

Gdańsk, 20.01.2020

Dr hab. Patrycja Koszałka  
Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Tel.: +48 58 3491410  
E-mail: [pkosz@gumed.edu.pl](mailto:pkosz@gumed.edu.pl)

**Instytut Biotechnologii Medycznej  
i Onkologii Doświadczalnej**  
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej**

**zatytułowanej "Mechanizmy aktywności przeciwczerśniakowej analogu geldanamycyny stosowanego samodzielnie lub w skojarzeniu z inhibitorami szlaku RAS/RAF/MEK",**

**wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Małgorzaty Czyż**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej jest oryginalnym opracowaniem, którego przedmiotem była analiza wpływu 17-aminogeldanamycyny, inhibitora białka szoku cieplnego HSP90 na linie komórkowe izolowane z ludzkich czerniaków, zwłaszcza na szlak odpowiedzi na niesfałdowane białka oraz na odpowiedź przeciwnowotworową w skojarzeniu z inhibitorami szlaku MAPK.

Mgr Mielczarek-Lewandowska w swojej pracy porusza kilka ważnych problemów naukowych posługując się cennym materiałem badawczym, jakim są linie czerniaków pozyskanych od pacjentów klinicznych. Pierwszym takim problemem badawczym jest konieczność opracowywania nowych strategii terapeutycznych w przypadku czerniaków. W przypadku agresywnej formy tego nowotworu, jedynie terapia celowana lub immunoterapia daje nadzieję na dłuższe przeżycie chorych, jednakże nie zawsze są one efektywne. Maszyna białek opiekuńczych, zwłaszcza HSP90, jest kluczowa w przemianach białek regulatorowych krytycznych dla funkcji komórkowych, włączając w to proliferację, różnicowanie i przeżycie. Odkryta w 1970 roku geldanamycyna, mogłaby odgrywać ważną rolę terapeutyczną jako inhibitor HSP90, gdyby nie jej problematyczne właściwości farmakologiczne i profil toksyczności. Jej analog 17-AAG był pierwszym inhibitorem HSP90, który wszedł do prób klinicznych, ale wykazał jedynie ograniczoną efektywność. Recenzowana praca przedstawia szczegółową analizę skuteczności oraz mechanizmu działania analogu geldanamycyny, jakim jest 17-aminogeldanamycyna. Wskazanie podwyższonej efektywności tego analogu w stosunku do czerniaków zarówno z najpopularniejszą mutacją BRAF jak i z mutacją NRAS wskazuje na potencjalnie szeroką możliwość stosowania tego związku. Natomiast szczegółowe opisanie mechanizmów działania tego analogu zarówno na szlak kinaz MAP jak i na szlak UPR przedstawione w tej pracy jest niezwykle ważne, ponieważ określenie miejsca działania danego związku pozwala na zorientowanie się czy możliwe jest zastosowanie tego związku w terapii skojarzonej z innymi lekami. Wiąże się to z drugim, niezwykle ważnym problemem badawczym jakim jest dość szybka indukcja oporności na terapię celowaną, wiązana z akumulującymi się zmianami genetycznymi w genach kodujących białka w szlaku kinaz MAP powyżej miejsca inhibicji a także z epigenetycznymi zmianami regulatorów spoza szlaków MAP i/lub AKT, pozwalającymi na

obejście punktu inhibicji. Doktorantka wykazała, że 17-aminogeldanamycyna wzmacnia efekt proapoptotyczny inhibitorów BRAF i MEK, co wskazuje na jej potencjalne zastosowanie w terapiach skojarzonych. Wskazała także potencjalny marker molekularny, który może być wskaźnikiem oporności na ten typ terapii, a mianowicie białko XBP1s. Wskazała także na potencjał analogu geldanamycyny do wzmocnienia inhibitorów stosowanych w przypadku mutacji NRAS. Jest to bardzo cenne, ponieważ, mimo że ta mutacja występuje u 1/5 pacjentów, to terapie celowane w jej przypadku charakteryzują się niską skutecznością. Większość wyników tej pracy została już opublikowana w renomowanym czasopiśmie o IF=4,021 i zacytowana.

Dlatego też z chęcią przystąpiłam do dokładnej lektury przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Niestety, mimo dużej wartości merytorycznej tej pracy musiałam w trakcie jej lektury zmierzyć się z pewnymi rozczarowaniami zarówno ze strony formalnej jak i merytorycznej.

Prezentowana do oceny rozprawa doktorska ma 111 stron obejmujących 22 ryciny i trzy tabele. Praca podzielona jest na 3 części, gdzie część pierwsza zatytułowana SPIS TREŚCI poza spisem treści zawiera także listę publikacji i komunikatów naukowych autorki, wykaz skrótów, spisy rycin i tabel oraz streszczenie. Część druga to CZĘŚĆ TEORETYCZNA, która jest standardowym wstępem. Część trzecia nazwana jest CZĘŚCIĄ DOŚWIADCZALNĄ i zawiera założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i końcowe wnioski oraz spis literatury. Jest to dość nietypowy układ i jego zastosowanie nie ma tutaj żadnego uzasadnienia.

Umieszczenie w pracy zarówno **listy publikacji autorki** jak i **listy komunikatów naukowych** jest bardzo dobrym pomysłem i powinno być standardem w rozprawach doktorskich.

**Spis treści** ma dobry układ graficzny i jest łatwy do przeszukania.

**Wykaz stosowanych skrótów** jest imponujący i liczy 7 stron. Jednak mgr Aleksandra Mielczarek-Lewandowska nie ustrzegła się od pewnych uchybień, takich jak np. 1) opisanie białka PMEL jako białko melanocytów a nie zgodnie z wersją angielską jako białko premelanosomów, 2) utworzenie mieszanki angielsko-polskiej „białko wiążące X-box-1” zamiast „białko 1 wiążące kasetę X”. Dodatkowo brak było pewnej spójności, ponieważ jeśli podaje się rozwinięcia skrótów w języku angielskim, to należy je podać do wszystkich skrótów a nie jedynie do większości. Nie wszystkie skróty zostały też w nim uwzględnione np. PFS (czas przeżycia bez progresji), OS (całkowity czas przeżycia) i NTD (domena N-terminalna). Są one wyjaśnione w tekście, ale skoro w spisie skrótów są ATP i ADP, to te skróty też powinny się tam znaleźć. Największym problemem było jednak dla mnie to, że częściowo spis skrótów był używany jako słownik definicji, ponieważ niektóre skróty były rozwijane samym opisem funkcji danego białka jak w przypadku IRE1 $\alpha$  i BCL-2 albo opis funkcji był dopisywany do rozwinięcia skrótów, jak w przypadku PVDF, PD-1 lub CTLA-4. W dalszej części tej pracy prowadziło to do irytującego zjawiska jakim jest używanie skrótów białek w tekście bez wyjaśniania ich funkcji np. „Jedną z metod leczenia czerniaka jest immunoterapia wykorzystująca inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego, które mogą wiązać się do PD-1 lub CTLA-4.” Dopiero zajrzenie do spisu skrótów, gdzie wyjaśniona jest funkcja tych białek umożliwia zrozumienie punktu uchwytu tych inhibitorów.

**Spisy rycin i tabel** są prawidłowo wykonane, łatwe do przeszukania.

**Streszczenie** jest trudnym elementem. W tej rozprawie, mgr Mielczarek-Lewandowska doskonale sobie z nim poradziła, jest krótki, jasny i spójny. Drobnym zgrzytem jest brak wyjaśnienia skrótów przy ich pierwszym użyciu, co wymaga odnoszenia się do spisu skrótów już od samego początku pracy.

**Wstęp**, a właściwie **Część teoretyczna**, jak został tutaj nazwany *de facto* wstęp, liczy 26 stron, czyli o 3 strony więcej niż rozdział z wynikami pracy, oraz zawiera 5 z 22 rycin. Jest to część może trochę nadmiernie rozbudowana, ale wskazuje na bardzo dobrą i szeroką znajomość zagadnień bezpośrednio związanych z

tematyką pracy doktorskiej. Niestety jest ona trochę chaotyczna. Gdyby nie moja znajomość szlaku kinaz MAP, jego opis na drugiej stronie części teoretycznej byłby zbyt enigmatyczny, by zrozumieć w jakiej części szlaku uczestniczą opisywane białka i co oznacza ich mutacja dla sygnalizacji tego szlaku. Dokładny opis szlaku kinaz MAP oraz jego schemat pojawia się dopiero przy w jednym z dalszych rozdziałów. Chaotyczny jest przeskok od opisów mutacji BRAF do klasyfikacji histopatologicznej czerniaka w obrębie jednego paragrafu. Niezwykle ciekawy rozdział dotyczący terapii celowanych, napisany na podstawie najnowszych publikacji, jest w większości potraktowany mocno hasłowo, są to po prostu wypisane najciekawsze aspekty z dużej ilości publikacji w stylu „na takiej linii ta i ta osoba pokazała, że wzrost ekspresji tego białka a spadek ekspresji tego receptora wpływa na oporność, a na innej linii, zmiana w poziomie innego białka także wpływała na oporność, a w kolejnej linii zmiana w poziomie tego białka wiązała się ze zmienioną ekspresją kilku innych białek”. Brak tutaj jakiegokolwiek syntezy danych. Chciałabym, aby doktorantka postarała się przedstawić rozdział o terapiach celowanych w formacie graficznym, starając się dokonać syntezy danych. Dodatkowo, przedstawione informacje dotyczące efektywności kombinacji leków, byłoby znacznie ciekawsze, gdyby osoba nieznająca tych leków mogła się zorientować czego są one inhibitorami i co to oznacza dla funkcji szlaku kinaz MAP połączenie ich ze sobą. Przydałby się tutaj albo schemat, albo tabelka, tak jak to zostało przedstawione w publikacji oryginalnej z 2019 roku, której wyniki stanowią większość tej pracy. Przypominam, że nie jest to praca doktorska w formie tzw. „zszywki”, więc informacje takie powinny być zawarte w pracy.

W Części Doświadczalnej tej pracy, **Cele pracy** zostały sformułowane jako tzw. **Założenia i cele pracy**, gdzie pierwsza część stanowi stosunkowo długie jak na ten rozdział, bo na 1,5 strony wprowadzenie historyczno-merytoryczne, przez co ogólny cel pracy jest trochę rozmyty. Natomiast cele szczegółowe zostały sformułowane krótko, jasno i w sposób niebudzący żadnych wątpliwości merytorycznych.

Rozdział **Materiały i metody** liczy 13 niezbyt gęsto zapisanych stron. Rozdział ten w każdej pracy doktorskiej stanowi ważny wkład do zbioru metod stanowiących bazę naukową zakładu, w którym praca została wykonana oraz łatwe do odszukania repozytorium wiedzy praktycznej dla innych naukowców. Jednakże w tym przypadku został on potraktowany niezwykle pobieżnie. Metody są opisane bardzo skrótowo, wypisane jest jedynie co zmieszano z czym i ile czasu to trwało. Przy metodach takich jak ocena proliferacji, liczby żywych komórek i analiza cytometryczna komórek apoptotycznych brak jakichkolwiek informacji o podstawowych założeniach testu i tak naprawdę na czym polegał odczyt wyniku.

Brak też ważnych informacji, takich jak metoda pasażowania linii czerniaka (co może mieć wpływ na wyniki dalszych doświadczeń) jak i o długości fal przy odczycie absorbancji zarówno w testach żywotności jak i przy pomiarze stężenia RNA, choć jest podana przy pomiarze stężenia białek.

W opisie metod ważne jest także pochodzenie odczynników, ponieważ wiele związków, jak np. czynniki wzrostu w zależności od pochodzenia mogą różnić się zarówno stopniem oczyszczenia jak i jakością, albo i składem, jak w przypadku surowicy. Dlatego też ograniczenie opisu materiałów jedynie do analizowanych w pracy badawczej związków czynnych jest tutaj problematyczne. Tylko kilka wybranych odczynników ma podanych producenta w opisach metod, głównie stosowane kity. Najbardziej problematyczne jest to, że opis przeciwciał zawiera jedynie informację o antygenie, rozcieńczeniu przeciwciała i nazwę firmy. Nie zawiera informacji czy są to przeciwciała poli- czy monoklonalne ani w jakim zwierzęciu uzyskane, brak też numerów katalogowych, co właściwie uniemożliwia zidentyfikowanie działających i przetestowanych w tej pracy przeciwciał. Poważnym niedoborem jest także brak opisu linii komórkowych użytych jako modelu badawczego. W Materiałach i metodach podane jest jedynie, że używane w projekcie linie DMBC pochodzą od pacjentów. Nazwy tych linii, DMBC 21, 22, 28 i 29 pojawiają się jedynie w spisie skrótów (choć DMBC12 już nie) a potem dopiero już w **Wynikach**. Wprowadźcie w **Wynikach**





doktorantka wskazuje, jaki typ mutacji występuje w danych liniach albo w tekście, albo w tytule, jednak nigdzie nie ma pełnej charakterystyki tych linii. Prosiłabym, aby mgr Mielczarek-Lewandowska przedstawiła dane dotyczące pochodzenia tych linii jak np. stopień zaawansowania nowotworów, z których pochodziły czy też wiek i płeć pacjentów, a także czy wcześniej stosowana była jakaś terapia w stosunku do tych pacjentów (czyli czy doszło do zmian w komórkach nowotworowych indukowanych terapią mogących prowadzić do oporności na terapię). Wszystkie te aspekty są ważne w ocenie skuteczności leków.

Część ta mimo niedoborów spełnia swoje podstawowe zadanie, czyli ułatwia zrozumienie podłoża metodycznego uzyskanych wyników.

Jest jednak jeden poważny problem merytoryczny, a mianowicie zastanawia mnie, dlaczego analizowane związki były dodawane na płytkę testową w 2,5 godz. po naniesieniu komórek do dołków tych płytek. W przypadku linii przylegających analizowane związki zwykle podawane są następnego dnia, po przylegnięciu komórek do podłoża. Cechą charakterystyczną nowotworów jest ich oporność na anoikis, śmierć indukowaną utratą kontaktu z podłożem lub nieprawidłowym składem ECM. Pozwala to na przeżycie komórek przerzutujących po utracie kontaktu z podłożem, co aktywuje stres metaboliczny i oksydacyjny. Sygnalizacja BRAF-MEK chroni przed anoikis poprzez hamujący wpływ na proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2: Bad i Bim. Knockdown BRAF lub inhibicja MEK przywraca wrażliwość komórek czerniaka na anoikis, a efekt ten jest zależny od szlaku Akt. Aktywacja szlaku Akt jest zależna od substratu znajdującego się w podłożu, ponieważ sygnalizacja ta jest wzmacniana poprzez integryny oddziałujące z ECM. Grupa profesora Bermana wykazała niedawno, że deplecja podjednostki alfa2 integryny w czerniaku SK-MEL-147 indukuje anoikis, zwiększa ilość białek pro-apoptotycznych i obniża anty-apoptotycznych, redukuje aktywność kinazy ERK choć zwiększa także aktywność kinazy AKT. W momencie, gdy analiza wykonywana jest na komórkach, które nie przyległy, więc występują tu związane z tym zmiany w szlakach sygnalizacyjnych, w tym także szlakach związanych z przeżyciem komórek, może to znacząco wpływać na uzyskane wyniki. Proszę tutaj o wyjaśnienie.

Dodatkowym problemem jest tutaj zastosowanie trypsyny do zebrania komórek. Nie była ona wspomniana wprawdzie przy opisie pasażowania komórek, ale przy zbieraniu komórek do cytometrii i owszem. Z powodu proteolitycznej aktywności trypsyny białka powierzchniowe często ulegają odcięciu z błony komórkowej co prowadzi do zaburzeń funkcji komórek. Jak pokazały doświadczenia opublikowane w 2010 roku w Journal of Biomedical Science, zmiany te są widoczne od razu po trypsynizacji i utrzymują się jeszcze 8 godzin po niej, natomiast w większości zanikają po 24 godzinach. Chciałabym, żeby doktorantka ustosunkowała się do tego potencjalnego problemu.

**Wyniki** przedstawione na 23 stronach stanowią ciekawą i dość dobrze napisaną część pracy. Nic dziwnego, ponieważ jak już wspomniałam większość przedstawionych wyników została już opublikowana. W tej części pracy mgr Mielczarek-Lewandowska dość sprawnie prowadzi nas przez wyniki eksperymentów, wskazując ich logikę oraz dość jasno przedstawiając ich interpretację. Dość jasno, ponieważ czasami pojawiały się ciekawe "kwiatki" jak np. częściowo palindromiczny układ próbek WB na rycinach 16 i 17. A w przypadku małych wykresów linowych na rycinie 17 ciężko się zorientować co do przedstawianych wyników. Trochę większym problemem jest to, że wyniki analizy statystycznej nie są zaznaczone na wykresie ani omówione w tekście. Choć trzeba przyznać, że wiele wyników wskazuje na dosyć gwałtowne i znaczące biologicznie zmiany, przy niewielkich odchyleniach, więc nic dziwnego, że doktorantka pominęła wskazywanie różnic statystycznych. Niestety przy niektórych wynikach sprawia to problem, jak w przypadku ryciny 20. W tym przypadku chciałabym zobaczyć jakie są różnice statystyczne, zwłaszcza, że w przypadku „wykresu 20a” wygląda jakby dla 48 godzin był to wynik tylko pojedynczego badania, a w przypadku „wykresu 20c” odchylenia są bardzo znaczne.



Dodatkowo, zastanawia mnie, przedstawiony na wykresach 7 i 8, efekt analogu geldanamycyny w dawce 0,1  $\mu\text{M}$  na żywotność komórek, zwłaszcza linii DMBC28, przy jednoczesnym braku tego efektu na poziom aktywacji analizowanych kaspaz oraz znakowanie Aneksyną-V. Być może jest to różnica nieznaczająca statystycznie, choć nie jest to wskazane. Jeśli natomiast różnica jest znacząca statystycznie oznacza to, że związki te mogą w niższej dawce indukować albo inny typ śmierci albo efekt cytostatyczny. W obu przypadkach jest to ważne dla aspektu terapeutycznego tych leków, w szczególności druga możliwość. Czy było to analizowane?

**Dyskusja**, licząca 10 stron, jest najlepiej napisaną częścią tej pracy. Jest zgodna z tytułem pracy, napisana niezwykle ciekawie i logicznie. Doktorantka zacytowała najnowsze publikacje ściśle związane z tematem badawczym pracy wykazując się bardzo dobrą znajomością danych literaturowych oraz umiejętnie przedstawiła znaczenie uzyskanych poszczególnych wyników w szerszym kontekście. Wyraźnie widać tutaj wprawę w pisaniu prac przeglądowych. Nic dziwnego, gdyż mgr Mielczarek-Lewandowska jest pierwszym autorem dwóch prac przeglądowych w renomowanych czasopismach naukowych (IF=3,42 i IF=4,021) (w pierwszym przypadku *ex aequo*).

Rozdział **Wnioski**, jest jasnym i klarownym podsumowaniem pracy.

Rozdział **Literatura**, czyli spis bibliografii zawiera 197 pozycji i tak jak zaznaczałam już wielokrotnie, są dobrze dobrane, w większości najnowsze pozycje literaturowe.

W pracy pojawia się tylko kilka literówek np. „akspresji BIM”, „charaketrystyczny”, „zwiększoną”, choć są to słowa, które edytor tekstów jest w stanie wychwycić i podkreślić.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa, mimo pewnych niedociągnięć, pokazuje, że Doktorantka potrafi sformułować rzetelne hipotezy badawcze i zweryfikować je odpowiednimi metodami, co wskazuje na jej zdolność do samodzielnego podjęcia pracy badawczej w przyszłości. W związku z czym, stwierdzam, że **przedstawiona rozprawa spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Patrycja Koszałka

Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii UG-GUMed  
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI I  
IMMUNOLOGII  
*P. Koszałka*  
dr hab. Patrycja Koszałka

