



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sudipty Das

Tytuł pracy: „**The effect of ADAM17-silencing on tumor development in murine models**”

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr Sudipty Das jest białko ADAM17 należące do licznej rodziny admalizyn grupującej transbłonowe proteazy o wielorakich funkcjach. Metaloproteaza ADAM17 jest białkiem stosunkowo dobrze scharakteryzowanym, biorącym udział w procesie znanym jako złuszczenie ektodomen białek transbłonowych. Pierwszym poznanym substratem tej proteazy był czynnik nekrozy nowotworów TNF, stąd alternatywną nazwą stosowaną w odniesieniu do ADAM17 jest TACE (enzym konwertujący TNF-alfa). Obecnie znane są liczne substraty ADAM17 i wiadomo, że ta proteaza zaangażowana jest w liczne procesy komórkowe.

Od kilkunastu lat proteaza ADAM17 znajduje się w obszarze zainteresowań onkologii, co wynika stąd, że w wielu nowotworach wykrywa się zwiększoną ilość/gęstość powierzchniową tego białka, a badania kliniczne wskazują, że zwiększony ponad prawidłową wartość poziom ADAM17 może być negatywnym czynnikiem prognostycznym. Tym samym proteaza błonowa ADAM17 wydaje się być potencjalnym celem molekularnym w terapii przeciwnowotworowej. Zanim jednak pojawi się możliwość sterowania poziomem ekspresji lub aktywności ADAM17 w celach terapeutycznych konieczne jest, ze względu na wielokierunkowe działanie ADAM17, głębsze poznanie roli tej proteazy w rozwoju nowotworów różnego typu.

Badając wpływ białek mających zdolność do wielokierunkowego działania na rozwój nowotworu, a do takich należy ADAM17, powinno się zakładać, że zmiany poziomu ekspresji genów kodujących te białka mogą prowadzić do zmiany fenotypu bądź samych komórek, bądź mogą zmieniać sposób ich oddziaływania z mikrośrodowiskiem okołonowotworowym, w tym z komórkami układu immunologicznego infiltrującymi obszar nowotworu, a także mogą modulować proces okołonowotworowej angiogenezy. Konieczne jest zatem prowadzenie równoległych badań *in vitro*, oraz *in vivo* i tak właśnie skonstruowany został projekt badawczy będący przedmiotem pracy doktorskiej mgr Sudipty Das.

W najprostszym ujęciu o funkcji określonego białka wnioskuje się na podstawie obserwacji rozmaitych właściwości komórek, w których bądź zwiększa się eksperymentalnie poziom ekspresji badanego genu, bądź tłumi się jego ekspresję. Doktorantka zastosowała w swojej pracy tę drugą strategię. Aby wyjaśnić wpływ ADAM17 na fenotyp komórek nowotworowych doktorantka posłużyła się modelem mysim.

Najpierw doktorantka wyprowadziła szereg linii komórek czerniaka (linia B16F10) oraz raka jelita grubego (linia MC38-CEA) stabilnie transfekowanych konstrukcjami, zawierających kasetę shRNA, pod kontrolą konstytutywnego promotora. Ekspresja kasety

shRNA prowadziła do pojawienia się w komórce swoistych cząsteczek interferującego RNA, a to w konsekwencji powodowało znaczące obniżenie poziomu mRNA ADAM17. Ponieważ procedura stabilnej transfekcji niesie możliwość wystąpienia efektu pozycji, stąd doktorantka bardzo słusznie prowadziła badanie wpływu wytlumienia ekspresji ADAM17 na właściwości transfekowanych komórek równolegle na kilku modyfikowanych liniach (4 linie w przypadku komórek czerniaka i 3 w przypadku komórek gruczolaka). Linie te charakteryzowały się podobnym, wysokim poziomem (około 80%) wytlumienia ekspresji badanego genu na poziomie transkryptu. Doktorantka nie badała jednak wytlumienia ekspresji genu ADAM17 na poziomie białka.

Badanie *in vitro* podstawowych właściwości istotnych dla progresji nowotworu nie wykazało, aby obniżenie poziomu ekspresji genu ADAM17 powodowało zmiany w żywotności czy tempie proliferacji zmodyfikowanych genetycznie komórek w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Doktorantka wykazała natomiast, że komórki z wytlumioną ekspresją ADAM17 migrują wolniej niż komórki kontrolne. Właściwość tę doktorantka udokumentowała posługując się dwoma testami, tzw. testem „scrach” (zarastanie rysy utworzonej w monowarstwie komórek), oraz śledząc trajektorie wędrówki pojedynczych komórek posługując się odpowiednim mikroskopem. Interesującą obserwacją było także wykazanie, że wytlumienie ekspresji ADAM17 powoduje ograniczenie zdolności komórek do wzrostu w pożywce półpłynnej (w tzw. miękkim agarze), jakkolwiek doświadczenie zostało wykonane jedynie dla komórek czerniaka, ponieważ komórki linii MC38-CEA w warunkach doświadczenia (zarówno kontrolne, jak i z wytlumioną ekspresją ADAM17) umierały po kilku dniach hodowli.

Powyższe obserwacje, a mianowicie obniżenie potencjału migracyjnego oraz ograniczenie tworzenia kolonii w miękkim agarze wskazuje, że wytlumienie ekspresji ADAM17 zmienia fenotyp komórek nowotworowych w kierunku ograniczenia ich potencjału tumorogennego, być może ograniczając ich zdolność do przerzutowania.

W odniesieniu do wzrostu guza *in situ* wyniki badań *in vitro* sugerowały, że jeśli komórki z wytlumioną stabilnie ekspresją genu ADAM17 zostaną wszczepione myszom, to można było oczekiwać, że guzy powstałe z komórek modyfikowanych powinny rosnać z podobną szybkością jak guzy powstałe z komórek kontrolnych, ponieważ wytlumienie ekspresji ADAM17 nie wpływało na szybkość proliferacji i żywotność komórek. Badania wykonane *in vivo*, w których doktorantka monitorowała wzrost guzów do 18 dnia od implantacji komórek (w niektórych przypadkach dłużej), wykazały jednak, że zarówno w przypadku komórek czerniaka, jak i w przypadku komórek raka jelita grubego, rozmiar i waga guzów powstałych z komórek, w których wytlumiono ekspresję ADAM17, była ponad dwukrotnie mniejsza niż guzów powstałych z komórek kontrolnych.

Wynik tego doświadczenia wyznacza początek drugiego etapu pracy ponieważ należało poszukiwać odpowiedzi na podstawowe pytanie: skoro wytlumienie ekspresji genu ADAM17 nie wpływa na proliferację komórek, to jaka jest przyczyna ograniczonego wzrostu *in vivo* guzów wywodzących się z tych komórek? Czy nie powinno się zatem wziąć pod

uwagę wpływu wzajemnych oddziaływań komórek nowotworowych o obniżonej ekspresji genu ADAM17 z mikrośrodowiskiem nowotworu?

Pierwszym, niejako naturalnym kierunkiem rozważań doktorantki (biorąc pod uwagę znane właściwości proteazy ADAM17) było założenie, że komórki guza wywodzącego się z komórek z wytłumioną ekspresją ADAM17 mogą obniżać przeciwnowotworową aktywność układu immunologicznego. Wykonane przez doktorantkę badanie poziomu szeregu cytokin wykazało, że jedynie poziom TNF i INF- γ , oraz MCP-1 był znacząco wyższy w guzach powstałych z komórek z wytłumioną ekspresją ADAM17 niż w guzach kontrolnych, co wynikało raczej stąd, że poziom transkrypcji genów kodujących wymienione cytokiny był wyższy w guzach powstałych z komórek modyfikowanych niż z komórek kontrolnych.

Ponieważ jednocześnie poziom wymienionych cytokin był niższy w surowicy myszy obciążonych guzem wywodzącym się z komórek z zahamowaną ekspresją ADAM17 niż w surowicy myszy z guzami wywodzącymi się z komórek kontrolnych należało zatem rozstrzygnąć, które komórki nowotworowe czy infiltrujące guz są źródłem cytokin. Odpowiednie badania wskazywały, że źródłem cytokin nie są komórki nowotworowe, lecz raczej komórki układu immunologicznego infiltrujące guz nowotworowy. Doktorantka postawiła zatem hipotezę, że stopień infiltracji guzów wywodzących się z komórek z wytłumioną ekspresją genu ADAM17 przez komórki syntetyzujące i wydzielające badane cytokiny jest wyższy niż w przypadku guzów wywodzących się z komórek kontrolnych. Doktorantka nie próbowała jednak (lub nie udało się?) zweryfikować tej hipotezy doświadczalnie poprzez analizę składu i różnic ilościowych w populacji komórek infiltrujących guzy nowotworowe.

Oceniając, czy zwiększony poziom cytokin w mikrośrodowisku guza może nasilać ich efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych doktorantka wykonała odpowiednie badania *in vitro* stwierdzając, że cytotoksyczność TNF i INF- γ w stosunku do badanych komórek nie zależy od poziomu ekspresji ADAM17, oraz że nie występuje korelacja pomiędzy poziomem ekspresji ADAM17 i aktywności kaspaz oraz podatnością komórek nowotworowych na proapoptotyczny bodziec wywoływany przez TNF i INF- γ . Na tym etapie pracy wytłumaczenie, dlaczego wytłumienie ekspresji ADAM17 spowalnia wzrost guzów *in vivo*, nie mogło być dokonane jednoznacznie ani biorąc pod uwagę badane zmiany fenotypu komórek nowotworowych, ani na gruncie wpływu badanych właściwości zmodyfikowanych komórek na układ immunologiczny.

Wykrycie cechy, która w istotny sposób różnicowała guzy wywodzące się z komórek z wytłumioną ekspresją genu ADAM17 i guzy wywodzących się z komórek kontrolnych, nastąpiło w wyniku oglądu guzów *in vivo*. Doktorantka zaobserwowała, że gęstość powierzchniowego unaczynienia guza i regionów sąsiadujących z guzem była większa w przypadku guzów powstałych z komórek kontrolnych niż w przypadku guzów powstałych z komórek modyfikowanych. Wynikiem tej obserwacji było przypuszczenie, że ekspresja genu ADAM17 sprzyja rozwojowi naczyń, a jej wytłumienie angiogenezę hamuje.

W konsekwencji pojawiło się kolejne pytanie, a mianowicie czy to brak ekspresji ADAM17 hamuje rozwój naczyń, czy też raczej w wyniku wolniejszego wzrostu guzów

wywodzących się z komórek z obniżoną ekspresją genu ADAM17 stopień ich niedotlenienia jest mniejszy a tym samym mniejszy jest także prangiogeny wpływ środowiska w jakim dzielą się komórki nowotworowe? Badając poziom ekspresji genów kilku czynników proangiogeny, doktorantka wykazała, że poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A) wydzielanego przez komórki z wytłumioną ekspresją ADAM17 jest znacząco niższy niż w przypadku komórek kontrolnych, co jak wskazywały dalsze badania, wynikało z obniżenia o około połowę poziomu mRNA tego czynnika wzrostu. Zależność tę doktorantka obserwowała także *in vivo* w komórkach guza. Molekularne przyczyny zmniejszonej ekspresji VEGF w tych komórkach są na razie niejasne i ich wyjaśnienie wymaga dalszych badań (dotyczy to głównie wyjaśnienia jaki substrat ADAM17 w badanych komórkach byłby zaangażowany w przekaz sygnału prowadzący do modulacji ekspresji genu kodującego VEGF).

W podsumowaniu chciałbym stwierdzić, że w pracy doktorskiej dr Sudipty Das, w odniesieniu do wpływu ADAM17 na rozwój nowotworów wywodzących się z komórek B16F10 i MCA38-CEA zawarty jest szereg obserwacji, których pełne wyjaśnienie na gruncie molekularnym wymaga jednak dalszych badań, a które oczywiście musiałyby daleko wybiegać poza zakres jednej pracy doktorskiej. Spośród licznych obserwacji trzy wydają się szczególnie ważne, mające zarówno istotną wartość naukową jak i potencjalnie praktyczną.

Po pierwsze, doktorantka wykazała, że wytłumienie ekspresji genu ADAM17 w badanych komórkach wpływa hamująco na rozwój naczyń okołonowotworowych. Po drugie, wyniki doktorantki sugerują, że wytłumienie ekspresji genu ADAM17 może w niektórych komórkach nowotworowych prowadzić do ograniczenia ich właściwości wzrostu niezależnego od zakotwiczenia (*anchorage-independent growth*). Tym samym obniżenie ekspresji ADAM17 mogłoby w przypadku niektórych nowotworów ograniczać ich zdolność do rozsiewu. Po trzecie, doktorantka wykazała, że wytłumienie ekspresji genu ADAM17 ogranicza potencjał migracyjny badanych komórek *in vitro*.

Chciałbym w odniesieniu do tego i do poprzedniego wyniku zapytać, czy być może obserwowano, (przynajmniej w przypadku komórek B16F10, co jest łatwe ze względu na ich zabarwienie), że obniżenie ekspresji ADAM17 zmniejsza tendencję komórek do przerzutowania? Jeśli obniżenie ekspresji ADAM17 mogłoby nie tylko hamować szybkość wzrostu guzów, ale także hamować rozsiew komórek nowotworowych, byłaby to dodatkowa cenna obserwacja wynikająca z pracy doktorskiej.

Przytoczone powyżej obserwacje wskazują, że w badanych komórkach wytłumienie ekspresji genu ADAM17, powoduje zarówno zmiany fenotypowe samych komórek nowotworowych, jak i prowadzi do zmian w oddziaływaniu komórek nowotworowych ze środowiskiem okołonowotworowym. Tym samym, wyniki badań doktorantki są ważną wskazówką, że hamowanie ekspresji genu ADAM17 może okazać się istotną strategią ograniczania postępu choroby nowotworowej.

W tym kontekście szczególne znaczenie ma ostatni z trzech wniosków, w którym doktorantka wyraża przekonanie, że ADAM17 może być celem molekularnym terapii

przeciwnowotworowej nie tylko w przypadku tych nowotworów, których komórki zwiększają potencjał tumorogeny w wyniku autokrynnego wpływu ADAM17 na proliferację komórek nowotworowych, ale także (na co przekonywująco wskazują wyniki badań pracy doktorskiej), w przypadku tych nowotworów, w których wspomniany mechanizm autokrynny byłby wyłączony.

Wniosek ten jest bez wątpienia silną inspiracją do poszukiwań (w tym w odniesieniu do badań klinicznych) jakie nowotwory mogłyby się we wspomnianej kategorii mieścić, oraz ukazuje celowość i konieczność prowadzenia dalszych badań zmierzających do poszerzeniem wiedzy o mechanizmie stymulowania procesu nowotworowego przez proteazę ADAM17 bez zaangażowania zależnej od tego białka ścieżki autokrynnnej.

Praca doktorska ma tradycyjny układ zawierając listę stosowanych skrótów, rozdział „Wstęp” (25 stron), „Cel pracy”, „Materiały i metody” (14 stron), „Wyniki” (38 stron), „Dyskusja” (9 stron), „Streszczenie” (2 strony), „Wnioski” (trzy wnioski), oraz obszerny spis piśmiennictwa zawierający 263 pozycje, z czego 73 to cytowania najnowszych prac (lata 2008 – 2012).

Praca napisana jest w języku angielskim, na tyle na ile mogę ocenić, bardzo poprawnym. Tytuł pracy doskonale odzwierciedla zakres wykonanych badań. Praca napisana jest przejrzysto, a uzasadnienie celu badań wynika jednoznacznie z kompetentnego podsumowania w rozdziale „Wstęp” dotychczas zgromadzonej wiedzy o niezwykle złożonym przedmiocie, jakim jest udział białek rodziny ADAM w rozmaitych procesach biologicznych a w szczególności w rozwoju nowotworów. Śledzenie toku rozumowania doktorantki ułatwia przyjęty przez nią sposób prezentowania wyników, a mianowicie rozpoczynanie każdego podrozdziału „Wyników” od wyjaśnienia celu danego eksperymentu, a w opisie cząstkowego wyniku badań prowadzenia rozważań, których konkluzja stanowi przesłankę do wykonania kolejnego doświadczenia. Na podkreślenie zasługuje dyskusja, w której doktorantka, mimo że praca w wielu miejscach dochodzi do etapu, który wymagałby dalszych pogłębionych badań (co oczywiście, jak już wspomniałem, przekraczałoby zakres badań jaki można przewidzieć dla jednej pracy doktorskiej), nie spekuluje zanadto, eliminując natomiast na gruncie kompetentnych rozważań pewne możliwości i wskazując, w jakim kierunku powinny iść dalsze prace dotyczące dyskutowanego wyniku.

Oceniając pracę, należy mieć na uwadze, że w momencie kiedy formułowano temat pracy doktorskiej i rozpoczynano badania, wiedza o tym, czy i w jaki sposób ADAM17 może modulować fenotyp komórki nowotworowej oraz wiedza o wzajemnych oddziaływaniach środowiska okołoguzowego z komórkami nowotworowymi wykazującymi zróżnicowany poziom ekspresji genu ADAM17 była znacznie, znacznie mniejsza niż obecnie. Tym bardziej należy podkreślić oryginalność poczynionych przez doktorantkę obserwacji.

Nie mam zbyt wielu uwag ani do części merytorycznej, ani do sposobu opracowania rozprawy doktorskiej. Chciałbym jedynie prosić o kilka wyjaśnień lub komentarzy.

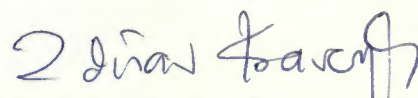
1. Stopień wytłumienia ekspresji genu ADAM17 oceniano na podstawie wyznaczania poziomu transkryptu tego genu. Czy badano jednocześnie, w jakim stopniu ulega obniżeniu poziom białka? Nie znalazłem (być może z powodu przeoczenia) informacji na ten temat.

2. Większość doświadczeń prowadzona była na komórkach czerniaka i gruczolakoraka jelita grubego. Część badań prowadzono jedynie na komórkach MC38-CEA i nie wszędzie znajduje się wyjaśnienie dlaczego? Ponadto nie zawsze w opisie rysunków i w odpowiednich tabelach podane są informacje do jakiego nowotworu odnoszą się prezentowane dane (być może było to zbyt oczywiste?)

3. Czy wyniki niektórych oznaczeń (np str. 82) ukazujące zróżnicowany poziom ekspresji niektórych genów w indywidualnych klonach nie świadczy mimo wszystko o tym, że to miejsce integracji transgeny, a nie obniżenie poziomu ekspresji ADAM17 może odpowiadać za niektóre obserwowane efekty? Czy usiłowano wykonywać jakieś wstępne badania z zastosowaniem przejściowej transfekcji komórek inhibitorowym RNA (siRNA), przynajmniej w tych doświadczeniach, które nie wymagały długotrwałego, stabilnego wyciszenia ekspresji genu ADAM17?

Podsumowując ocenę stwierdzam, że doktorantka wykonała solidną pracę, której wyniki wskazują, że stopień ekspresji genu ADAM17 w komórkach nowotworowych może w zróżnicowany sposób wpływać na rozwój nowotworu, nie zawsze poprzez angażowanie sygnału autokrynnego. Obserwacja ta ma istotne znaczenia dla projektowania dalszych badań, a w dłuższej perspektywie czasowej może mieć znaczenie dla weryfikowania zróżnicowanego poziomu tej proteazy w nowotworach u ludzi jako markera nowotworowego i potencjalnego celu terapii przeciwnowotworowej. Biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim wyszczególnione w ustawie o zmianie ustawy o stopniach naukowych. Tym samym składam wniosek do Wysockiej Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktorantki Sudipty Das do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gliwice, 5 listopada 2012.


Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk