

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **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**”

Obiektem pracy była błonowa metaloproteaza ADAM17, białko mające charakter „szedazy” (ang. *shedase*), którego aktywność moduluje oddziaływania międzykomórkowe i (poprzez swoje substraty) wpływa na szereg ścieżek sygnałowych regulujących proliferację, migrację, angiogenezę czy odpowiedź immunologiczną. Nie jest więc zaskakujące, że aktywność tego białka ma istotne znaczenie dla progresji choroby nowotworowej. Z tego powodu należy docenić wagę podjętego przez Doktorantkę tematu dotyczącego roli białka ADAM17 w procesach kluczowych w rozwoju nowotworu. Oryginalny projekt badawczy będący przedmiotem rozprawy doktorskiej miał więc już na wstępie potencjalnie dużą wartość, nie tylko naukową ale do pewnego stopnia również aplikacyjną.

Rozprawa doktorska ma charakter zwartej pracy o strukturze typowej dla tego typu prac. Praca liczy 179 numerowanych stron, zawiera 33 ryciny (w tym 4 w suplemencie), 10 tabeli (w tym 3 w suplemencie), a jej bibliografia odnosi się do 249 pozycji literaturowych. Część wyników zawartych w rozprawie doktorskiej została wcześniej opublikowana w formie oryginalnej pracy naukowej: Mężyk-Kopeć R, Wyroba B, Stalińska K, Próchnicki T, Wiatrowska K, Kilarski WW, Swartz MA, Bereta J. ADAM17 Promotes Motility, Invasion, and Sprouting of Lymphatic Endothelial Cells. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132661.

W rozdziale **Wstęp Teoretyczny** Doktoranta zwięźle przedstawiła podstawowe informacje na tematy mające bezpośredni związek z przedmiotem pracy. Przedstawiona tematyka została zilustrowana tabelą i dwoma rycinami. Wstęp, podobnie jak cała praca, jest napisany poprawnym językiem i (kolokwialnie rzecz ujmując) „dobrze się czyta”. Do bardzo nielicznych błędów należy sformułowanie „do średnicy ok 1-2 mm³” (str. 22).

Po wstępie znajduje się **Cel Pracy**, w którym Doktorantka syntetycznie uzasadnia podjęcie problemu badawczego i jasno określa główne cele badania.

Ważnym elementem pracy jest rozdział **Materiały i Metody**. Mając na uwadze liczne metody badawcze i modele doświadczalne wykorzystane w pracy pewnym wyzwaniem było taka organizacja tego rozdziału, aby zachować zarówno rozsądną objętość jak i wystarczający stopień szczegółowości. W większości przypadków ten cel został osiągnięty, również dzięki wielokrotnemu odesłaniu do protokołów zalecanych przez producentów. Szkoda jednak, że dla uniknięcia ew. wątpliwości Doktorantka nie wykazała w pracy numerów katalogowych

używanych odczynników. Z drobnych uchybień dostrzeżonych w tej części pracy to określenie linii komórkowej MCF-7 jako pochodząca z nabłonka płuc (str. 35) czy określenie procedury zwiększającej przepuszczalność błony komórkowej jako „permabilizacji” (jeśli już posługujemy się slangiem laboratoryjnym to byłaby to „permeabilizacja”; str. 59). Kilka pytań budzi natomiast kwestia analizy statystycznej przedstawiona w sekcji 42.

- 1) Co oznacza termin „nieparametryczny test t-Studenta” (str. 62)?
- 2) Eksperymenty przeprowadzane były w kilku powtórzeniach biologicznych każdy z kilkoma powtórzeniami technicznymi. Jakie wartości były przedmiotem testowania statystycznego? Czy wszystkie pomiary były traktowane jednakowo (tj. wszystkie powtórzenia techniczne wszystkich powtórzeń biologicznych), czy też porównywane były wartości średnie z powtórzeń technicznych dla odrębnych powtórzeń biologicznych (oba podejścia w inny sposób wpływają na końcowy wynik testu)?
- 3) Co decydowało o arbitralnym wyborze progów istotności statystycznej w różnych typach doświadczeń (0,002, 0,01, 0,02 i 0,05)? Jeśli w ten sposób chciano zilustrować rzeczywistą wartość p konkretnego testu, to przyjętym rozwiązaniem jest np. oznaczanie różnego poziomu wartości p różną liczbą gwiazdek.

Rozdział **Wyniki** składa się dwu odrębnych części.

W części I wyników Doktorantka analizuje w eksperymentach *in vitro* wpływ białka ADAM17 na komórki śródbłonka naczyń limfatycznych i proces limfangiogenezy. Modelem badawczym są komórki LEC z obniżonym poziomem ekspresji białka ADAM17. W tej części pracy Doktoranta uzyskała następujące wyniki:

- otrzymała i scharakteryzowała oryginalny model badawczy;
- scharakteryzowała wpływ wyciszenia białka ADAM17 na profil białkowy komórek LEC i zidentyfikowała szereg nowych potencjalnych substratów tego białka takich jak emmpryna-1, kadheryna 13, integryna α V, BIG-H3 i lipokaina-2 (mając na uwadze techniczne ograniczenie wykorzystanego testu multipleksowego, o których wspomina sama Doktorantka szkoda, że nie wszystkie te potencjalne substraty zostały zweryfikowane niezależną metodą);
- stwierdziła brak efektu wyciszenia ADAM17 na proliferację i żywotność komórek LEC;
- wykazała, że wyciszenie ADAM17 osłabia ruchliwość i zdolność migracji komórek LEC w mechanizmie zależnym od receptorów EGFR (być może z udziałem białka HG-EGF);
- wykazała, że wyciszenie ADAM17 osłabia zdolność do zależnego od VEGFC „pseudokapilaryzacji” sfer tworzonych przez komórki LEC;

- wykazała, że wyciszenie ADAM17 zwiększa adhezję komórek LEC do różnego typu podłoży, oraz zwiększa poziom łańcuchów α integryn na powierzchni tych komórek;
- wykazała, że wyciszenie ADAM17 zwiększa poziom ekspresji TGF β 2, co może się przekładać na podwyższony poziom białka BIG-H3 w tych komórkach, również zwiększając ich zdolność do adhezji;
- wykazała, że wyciszenie ADAM17 osłabia oddziaływania LEC z komórkami trzech testowanych linii nowotworowych.

Uzyskana wyniki w przekonujący sposób wskazują na udział białka ADAM17 w regulacji ruchliwości komórek śródbłonna naczyń limfatycznych i zdolności do limfangiogenezy, oraz sugerują udział w tym procesie kilku mechanizmów molekularnych takich jak ścieżka zależna od EGFR.

W części 2 wyników Doktorantka analizuje w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* (na modelu mysim i modelu danio pręgowanego) wpływ białka ADAM17 na wzrost i rozwój czerniaka. Modelem badawczym są komórki mysiego czerniaka B16F10 z obniżonym poziomem ekspresji białka ADAM17. W tej części pracy Doktoranta uzyskała następujące wyniki:

- otrzymała i scharakteryzowała oryginalny model badawczy;
- wykazała, że obniżenie poziomu ADAM17 osłabia proliferację komórek B16F10 w warunkach niewielkiej gęstości komórek (czyli słabych oddziaływań międzykomórkowych) i tempo pojawiania się pigmentu charakterystycznego dla „dojrzałych” komórek B16F10;
- wykazała, że obniżenie poziomu/aktywności ADAM17 osłabia zdolność migracji komórek B16F10 *in vitro*;
- wykazała, że obniżenie poziomu/aktywności ADAM17 w komórkach B16F10 osłabia zdolność medium z takich komórek do stymulacji ruchliwość komórek śródbłonkowych MBE (ale nie komórek MSI) i tworzenia przez nie „pseudokapilar” w mechanizmie zależnym od receptora EGFR;
- wykazała, że obniżenie poziomu ADAM17 w komórkach B16F10 osłabia ich zdolność do migracji i indukcji angiogenezy w embrionach danio pręgowanego;
- wykazała, że obniżenie poziomu/aktywności ADAM17 w komórkach B16F10 osłabia tempo wzrostu guzów indukowanych po ortotropowym podaniu (podskórnym) tych komórek myszom, oraz zdolność do tworzenia przerzutów w płucach po podaniu heterotropowym (do żyły ogonowej);
- wykazała, że obniżenie poziomu/aktywności ADAM17 w komórkach B16F10 osłabia ich potencjał do indukcji angiogenezy *in vivo* w organizmie myszy;

- wykazała że brak wpływu obniżenia poziomu/aktywności ADAM17 w komórkach B16F10 na dystrybucję populacji komórek układu immunologicznego w krwi i guzie nowotworowym;

Uzyskane wyniki w przekonujący sposób wskazują na udział białka ADAM17 w procesach przetrzutowania komórek nowotworowych i indukcji przez nie procesu angiogenezy. Ponadto, Doktorantka wykazała pewien „terapeutyczny” potencjał podawanych systemowo przeciwciał anty-ADAM17.

Na wymienienie zasługują następujące silne strony tej części pracy:

- 1) należy docenić wysiłek związany z przygotowaniem i scharakteryzowaniem, oraz wyborem optymalnych modeli komórkowych; Doktorantka ma świadomość ograniczeń różnych metod tworzenia modeli komórkowych i z tą świadomością prowadzi doświadczenia i interpretuje wyniki,
- 2) prezentowane wyniki i wyciągane wnioski są przekonująco udokumentowane w prawidłowo zaplanowanych doświadczeniach,
- 3) przyjęta konwencja rozdziału Wyniki, w której przedstawienie rezultatów doświadczenia poprzedzone jest wprowadzeniem i uzasadnieniem wykonania danego doświadczenia a zakończone interpretacją i podsumowaniem wyniku, ułatwia jego zrozumienie również czytelnikowi nie specjalizującemu się w danym obszarze biologii,
- 4) uzyskane wyniki stanowią racjonalną przesłankę dla planowania dalszych badań umożliwiających wyjaśnienie mechanizmów, w które zaangażowane jest białko ADAM17 (co Doktorantka zgrabnie puentuje bon motem Georga B. Shawa „Nauka nie potrafi rozwiązać żadnego problemu bez tworzenia kolejnych dziesięciu”),
- 5) tabele i ryciny są dobrze opracowane oraz (z małymi wyjątkami) logicznie i czytelnie opisane,
- 6) Doktorantka pamięta również, że testy typu MTT oceniają żywotność komórek a nie proliferację, co jest błędem często popełnianym nie tylko przez młodych badaczy (drobnym wyjątkiem jest tu sekcja 13 wyników).

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka ze swadą i znajomością tematu omawia znaczenie uzyskanych wyników i konfrontuje je z danymi obecnymi w literaturze tematu.

Rozprawa podsumowana jest klarownie sformułowanymi *Wnioskami* i uzupełniona informatywnym *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim.

Cała rozprawa jest napisana poprawnym językiem, a błędy edytorskie czy językowe zdarzają się wyjątkowo. Przytaczam je poniżej z obowiązku recenzenta, ale nie mają one wpływu na bardzo wysoką ocenę tego aspektu pracy.

- razi brak odmiany czasownika tabela w sformułowaniach „przedstawiono w Tabela x”;
- w niektórych miejscach brak poprawnej odmiany nazwy gatunkowej danio przegowany (w sformułowaniach „na modelu danio przegowany”;
- co oznacza „niekodująca sekwencja shRNA (str. 64);
- w literaturze polskiej częściej stosowany jest termin „test zarastania rysy” zamiast „testu rany”;
- wymiennie (i losowo) stosowane są terminy EGFR, HER1 i ErbB1, co nie ułatwia zrozumienia niektórych partii tekstu i rycin (np. Rysunek 22);
- na stronie 147 „zniknęła” część zdanie „wskazują, że, mimo że, to silnie mogą.”
- na stronie 128 mowa o poziomie białka ADAM17 w komórkach L1 i L2 – czy na pewno chodzi o poziom białka czy też o stopień jego wyciszenia?
- w tekście brak odniesienia do Rysunku 4 sup. z *Suplementu* pracy, a dwie tabele podpisane są „Tabela 1 sup.” .
- nie jest również jasne dlaczego wynik przedstawiony w (domyślnie) Tabeli 2 sup. miałby potwierdzić to, że TNFR2 jest substratem ADAM17 (tekst na str. 66) - z tabeli wynika brak wpływu wyciszenia ADAM17 na poziom TNFR2.

Uwaga formalna

Większość rezultatów zawartych w Części I Wyników (sekcje od 1 do 8) była już wcześniej prezentowana w publikacji Mężyk-Kopec, Wyroba i wsp. *PLoS One* (2015) 10:e0132661 (nie dotyczy to jedynie sekcji 9, w której analizowany jest wpływ ADAM17 na oddziaływanie między komórkami LEC a różnymi typami komórek nowotworowych). Doktorantka jest drugim głównym/równorzędnym współautorem tej publikacji, współ-odpowiedzialnym za zaplanowanie, przeprowadzenie i interpretację doświadczeń. Informacja o udziale autorów zawarta w publikacji nie pozwala jednak na ocenę indywidualnego wkładu Doktorantki w uzyskanie każdego elementu z prezentowanych tam wyników. Zgodnie z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Art. 13 pkt. 4) „rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, odpowiadający warunkom określonym w ust. 1.” W takim jednak przypadku (zgodnie z §5 punkt. 2 Rozporządzenia MNiSW z 30.09.2016) kandydat przedkłada promotorowi

oświadczenie określające jego indywidualny wkład w powstanie tej pracy (wraz z oświadczeniami co najmniej czterech współautorów określającymi ich indywidualny wkład). W sposób oczywisty regulacje te dotyczą rozprawy opartej o zbiór opublikowanych artykułów. Mając jednak na uwadze stopień nakładania się wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej i w/w publikacji zasadne i „bezpieczne” wydaje się wypełnienie tego wymogu również w tym przypadku. Zakładam, że odpowiednia deklaracja została przedstawiona promotorowi, a indywidualny udział Doktorantki w powstaniu publikacji uzasadnia wykorzystanie większej części prezentowanych tam wyników w Jej rozprawie doktorskiej.

Podsumowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy bardzo interesującego zagadnienia o dużej wartości naukowej. Praca jest bardzo dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana. Doktorantka wykazała się samodzielnością i umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie oryginalnych i wartościowych wyników. Praca z całą pewnością „stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.” Tak więc pomimo zawartych w recenzji drobnych uwag krytycznych wysoko oceniam przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pani Barbary Wyroby i proponuję jej wyróżnienie.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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, pos.595 z późn. zm.).

W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o kontynuowanie postępowania o nadanie pani Barbarze Wyrobie stopnia doktora.



prof. dr hab. Piotr Widłak

Centrum Onkologii - Instytut, Gliwice

8 października 2018