 na podtypy różniące się rokowaniami. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę oceniam wysoko i mam nadzieję, że będą miały swój udział w opracowaniu lepszego systemu klasyfikacji podtypów luminalnych raków piersi, a także skuteczniejszych strategii terapeutycznych.

Rozdział *Dyskusja* jest krytycznym porównaniem uzyskanych przez Doktorantkę wyników, a także wcześniejszych prac przeprowadzonych w zespole, z najnowszymi danymi literaturowymi. Doktorantka przedstawia swoje rezultaty w szerszej perspektywie i proponuje dalsze prace badawcze, które mają szansę przyczynić się do opracowania nowych terapii skojarzonych. Ta część pracy od strony merytorycznej jest bardzo dobrze opracowana, jednak brak schematów i rysunków, a także zbyt długie akapity utrudniają jej odbiór. Niemniej jednak końcowe wnioski sformułowane są jasno i znajdują potwierdzenie w zaprezentowanych wynikach doświadczeń.

Nasuwa mi się kilka zagadnień, o omówienie których prosiłabym Doktorantkę w trakcie publicznej rozprawy:

1. Proszę o uzasadnienie stosowania przeciwciał anti-beta-aktyna jako kontrolę ładowania w eksperymentach *western blot*. W proces autofagii zaangażowane są aktyny, czy w związku z tym ich poziom w trakcie indukcji autofagii na pewno nie ulega zmianie?

2. Stosowane w pracy przeciwciało anti-FGFR2 uniemożliwia rozróżnienie poszczególnych izoform receptora. Czy w pracy zweryfikowano (np. poprzez RT-PCR) poziom ekspresji FGFR2b i FGFR2c w badanych komórkach? Dlaczego w pracy stosowano ligand, który oddziałuje jedynie z FGFR2b, a nie wybrano białka FGF, które aktywowałoby obie izoformy?

3. Proszę o zweryfikowanie statystyki dla ufosforylowanego białka ULK1 (Rycina 6A). Pokazany przykładowy WB nie pasuje do przedstawionego wykresu (intensywność prążka po 30 i 60 min jest z pewnością niższa niż dla kontroli, tak więc słupek błędu obrazujący SD na wykresie przy tych czasach powinien być większy). Czy dla danych przedstawionych na Rycinie 6 przeprowadzono eksperyment kontrolny, w którym komórki traktowano FGF7 w obecności inhibitora FGFR?

4. Wydaje się, że dla wykresów przedstawionych na Rycinach 9 i 11 nie przeprowadzono pełnej analizy statystycznej (np. MG132 *versus* MG132+FGF7; FGF7 *versus* CQ)? Proszę o weryfikację.

5. Czy Doktorantka ma hipotezę w jaki sposób dochodzi do FGFR2-zależnej aktywacji p62? Czy w eksperymentach przedstawionych na Rycinie 12 zastosowano jako kontrolę negatywną stymulację FGF7 w obecności inhibitora FGFR?

6. Analizy kompleksu Keap1/Nrf-2 metodą WB przeprowadzane były po 24, 48 i 72 godzinach, podczas gdy eksperymenty PLA po 60 minutach? Proszę o wyjaśnienie tej różnicy?

7. Proszę o doprecyzowanie w jaki sposób analizowano eksperymenty PLA (Rycina 16).

8. Czy eksperyment oparty o metodę ELISA rzeczywiście mówi o aktywności Nrf-2 (Rycina 18)? Czy wynik uzyskany w teście nie powinien być dzielony przez całkowity poziom białka, aby wykluczyć jedynie zmiany w poziomie ekspresji?

9. Dlaczego wysoka ekspresja FGFR2 była istotnie związana z dłuższym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby u chorych postmenopauzalnych, skoro aktywacja FGFR2 obniża wrażliwość komórek raka piersi na leki skierowane wobec ER?

10. Doktorantka proponuje zastosowanie w przyszłości terapii skojarzonej, łączącej inhibitory FGFR i Nrf-2. Czy do uwrażliwienia komórek na leki skierowane wobec ER nie wystarczyłyby tylko inhibitory Nrf-2?

Praca jest napisana starannie. Autorka nie ustrzegła się jednak kilku błędów interpunkcyjnych, typograficznych i stylistycznych. W nazwach angielskich i skrótach (w tym związków chemicznych) brak jest konsekwencji w stosowaniu małych i wielkich liter, czasami brakuje też polskiego rozwinięcia (np. PLA czy TEMED), w podpisach osi na wykresach występują różne wielkości czcionek, nie wszystkie rysunki są spójne pod względem graficznym,

a na końcach linii pojawiają się pojedyncze litery. W pracy znalazło się kilka niefortunnych sformułowań (np. „geny z nim (FGFR2) współwystępujące”, „zależność/współzależność FGFR2/Nrf-2”, „odnotowano lekki wzrost” podczas gdy obserwowany efekt jest znaczący, „dobra wartość rokownicza”). W cytowaniach pojawia się symbol „&” zamiast polskiego „i”. Pragnę jednak podkreślić, że są to nieznaczące uchybienia o charakterze edytorskim, niemające wpływu na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej Moniki Górskiej-Arcisz zatytułowanej „FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 – znaczenie w luminalnym raku piersi” jest wysoce pozytywna. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki uważam za niezwykle oryginalne i wartościowe. Wnoszą one istotny wkład w badania nad rolą receptorów FGFR w nowotworach piersi, otwierając nowe możliwości terapeutyczne. Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2021 r. poz. 478 ze zm.) stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Moniki Górskiej-Arcisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Matylda Zakrzewska