



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

Łódź, 4 września 2015

Prof. dr hab. Wanda M. Krajewska

O C E N A

pracy doktorskiej mgr. Mariusza Łukasza Hartmana

pt. „Molecular basis of the phenotype alterations of melanoma cells *in vitro*.

Molekularne podstawy zmian fenotypu komórek czerniaka *in vitro*”

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wpisuje się w nurt poszukiwań eksperymentalnych modeli badawczych mających zastosowanie zarówno w badaniach biologii i biologii molekularnej komórek nowotworowych, jak i skuteczności terapeutycznej nowych związków przeciwnowotworowych. Modelem badawczym pierwszego wyboru są linie komórkowe. Liczne dane literaturowe wskazują jednak, że komórki nowotworowe pochodzące od pacjentów i wywodzące się z nich linie komórkowe hodowane *in vitro* różnią się pod względem fenotypowym i genotypowym. Dodatkowo sytuację utrudnia fakt, że materiał nowotworowy *in vivo* reprezentuje sobą zróżnicowane klony komórek o odmiennym np. potencjale metastatycznym, a kluczową dla statusu nie tylko komórek patologicznych, jest ich zależność od czynników zewnątrzkomórkowych działających na zasadzie autokrynnej, parakrynnej i endokrynnej.

Czerniak jest jednym z nowotworów wykazujących tendencję do wzrostu wskaźnika zachorowalności. Zaliczany jest do najbardziej złośliwych nowotworów

człowieka. Charakteryzuje się występowaniem wczesnych i licznych przerzutów oraz zasadniczym brakiem podatności na chemio- i radioterapię. Ograniczenia terapii ukierunkowanej przeciwko zmutowanej np. kinazie BRAFV600E wynikają z nabywania oporności w efekcie zmian molekularnych prowadzących do reaktywacji zablokowanych ścieżek sygnałowych. Komórki czerniaka cechuje wyjątkowa zmienność w odpowiedzi na zmiany w mikrośrodowisku. Wobec stosunkowo mało poznanej biologii czerniaka i trwających poszukiwań skutecznych strategii terapeutycznych tego nowotworu problematyka badawcza dysertacji doktorskiej mgr. Mariusza Ł. Hartmana, dotycząca molekularnych podstaw zmian fenotypowych komórek czerniaka w hodowlach *in vitro*, jest wyjątkowo aktualna.

Praca doktorska mgr. M. Ł. Hartmana wykonana została w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Czyż, od wielu lat z sukcesem zajmującej się biologią molekularną czerniaka. Rozprawę doktorską stanowi pięć opublikowanych artykułów, których mgr M. Ł. Hartman jest współautorem. Dwa z nich to prace eksperymentalne opublikowane w latach 2014–2015 w znajdującym się w bazie *Journal Citation Reports* prestiżowym czasopiśmie *PLoS One* o 5-letnim współczynniku oddziaływania wynoszącym 3,702. Pozostałe trzy artykuły są anglojęzycznymi pracami przeglądowymi opublikowanymi również w indeksowanych czasopismach, tj. w *Journal of Investigative Dermatology* (5-letni IF 6,706), *Cancer Letters* (5-letni IF 4,958) oraz *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (5-letni IF 2,974) w latach 2012–2015. Wysoka, łączna wartość 5-letniego współczynnika wpływu prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi ponad 22 (wg bazy *Web of Science* z 4 września 2015), a liczba punktów MNiSW – 200 (wg listy MNiSW z 31 grudnia 2014). Udział mgr. M. Ł. Hartmana we współautorskich pracach składających się na rozprawę doktorską nie budzi wątpliwości. We wszystkich pięciu pracach mgr M. Ł. Hartman jest pierwszym autorem, co jednoznacznie wskazuje zarówno na Jego zaangażowanie w przeprowadzenie eksperymentów, jak i analizę literatury przedmiotu i przygotowywanie manuskryptów. Jak wynika z dokumentacji udział mgr. M. Ł. Hartmana w dwóch pracach eksperymentalnych wynosi odpowiednio 50% i 35%, a w trzech pracach przeglądowych – 50%, 60% i 60%. Przedstawiona dysertacja doktorska obok pięciu publikacji stanowiących jej podstawę, zawiera streszczenie w języku angielskim i polskim, 14-stronicowe

opracowanie w języku angielskim z podziałem na wstęp, omówienie i podsumowanie wyników, a także wykaz skrótów i symboli, informację o źródłach finansowania oraz o dorobku naukowym Doktoranta. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr M. Ł. Hartman poza pięcioma pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej jest współautorem siedmiu kolejnych artykułów, w tym czterech eksperymentalnych i trzech przeglądowych oraz siedmiu komunikatów zjazdowych prezentowanych na międzynarodowych konferencjach, a także autorem wykładu konferencyjnego.

Moja ocena dokonań naukowych mgr mgr. M. Ł. Hartmana pod kierunkiem prof. dr hab. M. Czyż jest bardzo wysoka. Merytorycznie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej nie budzą zastrzeżeń, czego najlepszym potwierdzeniem jest pozytywna ocena recenzentów i wydawców czasopism, w których zostały opublikowane. Badania prawidłowo zaplanowano i zrealizowano za pomocą nowoczesnych, zaawansowanych technik badawczych, a uzyskane wyniki właściwie zinterpretowano. Celem pracy była morfologiczna i molekularna charakterystyka wyprowadzonych z materiału od pacjentów komórek czerniaka rosnących *in vitro* w monowarstwach oraz w strukturach sferoidalnych (melanosferach) lub w formie agregatów, w kontekście fenotypu wyjściowego nowotworu i odpowiedzi na zmiany w mikrośrodowisku. Badania realizowano na komórkach rosnących w obecności surowicy oraz na podłożu dla embrionalnych komórek macierzystych zawierającym czynnik wzrostu naskórka EGF i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF i stymulowanych surowicą. Poszukując odpowiedzi na postawione pytania przeprowadzono szeroko zakrojone analizy wykorzystując techniki Real-time PCR, Western blot, ELISA, mikromacierzy, cytometrii przepływową, mikroskopii fluorescencyjnej, transfekcji komórek siRNA, migracji i inwazji komórek na podłożu Matrigel. Biorąc pod uwagę wykorzystywanie komórek rosnących *in vitro* do testowania nowych związków o potencjale terapeutycznym bardzo istotnym elementem pracy są badania na linii komórkowej prawidłowych melanocytów naskórka (NHEM).

Do najważniejszych przedstawionych w pracy doktorskiej wyników badań nad wpływem warunków hodowli *in vitro* na właściwości komórek czerniaka należy wykazanie, że:

1. Komórki czerniaka rosnące w podłożu dla embrionalnych komórek macierzystych zawierającym czynniki wzrostu EGF i bFGF pod względem

fenotypu i genotypu są bliższe guzom pierwotnym niż komórki rosnące w monowarstwie w obecności surowicy.

2. Heterogenność subpopulacji w guzie pierwotnym, powoduje, że wywodzące się z nich komórki czerniaka rosną *in vitro* w obecności czynników wzrostu EGF i bFGF w formie agregatów lub melanosfer różniących się pod względem morfologicznym i molekularnym.
3. Zmiana warunków wzrostu, tj. zastąpienie surowicą podłoża wzbogaconego w czynniki wzrostu EGF i bFGF prowadzi do uruchomienia mechanizmów warunkujących funkcje życiowe komórek czerniaka, co manifestuje się przejściowymi zmianami ekspresji czy aktywności białek antyapoptotycznych BCL-XL i MCL-1 oraz białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału, tj. czynnika transkrypcyjnego MITF i kinazy ERK1/2.
4. Modulatorami adaptacji komórek czerniaka, które można uznać za markery odpowiedzi na zmiany w mikrośrodowisku są: czynnik transkrypcyjny MITF regulujący ekspresję wielu genów, w tym zaangażowanych w melanogenezę oraz białko DKK1 będące inhibitorem szlaku sygnalizacyjnego WNT/ β -katenina.

Lektura artykułów prezentujących wyniki badań własnych nasuwa następujące pytania:

- czy w przypadku hodowli komórek czerniaka *in vitro* obserwuje się zmniejszoną zdolność do proliferacji w czasie, a więc czy ma miejsce zjawisko senescencji i związane z nim zmiany na poziomie molekularnym
- jakie mechanizmy mogą leżeć u podstaw zróżnicowanego tempa proliferacji komórek rosnących w melanosferach i agregatach
- czy zróżnicowanie molekularne komórek czerniaka rosnących *in vitro* może być związane ze zróżnicowanym stopniem melanizacji
- w jaki sposób można wytłumaczyć wyższy potencjał metastatyczny komórek rosnących w monowarstwach w porównaniu z komórkami rosnącymi w melanosferach.

Polemizowałabym z określeniem cyt. „tkanka guza” (str. 6), jakkolwiek wynika ono z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego. Zgodnie z przyjętą nomenklaturą tkanka to zespół komórek o podobnej budowie i wyspecjalizowanej funkcji, czego o guzach nowotworowych zawierających subpopulacje komórek

różniących się fenotypowo i genotypowo, nie spełniających funkcji komórek i tkanek ulegających transformacji nowotworowej, chyba nie można powiedzieć.

W skład pracy doktorskiej obok dwóch prac zawierających oryginalne wyniki badań wchodzi trzy prace poglądowe, w których w kompetentny sposób przedstawiono aktualny stan wiedzy odnośnie do 1°kluczowego dla melanocytów i fenotypu komórek czerniaka czynnika transkrypcyjnego MITF i regulowanych przez niego genów jako potencjalnych celów chemioterapii, 2°białek antyapoptycznych z rodziny BCL-2 i inhibitorów apoptozy IAP, których zaburzenia prowadzą do uruchamiania mechanizmów utrzymujących funkcje życiowe komórek czerniaka zapobiegając ich śmierci i 3°białek proapoptycznych z rodziny BH3-only i znaczenia ich naturalnych i syntetycznych mimetyków dla efektywności terapii przeciwnowotworowej. Włączone do pracy doktorskiej prace przeglądowe świadczą o rzetelnej i szerokiej wiedzy Doktoranta. Z punktu widzenia spójności tematycznej nie znajduję specjalnego uzasadnienia dla włączenia do rozprawy doktorskiej artykułu traktującego o białkach proapoptycznych BH3-only i jego mimetykach w terapii nowotworów.

Podsumowanie

Praca doktorska mgr. Mariusza Łukasza Hartmana pt. „Molecular basis of the phenotype alterations of melanoma cells *in vitro*. Molekularne podstawy zmian fenotypu komórek czerniaka *in vitro*” wnosi oryginalne dane dotyczące komórkowych modeli badawczych czerniaka. Uzyskane wyniki mają nowatorski charakter, są znaczące poznawczo i inspirują do stawiania kolejnych wyzwań badawczych. Wskazują jak trudnym i wymagającym modelem badawczym są hodowle komórkowe, a w szczególności wyjątkowo podatne na zmiany w mikrośrodowisku hodowle komórek czerniaka. Stworzenie właściwych eksperymentalnych modeli badawczych jest warunkiem *sine qua non* dla rozwoju nowych, skuteczniejszych terapii nie tylko w przypadku chorób nowotworowych. Wartość poznawczą wyników zawartych w pracy doktorskiej potwierdza fakt ich opublikowania w formie dwóch obszernych prac oryginalnych w międzynarodowym czasopiśmie *PLoS One* o 5-letnim współczynniku oddziaływania 3,702.

Rozprawę doktorską mgr. Mariusza Łukasza Hartmana oceniam w pełni pozytywnie, jako spełniającą wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule

naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.; D.U. z 22 grudnia 2014, poz. 1852, tekst jednolity). Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr. Mariusza Łukasza Hartmana do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników stawiam wnioszek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

