



Gliwice, 30 sierpnia 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pani Małgorzaty Durbas pt. „Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za śmierć komórkową indukowaną przez przeciwciało monoklonalne 14G2a wiążące gangliozyd GD2 na ludzkich komórkach neuroblastoma”.

Rozprawa powstała w oparciu o trzy artykuły monotematyczne, które ukazały się w druku w latach 2015-2016. Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch artykułach (nr I i III) opublikowanych w International Journal of Oncology (IF około 3,0), przy czym w artykule nr I, pierwszy i drugi autor deklarują równy udział w powstaniu pracy. Artykuł nr II, w którym doktorantka jest drugim autorem, ukazał się w Acta Biochimica Polonica (IF = 1,2). Publikacje te zostały przedstawione jako załączniki i poprzedzone zostały streszczeniem rozprawy w języku polskim i angielskim, obszernym wprowadzeniem, omówieniem wyników uzyskanych przez Doktorantkę w każdej z prac oraz wnioskami. Załącznik do rozprawy stanowią również oświadczenia doktorantki oraz większości współautorów publikacji szczegółowo opisujące ich udział w powstaniu każdej z prac. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Rozdział 1, paragraf 5.3), wymagane są oświadczenia wszystkich współautorów, tymczasem nie załączono kilku oświadczeń autorów publikacji nr II.

We wprowadzeniu Doktorantka omówiła zagadnienia ściśle związane z tematem pracy, poczynając od charakterystyki nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) i immunoterapii, której celem jest gangliozyd GD2, poprzez omówienie szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR oraz swoistego profilu ekspresji genów w neuroblastoma, kończąc na przedstawieniu PHLDA1 i aurora A, tytułowych białek publikacji nr III. Ta część dobrze wprowadza w tematykę badań

**CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE. ODDZIAŁ W GLIWICACH**

44-101 GLIWICE, UL. WYBRZEŻE ARMII KRAJOWEJ 15

Centrala Tel.: +48 32 278 86 66

Dyrekcja Tel.: +48 32 278 96 18

E-mail: [onkologia@io.gliwice.pl](mailto:onkologia@io.gliwice.pl)

NIP: 5250008057

Centrala Fax: +48 32 231 35 12

Dyrekcja Fax: +48 32 230 78 07

Url: [www.io.gliwice.pl](http://www.io.gliwice.pl)

REGON: 000288366

wykonanych przez Doktorantkę, chociaż mogłoby tutaj znaleźć się bardziej szczegółowe omówienie dotychczasowego stanu wiedzy na temat wpływu tytułowych przeciwciał 14G2a na komórki posiadające gangliozyd GD2 na powierzchni. Szczególnie brakuje mi informacji jak przeciwciała wpływają na cykl komórkowy badanych komórek, jako że zmiany fosforylacji niektórych badanych w pracy białek mogą być zależne od fazy cyklu (np. uważa się kinaza aurora A ma największą aktywność w fazie G2 i M). We wprowadzeniu został również sprecyzowany cel pracy oraz uzasadnienie wyboru linii komórkowej do badań. Autorka określa tutaj co stanowiło podstawę do podjęcia badań oraz, nawiązując do opublikowanej części eksperymentalnej, opisuje w skrócie jej istotne elementy.

Omówienie opublikowanych prac doświadczalnych poprzedzone jest krótkim wstępem, w którym również przedstawiono ogólny cel i założenia pracy. Rozprawa doktorska została zrealizowana w oparciu o wcześniejszą obserwację własną zespołu (praca Kowalczyk i inni, 2009), że przeciwciała 14G2a wiążące gangliozyd GD2 na komórkach neuroblastoma linii IMR-32 indukują apoptozę w sposób częściowo zależny od aktywacji kaspaz. Omawiając wyniki prac eksperymentalnych będących podstawą rozprawy doktorskiej, Autorka przedstawiła najważniejsze wyniki własnych badań oraz dyskusję w odniesieniu do najnowszych pozycji literaturowych. Brakuje mi w tym rozdziale odniesienia w tekście do konkretnych rycin w omawianych publikacjach. Natomiast na uwagę zasługuje zaproponowana zbiorcza analiza mechanizmów działania tytułowego przeciwciała na komórki neuroblastoma IMR-32 w postaci schematu.

Punktem wyjścia do badań przedstawionych w publikacji nr I była analiza zmian poziomu fosforylacji kinaz białkowych wykonana za pomocą macierzy białkowych. Wykazała ona, że w trakcie inkubacji komórek IMR-32 z przeciwciałami 14G2a wiążącymi gangliozyd GD2 zmienia się w sposób znaczący fosforylacja białek związanych ze ścieżką sygnałową AKT/mTOR (Tabela I). Zadaniem Doktorantki było wykonanie szczegółowej analizy tej ścieżki sygnałowej, głównie metodą western blot, w komórkach kilku linii neuroblastoma traktowanych przeciwciałami w przedziale czasowym od 2h do 48h. Uzyskane wyniki potwierdziły znaczny spadek dwóch aktywujących fosforylacji AKT w linii IMR-32, natomiast w drugiej linii neuroblastoma, CHP-134, zmiany nie były tak spektakularne. Doktorantka podejmując próbę powiązania obserwowanych zmian w szlaki sygnałowania sugeruje, że defosforylacja AKT na serynie 473 może być konsekwencją zahamowania aktywności kinazy PDK1 (ponieważ istnieją dwa białka o takim akronimie, przydatny okazał się tutaj wykaz skrótów zamieszczony na początku rozprawy). Pomijając fakt, że PDK1 jest odpowiedzialna za fosforylację Thr308 (prowadząc do częściowej aktywacji AKT), a fosforylacja Ser473 (prowadząca do pełnej aktywacji AKT) zachodzi głównie za pośrednictwem mTORC2, przedstawione wyniki nie potwierdzają, ale też nie wykluczają takiej możliwości. Doktorantka dokonała tutaj odmiennej interpretacji wyników od przedstawionej w publikacji nr I.

Badając kinetykę zmian fosforylacji innych białek ścieżki sygnałowej AKT/mTOR, Doktorantka potwierdziła wyniki z macierzy białkowych, że inkubacja komórek z przeciwciałami 14G2a prowadzi do znacznego spadku fosforylacji aktywującej białko mTOR oraz jego substratów kinazy p70 S6 i białka 4E-BP1 wiążącego się z eukariotycznym czynnikiem inicjującym translację eIF4E. Zmiany poziomu fosforylacji, czy też lokalizacji wewnątrzkomórkowej, pozostałych badanych przez Doktorantkę białek (p27, PTEN, GSK3 $\beta$ , PDK1, APMK) nie są tak spektakularne i wyniki są często nieistotne statystycznie. Tym niemniej, uzyskane wyniki sugerują, że inaktywacja szlaku AKT/mTOR może być przyczyną obniżenia potencjału proliferacyjnego komórek traktowanych przeciwciałami wiążącymi gangliozyd GD2. Jak słusznie Doktorantka zauważyła, obserwowane różnice kinetyki zmian fosforylacji poszczególnych białek badanej ścieżki sygnałowej mogą wynikać z faktu, że analizowany szlak to również wiele innych niebadanych tutaj białek, które w różny sposób i po różnym czasie mogą modulować aktywność swoich substratów oraz same mogą odpowiadać niezależnie na traktowanie komórek przeciwciałami 14G2a. Ważną obserwacją poczynioną w pracy jest wykazanie, że zahamowanie szlaku PI3K/AKT/mTOR może mieć istotny potencjał terapeutyczny. Drobnocząsteczkowy podwójny inhibitor kinaz PI3K i mTOR powoduje wzmocnienie efektu cytotoksycznego przeciwciał 14G2a na komórki neuroblastoma (głównie linii CHP-134).

W publikacji nr II głównym celem była globalna analiza ekspresji genów w komórkach neuroblastoma IMR-32 w odpowiedzi na traktowanie doksorubicyną bądź przeciwciałami 14G2a. Analizy te wykazały między innymi znaczny wzrost ekspresji genu *PHLDA1* po 24 godzinach traktowania przeciwciałami. Zadaniem Doktorantki w tej pracy była głównie weryfikacja wyników z mikromacierzy za pomocą RT-qPCR. Doktorantka przedstawiła wyniki wykonanych przez siebie eksperymentów i przeprowadziła ich dyskusję, co w oderwaniu od całości pracy było dosyć trudne (pojawiają się nieco trywialne wnioski). Zbadanie znaczenia białka *PHLDA1* w odpowiedzi komórek IMR-32 na traktowanie przeciwciałami anti-GD2 jest tematem publikacji nr III, w której udział Doktorantki jest największy. Na podstawie wykonanych badań Autorka stawia hipotezę, że istnieje odwrotna korelacja między poziomem ekspresji *PHLDA1* i kinazy aurora A w komórkach neuroblastoma (choć wydaje się, że linia LA-N-5 nie wpisuje się w tą zależność). Negatywna regulacja między tymi białkami obserwowana jest również w odpowiedzi na inkubację z przeciwciałami 14G2a w komórkach IMR-32. Dlatego też, w celu zbadania możliwych zależności pomiędzy tymi białkami, Doktorantka uzyskała komórki ze stabilnie wyciszonym genem *PHLDA1* (za pomocą shRNA z użyciem systemu lentiwirusowego), bądź z przejściowo wyciszonym genem *AURKA* (nie udało się wyprowadzić stabilnej linii z wyciszeniem) i wykonała szereg testów i oznaczeń na tych komórkach. Uzyskane wyniki przedstawiła na schemacie podsumowującym efekty wyciszenia genu *PHLDA1* oraz zaproponowała mechanizm działania przeciwciał monoklonalnych 14G2a na komórki IMR-32, który uwzględnia zahamowanie ścieżki sygnałowej PI3K/AKT/mTOR oraz udział białek *PHLDA1* i aurora A. Wiele kwestii pozostaje wciąż nierozwiązanych i wymaga dalszych badań, na które

Doktorantka uzyskała już fundusze (m.in. grant PRELUDIUM na zbadanie udziału PHLDA1 w procesie autofagii, czy dotacja celowa MNiSW dla Młodych Naukowców na zbadanie roli PHLDA1 w hamowaniu nowotworzenia przez kinazę AKT).

Na podstawie uzyskanych wyników, głównie tych zamieszczonych w publikacjach nr I i III, w których jest pierwszym autorem, Doktorantka sformułowała szereg wniosków. Niektóre z nich (zawarte w punktach 2, 3, 5, 7) wydają się zbyt daleko idące – by je definitywnie potwierdzić należałoby wykonać dodatkowe eksperymenty (obserwowane zmiany poziomu ekspresji, na podstawie których wnioski zostały sformułowane, są słabo widoczne, mimo, że wpisują się w ogólnie przyjęty schemat przekazywania sygnału na drodze PI3K/AKT/mTOR).

Rozprawa doktorska jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim. Jest napisana poprawnym językiem, niemal bez błędów literowych, czy stylistycznych. Doktorantka przygotowała rozprawę w sposób ułatwiający ocenę jej indywidualnego wkładu w powstanie opublikowanych artykułów będących podstawą pracy doktorskiej. Nie tylko prowadziła prace eksperymentalne, lecz brała również udział zarówno w przygotowaniu manuskryptów, jak i planowaniu eksperymentów.

#### Podsumowanie.

Rozprawa doktorska Pani Małgorzaty Durbas obejmuje badania skomplikowanych zmian zachodzących w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w komórkach neuroblastoma pod wpływem wiązania przeciwciał do gangliozydu GD2. W mojej opinii praca stanowi znaczące osiągnięcie naukowe, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tak więc spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 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.). Wnoszę więc o dopuszczenie Pani Małgorzaty Durbas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiesława Widłak

dr hab. Wiesława Widłak,  
profesor nadzwyczajny Centrum Onkologii -  
Instytutu, Oddział w Gliwicach