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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Juchy:
pt. **„Otrzymywanie aptamerów RNA hamujących aktywność biologiczną metaloproteaz dysintegrynowych ADAM10 i ADAM17"**
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Berety

Enzymy ADAM10 i ADAM17 należą do klasy błonowych metaloproteaz dysintegrynowych, zaangażowanych w złuszczanie czynników wzrostu, cytokin, ich receptorów, a także białek adhezyjnych z powierzchni komórki. Liczne dane doświadczalne świadczą o ich znaczącej roli w procesach wzrostu i różnicowania komórek m. in. układu nerwowego oraz w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Nieprawidłowe działanie ADAM10 i ADAM17 może przyczyniać się do progresji nowotworów oraz nasileniu przewlekłych stanów zapalnych występujących m. in. w przebiegu chorób autoimmunizacyjnych. Dlatego wspomniane enzymy stanowią od kilkunastu już lat intensywnie badany cel terapeutyczny.

Przedstawiona do oceny praca stawiała sobie za cel uzyskanie nowych inhibitorów proteaz ADAM10 i ADAM17 w postaci oryginalnych aptamerów RNA. Dla weryfikacji ich działania Autor zaplanował również uzyskanie aktywnych enzymatycznie ektodomen badanych proteaz w systemie bakulowirusowym oraz ważnych dla potwierdzenia skuteczności inhibicji linii komórkowych pozbawionych badanych proteaz w procesie edycji genomu. Przedstawiony główny cel podjętych badań był ambitny, dobrze uzasadniony oraz oryginalny, w dostępnej literaturze nie natrafiłem na informacje o dostępnych już wcześniej tej klasy inhibitorach badanych proteaz.

Realizowane badania miały pozwolić na uzyskanie nowej klasy specyficznych inhibitorów ADAM10/ADAM17 – aptamerów RNA, w nadziei pozyskania cząsteczek o wysokim powinowactwie, specyficzności wobec badanych enzymów i zdolnych do

hamowania proteolizy w układach komórkowych. Dzięki tym cechom uzyskane aptamery RNA mogłyby stać się potencjalnym narzędziem terapeutycznym wykorzystywanym w eksperymentalnych terapiach onkologicznych czy immunoterapii. Ma to szczególne znaczenie wobec faktu, że dostępne aktualnie cząsteczki hamujące badane proteazy nie wykazują wystarczającej specyficzności lub obarczone są pojawiającymi się w toku eksperymentalnych terapii, dominującymi objawami ubocznymi.

W przedłożonej rozprawie Autor osiągnął w pełni postawione cele badawcze. W toku wielu rund selekcyjnych z użyciem metody cell-SELEX uzyskał szereg aptamerów RNA wykazujących powinowactwo do ADAM10 i ADAM17. W toku kolejnych doświadczeń z wykorzystaniem skonstruowanych, oczyszczonych i aktywnych ektodomen proteaz wybrał aptamery specyficzne dla ADAM10 oraz o podwójnej specyficzności dla obu proteaz. Wyznaczył parametry IC50 dla aptamerów-inhibitorów, a następnie potwierdził ich skuteczność działania z wykorzystaniem linii komórkowych ze zmodyfikowaną ekspresją proteaz z wykorzystaniem technik edycji genomu. Wykorzystał również techniki bioinformatyczne do analizy struktury wybranych aptamerów, a dla jednego z nich wyznaczył również parametry oddziaływania z ektodomeną enzymu.

Dokumentacja pracy zawarta jest na 179 stronach maszynopisu w klasycznym układzie: wyodrębniony spis skrótów, streszczenie, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja oraz spis aktualnych i adekwatnie dobranych pozycji bibliograficznych. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a język zrozumiały. Pod względem edytorskim praca jest na wysokim poziomie, odznacza się starannością i dbałością o estetykę. Napotkałem jedynie nieco błędów interpunkcyjnych oraz zapewne niepożądaną, ale łatwo identyfikowalną translokację strony 137 na niemal koniec tekstu doktoratu. Wkraczająca do naszego języka i również tej rozprawy angielszczyzna np. „targetowanie" nieco boli, ale pewnie powinna przekonywać pragmatyzmem...

Wstęp rozprawy dokumentuje niewątpliwie głęboką znajomość przedmiotu badań. Doktorant zawarł we wstępie niezbędny opis procesu proteolizy, budowy i funkcji proteaz ADAM, ich znaczenia biologicznego oraz aktywność w przewlekłych chorobach zapalnych czy roli w nowotworach i możliwości modulacji tej aktywności.

Ponadto opisał metody pozyskiwania aptamerów, ich selekcji, a także zastosowanie w technikach badawczych, diagnostycznych oraz terapii. Sposób napisania tej części pracy świadczy o głębokiej wiedzy w obszarze badań, ale także dużej umiejętności wyboru 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 i biochemii. Wachlarz użytych w pracy metod i co więcej, jak udokumentowane dalej, metod użytych z sukcesem, ilustruje ogromną biegłość metodyczną Doktoranta wykorzystującego z powodzeniem możliwości dostępne w doskonałym laboratorium i środowisku badawczym.

Wyniki analiz są bardzo dobrze i przejrzyście opisane oraz szczegółowo i atrakcyjnie zilustrowane. Dotyczy to również opisów kolejnych etapów konstrukcji genetycznych, które w niektórych spotykanych przeze mnie opracowaniach dyplomowych są zdawkowe i niekompletne, w przeciwieństwie do przedłożonej do oceny rozprawy. W toku lektury nie miałem wątpliwości interpretacyjnych w odniesieniu do omawianych wyników.

Zawarta na kolejnych stronach pracy dyskusja odnosi się początkowo do uzasadnienia podjęcia badań, opisu dotychczasowych doświadczeń z inhibitorami badanych proteaz, a następnie przedstawia krytyczną analizę wartości uzyskanych wyników, w szczególności parametrów charakteryzujących nowe, uzyskane w toku pracy z sukcesem inhibitory ADAM10/17. Autor prowadzi dyskusję z rozważną ostrożnością, podkreślając zarówno wartość już uzyskanych wyników, jak i możliwości ich poprawy np. poprawy specyficzności inhibitorów. Nie unika również opisu i interpretacji kontrowersyjnych wyników tak, jak w przypadku złuszczania receptora IL6, wykorzystując umiejętnie wiedzę zgromadzoną we wcześniejszych publikacjach. Sposób napisanie tego rozdziału potwierdza wiedzę Doktoranta i wskazuje na umiejętność krytycznego, dojrzałego myślenia.

W podsumowaniu: Doktorant przedstawił znaczące wyniki noszące znamiona oryginalności naukowej, udokumentował również uzyskanie znaczących umiejętności metodycznych oraz prowadzenia samodzielnej pracy badawczej. Wykazał także dużą biegłość w interpretacji wyników oraz konfrontacji uzyskanych wyników z danymi

literaturowymi. W związku z powyższym przedstawiam opinię, że rozprawa odpowiada warunkom określonym w stosownych zapisach ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych i wnoszę o dopuszczenie mgr Jarosława Juchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję ponadto wyróżnienie jego rozprawy w uznaniu jej oryginalności, nakładu poniesionej pracy, biegłości metodycznej, a także sposobowi prezentacji zrealizowanego projektu w przedłożonej rozprawie.

Gdańsk, dnia 3 listopada 2017 roku

prof. dr hab. Jacek Bigda