prof. dr hab. Tomasz Twardowski

20.10.2017 r.

Ocena pracy doktorskiej Pana mgra Jarosława Juchy pt.
„Otrzymywanie aptamerów RNA hamujących aktywność biologiczną metaloproteaz dysintegrynowych ADAM10 i ADAM17"

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgra Jarosława Juchy została wykonana w Zakładzie Biochemii Komórki, Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego, w Krakowie, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Joanny Berety. Rozprawa doktorska napisana została w języku polskim; praca liczy ok. 150 s. tekstu oraz 27s. bibliografii zawierającej ponad 500 referencji i 1 s. załącznika.

Doktorant podjął się ambitnych zadań, z których wywiązał się z pełnym powodzeniem, co należy odnotować z uznaniem. Temat, cel i zastosowane techniki badawcze ocenianej pracy doktorskiej mieszczą się w bardzo aktualnym i niezwykle ważnym kierunku badawczym: wykorzystanie metod molekularnych do badania i w dalszej przyszłości do realizowania spersonalizowanej medycyny [oczywiście generalnym przesłaniem jest poprawa warunków zdrowotnych]. Temat pracy doktorskiej Pana mgra Jarosława Juchy jest jednoznacznie sformułowany, a kierunkowy cel spełnia wymagania stawiane obecnie przed autorami ambitnych projektów badawczych w dziedzinie podstaw molekularnych współczesnej medycyny i biotechnologii.

Celem pracy, jasno sformułowanym na stronie 48, było, cytuję:
„(…)otrzymanie nowego typu inhibitorów białek ADAM10 i ADAM17 w postaci aptamerów RNA. (…)". Cel ten został osiągnięty, a do realizacji tego celu Doktorant zastosował bogaty warsztat badawczy. W szczególności chcę wyróżnić zastosowanie innowacyjnych technologii TALEN i CRISPR/Cas9 oraz wykorzystanie systemu bakulowirusów do potwierdzenia specyficznego [inhibitorowego] oddziaływania aptamerów.

Przedłożona do recenzji praca doktorska to bardzo starannie przygotowany wydruk komputerowy [obszerny: 179 s.!], opracowany zgodnie z wymogami i zwyczajami obowiązującymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk przyrodniczych; obejmuje bowiem w kolejności: *Wykaz skrótów i streszczenie* [oraz „abstrakt" w języku angielskim] *Wstęp wraz z omówieniem literaturowym* (30 stron), *Cel pracy* (1 strona), *Materiały* i *Metody stosowane w pracy* (razem 35 stron), *Wyniki* (40 stron), *Dyskusję* (19 stron), *Wnioski* (2 strony) *Literatura* (28 stron); w rozprawie Doktorant zamieścił 37 rysunków oraz 25 tabel.

Ocena poszczególnych części pracy:

Przegląd literatury

Bardzo pozytywnie oceniam przygotowany *Przegląd literaturowy*, który stanowi dobrą podstawę merytoryczną i uzasadnienie podjętego tematu badawczego. Z pewnością jest to dobrze przygotowany materiał do opracowania wartościowego artykułu przeglądowego.

Materiały i Metody

Bardzo poprawne opracowanie stosowanych metod badawczych. Ich „wielość" wynika z dbałości Doktoranta o bardzo szczegółowe przedstawienie złożonego warsztatu eksperymentalnego, który został zaangażowany w realizację celów pracy. Przyjęty przez Autora sposób prezentacji zarówno materiałów jak i stosowanych metod ułatwia ocenę ich poprawności, jednocześnie, podczas analizy wyników, umożliwia ich odnalezienie i skonfrontowanie z wynikami.

Wyniki

Pozytywnie oceniam rozdzielenie przedstawienia „wyników" od „dyskusji". Przy stosunkowo złożonym i trudnym aparacie pojęciowym jest to zdecydowanie korzystne rozwiązanie, sprzyjające klarowności prezentacji.

Doktorant otrzymał trzy aptamery wykazujące istotny efekt inhibitorowy: A10.a.1 specyficznie hamuje aktywność ADAM10, A10.d.6 i A17.e.5 są bispecyficzne: hamują aktywność ADAM10 i ADAM17. Dla wyselekcjonowanych aptamerów oznaczył szereg parametrów charakteryzujących ich właściwości biologiczne, jak np.: IC50, Kd i Koff, uwalnianie substratów, migracje komórek, zaproponował strukturę II - i III-rzędową i inne.

Przedstawione wyniki są solidnie dokumentowane wykresami, a analiza jest przedstawiona rzeczowo.

Dyskusja

W rozdziale *Dyskusja*, Pan mgr Jarosław Jucha trafnie i krytycznie omówił efekty swojej pracy badawczej. Z uznaniem pragnę podkreślić samokrytycyzm i sceptyzym Doktoranta w ocenie własnych wyników. Bardzo cenne jest zwrócenie uwagi na niemożność zastąpienia, np. inhibitorów niskocząsteczkowych przez wydzielone aptamery, bowiem ich specyficzność, czas interakcji czy też trwałość nie wykazują istotnych zalet [przewagi] jakościowej.

Literatura

Bibliografia obejmuje 534 pozycji! Cytowane publikacje są bardzo trafnie i wyczerpująco dobrane; to prace doświadczalne i artykuły przeglądowe literatury światowej, opublikowane w ostatnich 20. latach. Jednakże można mieć wątpliwości, czy Doktorant zgłębił i przeanalizował wszystkie cytowane prace. Doktorant nie wyróżnił w rozprawie swojego dorobku, osiągnięć naukowych, dokonanych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej. W spisie literatury jest jedna pozycja współautorstwa Doktoranta [poz. 109, z 2009 r.]. Jednocześnie zwraca uwagę fakt, że wśród ponad 500 pozycji cytowanych jest jedynie 5 prac polskich [poz. 109, 183, 197, 216, 238], a wszystkie są z pracowni macierzystej.

Komentarze i uwagi krytyczne

Pan mgr Jarosław Jucha jest współautorem 3 publikacji w bardzo dobrych, wysoko notowanych czasopismach [Cytokine, PLoS One, Scientific Reports] oraz 2 zgłoszeń patentowych [jedno Patent Cooperation Treaty oraz kolejne w Urzędzie Patentowym RP]. Oceniam to jako bardzo dobry dorobek naukowy sześcioletniego okresu doktoranckiego.

Na stronie 96 Autor zawarł bardzo ważne stwierdzenie „...(*ii*) ekspresję należy prowadzić w eukariotycznym systemie ekspresyjnym – wybrałem owadzi system ekspresyjny...". Zagadnienie to jest niezwykle istotne, wręcz podstawowe, oparte [zapewne] na wcześniejszych doświadczeniach Zespołu, jednakże nie zostały one poparte wynikami ani dyskusją. Będę zobowiązany za omówienie tego zagadnienia w trakcie obrony.

W mej ocenie w „Dyskusji" winno być także zawarte rozróżnienie jakie podobieństwa i różnice zachodzą pomiędzy: antysensowymi oligo, aptamerami, siRNA, mikrona oraz jakie są potencjalne walory aptamerów jako inhibitorów.

We wnioskach warto byłoby zawrzeć informacje [a także w „Dyskusji"] odnośnie do możliwości i zasadności, uzasadnienia decyzji wyboru wykorzystywania SELEX'u do tej

konkretnie selekcji wykonanej przez Doktoranta. Czy metoda SELEX to metoda przyszłości? Jakie są perspektywy tej techniki?

W „streszczeniu Autor zapowiada „...symulację tworzenia struktur drugo- i trzeciorzędowych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych...". Stosowane "narzędzia bioinformatyczne" są zreferowane w pracy [w rozdziale „metody"], jako wstawianie danych sekwencyjnych do programów komercyjnych, ogólnie dostępnych i wygenerowanie struktur wyższego rzędu. Proszę o wyjaśnienie.

Konkluzje recenzji

Otrzymane i omówione w pracy aptamery RNA zostały bardzo solidnie przetestowane i rzeczowo omówione. Na bazie uzyskanych wyników Pana mgra Jarosława Juchy uważam, że cel pracy został zrealizowany, aczkolwiek aptamery A10.a.1, A17.e.5. i A10.d.6 nie są jednoznacznie lepsze, a przez to nie są alternatywą [jako potencjalne leki] dla istniejących już inhibitorów niskocząsteczkowych, prodomen i przeciwciał monoklonalnych hamujących aktywność ADAM10 i/lub ADAM17. Nowego typu inhibitory białek ADAM10 i ADAM17 w formie aptamerów RNA zostały opracowane i scharakteryzowane, jednakże z przedłożonych danych nie wynika wyższość, szczególne zalety, innowacyjnego produktu. Warto jednocześnie podkreślić możliwość znalezienia wąskiej grupy pacjentów, dla których te preparaty mogą stanowić szansę. Należy zwrócić uwagę, że Doktorant przeprowadził testy aktywności inhibitorowej aptamerów tylko na jednym klonie (komórek całkowicie pozbawionych ekspresji *Adam17)*. Wyniki nie budzą wątpliwości, natomiast brak powtórzeń biologicznych stanowi istotne ograniczenie interpretacyjne. Natomiast jestem przekonany o zasadności planowanych dalszych kroków, czyli podjęcia modyfikacji wyselekcjonowanych aptamerów.

Jestem pełen uznania dla wykonanej przez Pana mgra Jarosława Juchę pracy, uzyskanych przez Niego wyników i w pełni uprawnionej ich interpretacji. Mogę z przyjemnością stwierdzić, że Pan mgr Jarosław Jucha w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanował bogaty, nowoczesny warsztat badawczy, który (jestem o tym przekonany) umożliwi kontynuację pracy naukowej w laboratoriach naukowych. Uzyskane przez Doktoranta wyniki zasługują na uwagę badaczy zajmujących się tą tematyką, ich interpretacja jest w pełni uprawniona, a cała rozprawa doktorska zasługuje na uznanie.

Chciałbym podkreślić z ogromnym uznaniem bardzo staranną stronę edytorską rozprawy. Autor posługuje się bardzo ładnie językiem polskim, poprawnie unika anglikanizmów i żargonu laboratoryjnego. Edycja rozprawy jest bez zarzutu. Drobne, zauważone przeze mnie usterki nie mają większego znaczenia dla wartości merytorycznej pracy.

Swoją wysoką ocenę rozprawy uzasadniam bardzo wysokim poziomem warsztatu naukowego, osiągniętymi wynikami i bardzo poprawną edycją przedłożonej rozprawy.

Wniosek końcowy

W świetle przedstawionej, pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej Pana mgra Jarosława Juchy, w tym szczególnie oryginalnej wartości naukowej, stwierdzam że oceniana praca doktorska spełnia wymagania Ustawy stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora i z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału o dopuszczenie Pana mgra Jarosława Juchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jak również przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Tomasz Twardowski