



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Łódź, 07. 01. 2020 r.

Dr hab. Anna Krześlak
Katedra Cytobiochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź
tel: +48 42 635 43 35
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej pt. „Mechanizmy aktywności przeciwczerśniakowej analogu geldanamycyny stosowanego samodzielnie lub w skojarzeniu z inhibitorami szlaku RAS/RAF/MEK”

Terapia celowana jest obecnie jedną z najskuteczniejszych metod w leczeniu nowotworów, w tym również czerniaka. Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej możliwe jest określenie profilu molekularnego choroby oraz zdefiniowanie potencjalnego celu terapii przeciwnowotworowej. Jednak plastyczność komórek rakowych oraz heterogenność nowotworów sprawia, że są one często zdolne do przewyciężenia lub obejścia inhibicji jednego specyficznego szlaku i często okazuje się, że stosowane związki tak bardzo obiecujące na etapie badań przedklinicznych, nie spełniają pokładanych w nich nadziei. Zastosowanie w leczeniu czerniaka inhibitorów ukierunkowanych na konstytutywnie aktywny szlak MAPK, takich jak wemurafenib i dabrafenib zwiększyło istotnie czas przeżycia pacjentów z czerniakiem przerzutującym z mutacjami BRAF w porównaniu z wcześniej stosowanymi terapiami. Jednak pomimo tego, że inhibitory te dość dobrze hamują rozwój choroby w początkowym okresie ich stosowania, z czasem rozwija się oporność na leki. Dlatego przy

opracowywaniu nowego potencjalnego leku ważne jest aby określić dokładny mechanizm jego działania a także poszukać możliwych kombinacji z innymi związkami, które mogłyby wzmacniać jego działanie poprzez hamowanie współdziałających lub alternatywnych szlaków oraz zapobiegać oporności. Praca doktorska mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej wpisuje się w nurt takich badań.

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej przeprowadzono ocenę proapoptotycznej aktywności 17-aminogeldanamycyny (AG) w komórkach czerniaka oraz podjęto próbę określenia mechanizmu działania tego związku poprzez ocenę jego wpływu na ekspresję i aktywność elementów szlaku odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR). Ponadto Autorka dokonała oceny efektywności przeciwnowotworowej 17-aminogeldanamycyny stosowanej w kombinacji z wykorzystywanymi w leczeniu czerniaka inhibitorami szlaku MAPK.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią liczącą 111 stron. Praca ma klasyczny układ i zawiera część teoretyczną oraz doświadczalną, na którą składają się następujące rozdziały: założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Oprócz tego praca zawiera wykaz stosowanych skrótów, spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo i streszczenie. Zatem praca pod względem formalnym nie budzi zastrzeżeń.

W części teoretycznej Doktorantka przedstawiła w przystępny sposób podstawowe informacje na temat czerniaka, tj. dane dotyczące epidemiologii czerniaka, klasyfikacji, przyczyn powstawania oraz metod leczenia. Ponadto Doktorantka omówiła strukturę białka HSP90 oraz jego rolę w regulacji fałdowania i dojrzewania białek oraz znane inhibitory białka HSP90 o potencjale terapeutycznym. Część teoretyczna napisana jest w sposób syntetyczny i klarowny. Nie mam właściwie większych zastrzeżeń poza dwiema drobnymi uwagami. Po pierwsze zabrakło mi pewnego podsumowania w części teoretycznej informacji dotyczących analogów geldanamycyny. Wydaje mi się, że cenne byłyby informacje, które w jakiś sposób umiejscowiły by 17-aminogeldanamycynę na tle innych ansamycynowych inhibitorów HSP90, których aktywność, jak sama Autorka napisała, została szeroko zbadana w komórkach czerniaka. Ponadto moje drobne zastrzeżenie budzi niezręczne sformułowanie używane w całej pracy „współpraca między lekami” (np. strona 44. „pochodne geldanamycyny współpracują z innymi lekami”). Określone związki mogą wzmacniać efekty powodowane przez inne leki wykazując działanie synergistyczne. „Współpraca” według mnie nie jest w tym przypadku dobrym określeniem ponieważ wskazuje na zamierzone działanie. Ale jest to oczywiście tylko uwaga lingwistyczna.

W rozdziale **Materiały i metody** zawarto niezbędne informacje na temat stosowanych odczynników i procedur. Praca nie jest zbyt rozbudowana metodycznie, ale zastosowane metody okazały się w pełni wystarczające do określenia wpływu 17-aminogeldanamycyny (AG) na żywotność, proliferację i apoptozę komórek czerniaka. Doktorantka zastosowała następujące metody: mikroskopowe i kolorymeryczne testy oceniające żywotność i proliferację komórek oraz aktywność kaspaz, analizę cytometryczną komórek apoptotycznych i nekrotycznych znakowanych mieszaniną Aneksyna V/jodek propidyny, RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz Western blotting. Ponadto do oceny względnej ilości białek identyfikowanych metodą Western blotting zastosowano analizę densytometryczną. Doktorantka opracowywała wyniki stosując analizy statystyczne. Do oceny istotności statystycznej otrzymanych wyników wykorzystano testy: t-Studenta, test Mann-Whitney'a oraz ANOVA. Niestety w żadnym miejscu, ani w opisie metod ani później podczas omawiania wyników Autorka nie wspomina, które testy zastosowała do których analiz i dlaczego.

Zasadniczą część pracy stanowią oczywiście **Wyniki**, które przedstawione zostały w sposób bardzo syntetyczny na 17. rycinach. W pracy Doktorantka wykorzystowała 5 linii komórkowych czerniaka wyprowadzonych przez pracowników Zakładu Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z pobranego od pacjentów podczas operacji materiału klinicznego. W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka stwierdziła, że 17-aminogeldanamycyna:

- indukuje apoptozę w komórkach czerniaka skuteczniej niż geldanamycyna;
- hamuje cytoprotekcyjny szlak IRE1 α -XBP1s związany z odpowiedzią komórek na niesfałdowane białka (UPR);
- indukuje apoptozę w sposób niezwiązany ze szlakami zależnymi od PERK oraz p53/BIK;
- szybciej i efektywniej indukuje apoptozę w komórkach czerniaka stosowana w skojarzeniu z inhibitorami szlaku MAPK.

Do rozdziału **Wyniki** mam kilka uwag i pytań. Moim zdaniem w opisie metod i wyników zabrakło informacji dotyczących sposobu wyboru stężeń związków użytych do traktowania komórek. Doktorantka wybrała dwa stężenia geldanamycyny oraz jej analogu (0,1 μ M i 0,4 μ M), a w przypadku inhibitorów szlaku MAPK po jednym (50 nM TRA i 5 μ M PLX). Czym podyktowany był wybór tych konkretnych stężeń? Mam pewne zastrzeżenia do sposobu przedstawienia wykresów. Niektóre z nich są mało czytelne szczególnie jeśli na danym wykresie znajduje się wiele krzywych, których kolory i znaczniki są do siebie podobne, np. Ryc.

17. Ponieważ praca ma charakter monografii i nie było żadnych ograniczeń co do wielkości rysunków czy objętości pracy, uważam, że niektóre wykresy mogłyby być lepiej przedstawione. Ponadto, na kilku wykresach nie zaznaczono istotności statystycznych ani nie podano sposobu ich określenia, np. na Ryc. 8. Dlatego nasuwa się pytanie np. czy niewielka różnica w absorbancji podczas pomiaru aktywności kwaśnej fosfatazy między komórkami kontrolnymi a traktowanymi 17-aminogeldanamycyną w przypadku komórek DMBC12 jest istotna statystycznie? Albo czy jest istotna różnica w przypadku komórek DMBC29 traktowanych różnymi stężeniami AG? Podobnie na Rycinie 20 nie zaznaczono na wykresach istotności statystycznej.

Na Rycinie 13 przedstawiono wyniki immunodetekcji ATF6 w komórkach kontrolnych i traktowanych 17-aminogeldanamycyną. Autorka sugeruje, że jest to jądrowa forma ATF6, nie wskazuje jednak na jakiej podstawie. Ponadto, Doktorantka stwierdza, że AG nie wpływa znacząco na ATF6 w komórkach czerniaka. Na Rycinie 13. przedstawiono jednak tylko jednostkowy wynik, na którym można się dopatrzeć pewnych różnic ilościowych. Czy nie należałoby przeprowadzić takiej analizy wielokrotnie a następnie wyniki analizy densytometrycznej przedstawić w formie średnich, co pozwoliłoby bardziej jednoznacznie określić czy obserwowane różnice są faktycznie nieistotne. To samo dotyczy wyników zamieszczonych na Rycinie 14. dotyczących wpływu AG na poziom białka p53.

W rozdziale **Dyskusja** Autorka interpretuje wyniki własnych badań i odnosi je do danych dostępnych w literaturze. W mojej opinii dyskusja jest szeroka i bardzo dobrze napisana. Jej ważne uzupełnienie stanowi schemat, przedstawiający w sposób graficzny model sugerujący mechanizm synergistycznego działania 17-aminogeldanamycyny oraz trametinibu i wemurafenibu. Nie mam do tej części pracy uwag krytycznych. Uważam, że sposób w jaki Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki wskazuje na jej bardzo dobrą znajomość tematyki i umiejętność analizy i syntezy informacji naukowych

Pracę kończy Doktorantka przedstawieniem 6 wniosków. W mojej opinii rozdział ten ma bardziej charakter podsumowania wyników niż faktycznych wniosków. Wydaje mi się, że Autorka mogłaby ograniczyć się do przedstawienia tylko np. 2 wniosków o bardziej ogólnym charakterze, z których jeden dotyczyłby udziału 17-aminogeldanamycyny w mechanizmach związanych z indukcją apoptozy, a drugi jej efektywności w skojarzeniu z inhibitorami MAPK. Pragnę zaznaczyć, że moja uwaga dotyczy głównie sformułowania wniosków a nie ich treści i poddaję to pod dyskusję.

Uzyskane w pracy wyniki w większości zostały już opublikowane w artykule w bardzo dobrym czasopiśmie (*Apoptosis* 2019, 24 (7-8) 596-611; IF 4,021; 100 pkt MNiSW). Mam jednak w związku z tą publikacją drobną uwagę. We wspomnianym artykule Pani mgr Aleksandra Mielczarek-Lewandowska jest pierwszym autorem, co niewątpliwie wskazuje na jej znaczący udział w tej pracy, ale artykuł jest wieloautorski (oprócz promotora i promotora pomocniczego jest jeszcze dwóch innych autorów). Ponieważ wyniki i sposób ich opracowania w artykule i pracy doktorskiej w znacznej mierze pokrywają się, dobrze byłoby przedstawić oświadczenia współautorów o wyrażeniu zgody na wykorzystanie tych wyników w pracy doktorskiej, ewentualnie określające ich dokładny udział w pracy. Domyślam się, że udział pozostałych Autorów nie był związany bezpośrednio z uzyskaniem przedstawionych w monografii wyników oraz ich opracowania, ale nie jest to jednoznacznie określone.

Podsumowując, pomimo pewnych uwag krytycznych, bardzo pozytywnie oceniam rozprawę doktorską pani mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej. Pragnę zaznaczyć, że przedstawione uwagi krytyczne odnoszą się głównie do sposobu prezentacji wyników czy wniosków i nie umniejszają oceny merytorycznej pracy. Na wysoką wartość merytoryczną pracy niewątpliwie składają się dobrze zaplanowane i konsekwentnie przeprowadzone badania. Autorka w swojej rozprawie przedstawiła wyniki oryginalnych badań, które mają dużą wartość poznawczą, a w przyszłości być może też aplikacyjną.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej zatytułowana „Mechanizmy aktywności przeciwczerśniakowej analogu geldanamycyny stosowanego samodzielnie lub w skojarzeniu z inhibitorami szlaku RAS/RAF/MEK” stanowi cenny wkład w poznanie mechanizmów działania 17-aminogeldanamycyny oraz jej skuteczności przeciwnowotworowej i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13, ust. 1 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.). Wnoszę więc o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Mielczarek-Lewandowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Dr hab. Anna Krześlak, prof. UŁ