nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 5892 207; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; http://www.nencki.gov.pl

Prof. dr hab. Anna Filipek
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: a.filipek@nencki.gov.pl
tel. (48-22) 5892 332

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Durbas
pt. „Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za śmierć komórkową indukowaną przez przeciwciało monoklonalne 14G2a wiążące gangliozyd GD2 na ludzkich komórkach neuroblastoma"

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Durbas jest określenie zmian poziomu i aktywności wybranych białek, a w szczególności kinaz AKT, mTOR, aurora A, w komórkach neuroblastoma po ich traktowaniu przeciwciałem monoklonalnym 14G2a oraz określenie roli białka PHLDA1 w tych komórkach.

Neuroblastoma należy do nowotworów złośliwych i stanowi znaczny odsetek (do 10%) wszystkich nowotworów rozpoznawanych u dzieci. Jak dotąd, leczenie tego nowotworu obejmuje chemioterapię, radioterapię, chirurgiczne usunięcie guza oraz immunoterapię. Dobór terapii zależy od lokalizacji guza i stopnia zaawansowania choroby. Jak wspomniano, jednym ze sposobów leczenia jest immunoterapia. Metoda ta polega na podaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom będącym integralną częścią błony komórkowej komórek nowotworowych. Jednym z takich antygenów jest gangliozyd GD2. Jest to glikosfingolipid, który zajmuje 12 miejsce spośród 75 najważniejszych antygenów nowotworowych. Gangliozyd GD2 jest charakterystyczny dla neuroblastoma, ale występuje też w komórkach czerniaków, glejaków, mięsaków czy drobnokomórkowego raka płuc. Wcześniejsze prace z zespołu, w którym pracuje Doktorantka wskazały, że po związaniu się przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 uruchamiane są szlaki przekazywania sygnału w komórkach ludzkiej linii neuroblastoma IMR-32, które w efekcie prowadzą do śmierci tych komórek. Rola poszczególnych białek w tych szlakach nie była w pełni poznana i dlatego Doktorantka w swoich badaniach postanowiła określić zmiany w ich poziomie/aktywności jak też ich wzajemną regulację. Zadanie to uważam za niełatwe, ale bardzo interesujące i dające w dalszej perspektywie możliwość opracowania nowych terapii bądź modyfikacji terapii już istniejących.

Forma rozprawy

Rozprawa mgr Małgorzaty Durbas została przygotowana na podstawie artykułów naukowych opublikowanych wcześniej przez Doktorantkę. W skład przedstawionej rozprawy, który jest odmienny od klasycznych rozpraw doktorskich, wchodzi Wykaz publikacji, Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, które przybliża czytelnikowi zagadnienia będące przedmiotem prowadzonych badań, Omówienie wyników opublikowanych prac doświadczalnych, Wnioski, Bibliografia (111 pozycji) oraz Wykaz załączników.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały zawarte w trzech pracach doświadczalnych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Oncology 2015 (IF 3.018),* gdzie Doktorantka wraz z Dr Ireną Horwacik jest pierwszym i równorzędnym autorem, *Acta Biochimica Polonica (IF 1.463),* gdzie Doktorantka jest drugim autorem, oraz *International Journal of Oncology 2016 (IF 3.018),* gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem. Należy podkreślić, że wszystkie trzy prace spełniają ustawowy wymóg spójności tematycznej, a zawarte w nich wyniki zostały szczegółowo omówione i przedyskutowane w rozdziale zatytułowanym „Omówienie wyników opublikowanych prac doświadczalnych".

Ostatnia część rozprawy to Załączniki. Zawierają one kserokopie trzech prac doświadczalnych Doktorantki oraz Oświadczenia współautorów tych prac. Oświadczenie promotora rozprawy, prof. Hanny Rokity, oprócz szczegółowego opisu udziału w poszczególnych publikacjach, zawiera też stwierdzenie, że wkład Doktorantki w przygotowanie tych trzech publikacji jest wiodący oraz, że wyniki w nich zawarte nie będą wchodziły w skład żadnej innej rozprawy doktorskiej. Podsumowując, rozprawa spełnia wymogi formalne.

Stosowana metodyka i wyniki badań

W swojej pracy doktorskiej mgr Małgorzata Durbas postawiła sobie za cel zbadanie zmian poziomu i aktywności wybranych białek zaangażowanych w kluczowe szlaki przekazywania sygnału w komórkach neuroblastoma po traktowaniu tych komórek przeciwciałem monoklonalnym 14G2a rozpoznającym gangliozyd GD2. Cel ten Doktorantka realizowała stosując wiele różnorodnych metod z zakresu biologii, biochemii i biologii molekularnej. Doktorantka prowadziła hodowle różnych linii komórkowych, wprowadzała do komórek plazmidy metodą lentivirusową, otrzymywała stabilne linie komórkowe, przygotowywała lizaty białkowe z komórek i z poszczególnych frakcji komórkowych, oczyszczała przeciwciała, przeprowadzała testy cytotoksyczności, analizy Western blot, izolowała RNA, stosowała metody PCR i RT-PCR, wykonywała analizę statystyczną. Podsumowując tę część można stwierdzić, że Doktoranta podczas prowadzenia badań opisanych w rozprawie stosowała wiele różnorodnych metod, adekwatnych do celu i zakresu zaplanowanych badań.

Stosując wyżej wymienione metody Doktorantka uzyskała wiele ciekawych wyników, które w sposób znaczący wzbogaciły stan wiedzy na temat udziału wybranych białek i szlaków sygnałowych oraz ich wzajemnej regulacji po związaniu się przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 w komórkach neuroblastoma. Na podstawie tych wyników Doktorantka stwierdza, między innymi, iż traktowanie komórek neuroblastoma przeciwciałem 14G2a, którego efektem jest obniżenie tempa proliferacji i śmierć komórek, prowadzi do: 1) zahamowania fosforylacji/aktywności kinaz AKT i mTOR, 2) możliwego wzrostu fosforylacji/aktywności fosfatazy PTEN, 3) wzrostu poziomu i aktywności białka p27 (inhibitora kinaz cyklino-zależnych), 4) obniżenia poziomu czynnika transkrypcyjnego MYCN. Ponadto, Doktorantka wykazuje, że białko PHLDA1 jest bezpośrednio zaangażowane w odpowiedź komórek neuroblastoma IMR-32 na podanie przeciwciała

14G2a. Ponieważ, Doktorantka badała wiele białek, ich poziom i aktywność oraz ich wzajemną regulację, bardzo cenne jest to, że rozdział „Omówienie wyników opublikowanych prac doświadczalnych" kończy się schematem (Rycina 6), który ułatwia czytelnikowi zrozumienie procesów zachodzących w komórkach neuroblastoma IMR-32 po ich traktowaniu przeciwciałem 14G2a.

Uwagi merytoryczne, edytorskie i inne

Przedstawione poniżej uwagi dotyczą zarówno części rozprawy opracowanej przez Doktorantkę jak też zamieszczonych na końcu publikacji.

Wykaz skrótów. Nieprawidłowo został rozwinięty skrót NGF. Pełna, właściwa nazwa to czynnik wzrostu nerwu. Rozwinięcie skrótu PIP3 też nie jest zgodne z aktualnie stosowanym nazewnictwem biochemicznym. PIP3 to fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan. Podobnie jest w przypadku PIP2.

Streszczenie. W wersji polskiej Streszczenia rozprawy (str. 10, 3 linia od góry) Doktorantka napisała „śmierć komórek linii IMR-32". Według mnie, na samym początku Streszczenia powinna być informacja, że są to komórki neuroblastoma. Zdaję sobie sprawę, że dla Autorki jest to oczywiste i po pewnym czasie dla recenzenta też, ale zaczynając czytanie pracy nie każdy musi wiedzieć, że komórki IMR-32 to komórki ludzkiej neuroblastoma. W Streszczeniu, jak też w kolejnych częściach rozprawy, Doktorantka stosuje zwrot „szlak sygnałowania". Uważam, że termin bardziej poprawny to „szlak przekazywania sygnału w komórce".

Wprowadzenie. Wprowadzenie, rozdział 5, napisane jest trochę chaotycznie. Zawiera ważne informacje, ale zabrakło mi opisu, w jaki sposób gangliozyd GD2 zapoczątkowuje w błonie kaskadę zdarzeń, których kontynuacją są zmiany w poziomie i aktywności białek badanych przez Doktorantkę. Co wiadomo na ten temat? Niepotrzebnie natomiast Autorka napisała w tym miejscu o wyborze do swoich badań linii IMR-32. Tak naprawdę w badaniach Doktorantka stosuje też inne linie neuroblastoma i może dobrze byłoby krótko je opisać. Poza tym w kilku miejscach Doktorantka przedstawia cele swoich badań. Według mnie jest to zbędne, gdyż są one zamieszczone w akapicie poprzedzającym omówienie wyników publikacji. Moim zdaniem, we Wprowadzeniu wystarczyłoby ograniczyć się do zamieszczenia danych literaturowych dotyczących przedmiotu badań. Inne drobne kwestie odnośnie tego rozdziału wymieniam poniżej. Na Rycinie 1, str. 16, przedstawiony jest schemat budowy gangliozydu GD2. Rycina ta byłaby dużo bardziej czytelna, gdyby nazwy poszczególnych elementów były umieszczone na Rycinie, a nie w opisie. Na str. 24 (1 linia od góry) zamiast tkanki „normalne" powinno być „tkanki prawidłowe". Nie jest też dla mnie jasne, co oznacza termin „kontekst komórkowy" (str. 24, 1 linia pod Ryciną 4). Na str. 26, ostatnie zdanie pierwszego akapitu nie precyzuje, degradacja jakiego białka jest regulowana przez PHLDA1. Na str. 38 Autorka napisała, że „PHLDA1 ulega ko-lokalizacji..''; raczej powinno być „PHLDA1 ko-lokalizuje.." lub jeszcze lepiej „współwystępuje". Wymieniam tylko niektóre nieprawidłowo stosowane pojęcia, głównie po to, aby zwrócić uwagę Doktorantki na używanie poprawnych terminów w przygotowywaniu monografii w języku polskim. Z tego też względu nie wymagam, aby Doktorantka w trakcie obrony ustosunkowywała się do tych uwag.

Omówienie opublikowanych prac doświadczalnych. W rozdziale tym (rozdział 6) brakuje mi odwoływania się do odpowiednich rycin omawianych publikacji. Dodanie takiej informacji ułatwiłoby recenzowanie tej części rozprawy. Na str. 41 Autorka wspomniała o planach dotyczących badania interakcji pomiędzy PHLDA1 i aurora A. Prosiłabym o rozwinięcie tej myśli, a konkretnie o odpowiedź na pytanie, jakimi metodami Doktorantka zamierza badać te interakcje?

Publikacje. Zamieszczone publikacje będące przedmiotem rozprawy przeszły już ocenę merytoryczną i może dlatego mam tylko dwie drobne uwagi. I tak, na rycinach obrazujących poziom danego białka lub jego formy ufosforylowanej, w opisie osi Y konsekwentnie stosowany jest termin „expression level", a powinno być „protein level". Druga kwestia to, dlaczego w pracy opublikowanej w *International Journal of Oncology 2016* badano poziom HSF1 i Hsp40? Jaki jest związek pomiędzy tymi białkami oraz białkami szlaku PI3K/AKT/mTOR, czy też białkami PHLDA1 i aurora A? Nie znalazłam wyjaśnienia ani w publikacji, ani też w rozdziale „Omówienie opublikowanych prac doświadczalnych". Wiadomo, że Hsp40 współdziała z Hsp70, ale poziomu Hsp70 nie badano. Dlaczego? Prosiłabym Doktorantkę o komentarz na ten temat podczas obrony.

Podsumowanie

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oceniam wysoko. Zawiera ona oryginalne wyniki, które Doktorantka bardzo dobrze skonfrontowała z danymi opublikowanymi wcześniej przez autorów z rodzimego zespołu i przez autorów z innych grup badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka opracowała schemat obrazujący możliwy łańcuch zdarzeń zachodzących w komórkach neuroblastoma IMR-32 po ich traktowaniu przeciwciałem 14G2a, co w efekcie prowadzi do zahamowania tempa proliferacji tych komórek. Ponadto, wyniki badań prezentowane przez Doktorantkę, jak i te które planuje otrzymać w najbliższym czasie, między innymi w ramach projektu NCN PRELUDIUM, mogą w przyszłości być wykorzystane w opracowywaniu nowych, bardziej skutecznych metod leczenia złośliwych guzów neuroblastoma. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zawarte są w trzech publikacjach, przy czym dwie z nich to prace posiadające IF powyżej 3. Warto też nadmienić, że Doktorantka jest współautorem pięciu innych publikacji o zasięgu międzynarodowym. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do oceny rozprawa 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, poz. 595 z późn. zm.), i w związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Durbas do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na uzyskanie wyników, które w znaczący sposób poszerzyły dotychczasową wiedzę z omawianej dziedziny oraz w przyszłości mogą być wykorzystane w projektowaniu nowych terapii, wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Anna Filipek

A. Filipek

Warszawa, 24 sierpnia 2016