

Prof. dr hab. Jacek Bigda
Zakład Biologii Komórki
Katedra Biotechnologii Medycznej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Wyroby:
pt. **„ADAM17 jako potencjalny cel terapii nowotworowych – jego rola we
wzroście i przerzutowaniu mysiego czerniaka oraz analiza wpływu tego
białka na komórki naczyń limfatycznych”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Berety

Enzym ADAM17/TACE jest błonową metaloproteinazą dysintegrynową, zaangażowaną w złuszczenie czynników wzrostu, cytokin, ich receptorów, a także białek adhezyjnych z powierzchni komórek, co zmienia ich zdolność do reagowania na cytokiny, wpływa na aktywność cytokin czy oddziaływania międzykomórkowe. Może również oddziaływać z niektórymi integrzynami wpływając na procesy adhezji i migracji komórkowej. Nieprawidłowe działanie ADAM17 może przyczyniać się do progresji nowotworów oraz nasileniu przewlekłych stanów zapalnych występujących m. in. w przebiegu chorób autoimmunizacyjnych. Dlatego wspomniana molekula stanowi już od kilkunastu lat intensywnie badany potencjalny cel terapeutyczny.

Przedstawiona do oceny praca stawiała sobie za cel określenie roli białka ADAM17 w rozwoju czerniaka, w szczególności jego wzroście i przerzutowaniu oraz ocenę wpływu ADAM17 na modelowe komórki naczyń limfatycznych i ich potencjał limfangiogenetyczny. Przedstawiony główny cel podjętych badań był ambitny, dobrze uzasadniony. Autorka przedstawiła również oryginalny sposób weryfikacji przyjętych hipotez z użyciem nowoczesnych modeli badawczych. Wybór czerniaka jako modelu nowotworu miał dodatkowe uzasadnienie wynikające z rosnącej zapadalności na tę chorobę oraz konieczności poszukiwania efektywniejszych terapii u chorych na czerniaka, późno diagnozowanych, zwykle z już rozwiniętymi przerzutami. Pomimo ostatnich sukcesów immunoterapii tego nowotworu wciąż konieczne jest uzyskanie wyższej skuteczności jego leczenia.

W przedłożonej rozprawie Autorka osiągnęła postawione cele badawcze. Opisała wpływ wyciszenia genu ADAM17 na profil białkowy komórek naczyń limfatycznych, powodujący również zahamowanie migracji komórek LEC oraz zdolność do limfangiogenezy w warunkach hodowli in vitro. Wykazała również, iż obniżenie poziomu ADAM 17 na komórkach modelowego czerniaka B16 ogranicza ich możliwości wzrostu klonalnego, migracji i melanogenezy. Wykorzystując model danio przegowanego stwierdziła również, że niski poziom TACE może ograniczać migrację komórek B16 oraz ich zdolność do stymulacji angiogenezy. Z kolei wyniki doświadczeń przeprowadzonych na modelu mysim z zastosowaniem komórek czerniaka B16 o obniżonym ADAM17 oraz przeciwciał interferujących z funkcją ADAM17 wykazały częściowe zahamowanie wzrostu nowotworów zaszczepionych myszom, zahamowanie kolonizacji płuc oraz ograniczenia angiogenezy stymulowanej nowotworem.

Dokumentacja pracy zawarta jest na 179 stronach maszynopisu w klasycznym układzie: wyodrębniony spis skrótów, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w j. polskim i angielskim oraz spis aktualnych i adekwatnie dobranych pozycji bibliograficznych. Dodatkowo w pracy ujęto suplement ilustrujący tabelarycznie bądź graficznie niektóre z uzyskanych wyników.

Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a język zrozumiały, profesjonalny, na szczęście rzadko żargonowy np. nieco boli „blok do ograniczenia” czy „przeciwciałek”. Pod względem edytorskim praca jest na wysokim poziomie, odznacza się starannością i dbałością o estetykę. Napotkałem jedynie nieco błędów interpunkcyjnych, które na szczęście nie utrudniają zrozumienia tekstu.

Wstęp rozprawy dokumentuje głęboką znajomość przedmiotu badań. Doktorantka zawarła w nim niezbędny opis budowy i funkcji proteazy ADAM17, jej substratów, znaczenia biologicznego oraz aktywności w procesach zapalnych i znaczeniu dla progresji nowotworów. Następnie zarysowała wybrane aspekty biologii nowotworów istotne w realizowanym projekcie badawczym tj. drogi przerzutowania, znaczenie angiogenezy i limfangiogenezy, a także najistotniejsze fakty związane rozwojem czerniaka i potencjalnym zaangażowaniem ADAM17 w tym procesie. Przedstawiła również krótki opis modeli zwierzęcych zastosowanych w rozprawie tj.

myszy oraz danio pręgowanego. Sposób napisania tej części pracy świadczy o znaczącej wiedzy w obszarze podejmowanych badań, ale także dużej umiejętności selekcji najistotniejszych informacji.

Opis materiałów i metod jest szczegółowy i wyczerpujący, pozwalający na ich niezależne powtórzenie. Zestaw zastosowanych metod jest bardzo bogaty, nowoczesny i zawiera techniki biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii i onkologii doświadczalnej. Opis wachlarza użytych w pracy z sukcesem metod ilustruje dużą biegłość metodyczną Doktorantki wykorzystującej z powodzeniem możliwości dostępne w doskonałym laboratorium i środowisku badawczym, w tym w trakcie pobytu we współpracującym ośrodku.

Wyniki analiz są bardzo dobrze i przejrzysto opisane oraz szczegółowo zilustrowane. W toku lektury nie miałem wątpliwości interpretacyjnych w odniesieniu do omawianych rezultatów pracy.

Zawarta na kolejnych stronach pracy dyskusja odnosi się początkowo do uzasadnienia podjęcia badań, w szczególności zastosowanych modeli komórkowych oraz zastosowanego sposobu wyciszenia ekspresji genu. Następnie Autorka odnosi się do wyników dokumentujących wpływ ADAM17 na wzrost i przerzutowanie w warunkach *in vitro* i *in vivo*, podejmując próbę wskazania potencjalnych mechanizmów/czynników molekularnych leżących u podłoża obserwowanych zjawisk. W dalszej części przeprowadza podobny dyskurs w odniesieniu do modulacji procesów angiogenezy i limfangiogenezy. W końcowej części dyskusji opisuje wyniki i perspektywy zastosowania przeciwciał hamujących aktywność ADAM17 w terapii przeciwnowotworowej.

Autorka prowadzi dyskusję z ostrożnością, podkreślając zarówno wartość już uzyskanych wyników, jak i możliwości ich poprawy. Sposób napisania tego rozdziału potwierdza wiedzę Doktorantki i wskazuje na umiejętność krytycznego, dojrzałego myślenia.

Zanotowałem nieliczne, niewielkie uchybienia czy nieścisłości:


- 1/ na stronie 19 w pierwszym zdaniu rozdziału 2 określono nowotwory jako chorobę, raczej określałbym nowotwory jako grupę chorób;
- 2/ na stronie 35 w opisie linii MSI – nieprecyzyjne sformułowanie „komórki śródbłonna trzustki”, raczej komórki śródbłonna naczyń (jakich naczyń?) trzustki;

- 3/ na stronie 41 w opisie transdukcji należałoby wskazać dokładniejszy opis konstruktów ze wskazaniem elementów konstruktów zapewniających oporność na antybiotyki selekcyjny;
 - 4/ w doświadczeniach opisanych na stronie 77/78 analizujących potencjalny udział HB-EGF w regulacji ruchliwości komórek LEC warto byłoby zastosować p-ciała neutralizujące ten czynnik wzrostowy. W ten sposób Doktorantka mogła uzyskać potwierdzenie udziału HB-EGF w tym procesie;
 - 5/ zdjęcia na Rysunku 21C i D są nieco za małe, by z pewnością zweryfikować załączony opis;
 - 6/ na stronie 107 w pierwszym zdaniu podrozdziału 14 niezręczne sformułowanie „Badania nowotworowe”;
 - 7/ na stronie 108 i późniejszych brakuje rozwinięcia skrótu SIV;
 - 8/ na stronie 125 na samej górze – nie odmieniałbym przez polskie przypadki łacińskiego/angielskiego słowa „melanoma”, a jeśli już odmieniać to polski odpowiednik:)
 - 9/ na stronie 129 komórki THP-1 są określone jako prawidłowe, jednak są uzyskane od chorego na białaczkę;
 - 10/ na stronie 147 pierwsze zdanie trzeciego akapitu ma bardzo głęboko ukryte znaczenie, którego nie udało mi się odnaleźć;
 - 11/na deser – tytułu nie zaczynałbym od skrótu a jednak wskazania w tym konkretnym wypadku rzeczownika np. Cząsteczka, Molekuła czy Metaloproteinaza, czy Enzym – w tym ostatnim wypadku rodzaj męski zastosowany po myślniku byłby poprawny, w pozostałych nie, a wobec skrótu ADAM17 niezrozumiały.
- Powyższa lista nie wpływa na moją ogólną, pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy. Jestem przekonany, że opisane przez Doktorantkę obserwacje przeprowadzone na właściwie dobranych modelach komórkowych i zwierzęcych oraz wykonane już analizy molekularne, doprowadzą w nieodległej przyszłości do precyzyjnego molekularnego opisu obserwowanych zjawisk i szczegółowej identyfikacji związków przyczynowo-skutkowych.

W podsumowaniu: Doktorantka przedstawiła znaczące wyniki noszące znamiona oryginalności naukowej, udokumentowała również uzyskanie wybitnych umiejętności metodycznych oraz prowadzenia samodzielnej pracy badawczej,

również w środowisku międzynarodowym. Wykazała dużą biegłość w interpretacji wyników, umiejętność dyskusji uzyskanych wyników z danymi literaturowymi i prawidłowego wnioskowania. W związku z powyższym przedstawiam opinię, że rozprawa odpowiada warunkom określonym w stosownych zapisach ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie mgr Barbary Wyroby do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje ponadto wyróżnienie jego rozprawy w uznaniu jej oryginalności, nakładu poniesionej pracy, zaawansowaniu metodycznemu, a także sposobowi prezentacji zrealizowanego projektu w przedłożonej rozprawie.

Gdańsk, dnia 11 października 2018 roku


prof. dr hab. Jacek Bigda