



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2020-07-07

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
Zakład Onkologii Doświadczalnej

Recenzja rozprawy doktorskiej
wykonanej przez mgr Ewelinę Dratkiewicz
pt. **„Inhibitory EGFR i c-Met jako czynniki ograniczające powstawanie
inwadopodiów w komórkach ludzkiego czerniaka”**

w Zakładzie Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem promotora dr hab. Doroty Nowak, prof. UW
oraz promotora pomocniczego dr Aleksandry Simiczyjew

W recenzowanej pracy doktorskiej zostały poruszone bardzo istotne zagadnienia dotyczące niepowodzenia terapii skierowanych przeciwko inwazyjnym czerniakom. Autorka skupiła się na tych aspektach, które dotyczą bezpośrednio zdolności komórek czerniaka do migracji, a tym samym do jego inwazyjnego wzrostu i przerzutowania, co na poziomie molekularnym regulowane jest m.in. przez czynniki wzrostu aktywujące szlaki sygnałowe regulujące właśnie takie procesy jak proliferacja czy zdolności komórki do migracji. Autorka słusznie założyła (na podstawie analizy dostępnych danych z badań przedklinicznych i klinicznych), że zahamowanie szlaku sygnałowego od pojedynczego czynnika wzrostu nie jest skuteczne, gdyż jego hamowanie może być kompensowane przez inne drogi sygnalizacji komórkowej itp. zjawiska. Do badań celnie wybrano więc dwa receptory czynników wzrostu: EGFR i c-Met, w przypadku których często dochodzi do nadekspresji i mutacji ich genów u pacjentów cierpiących na czerniaka, a ponadto dowiedziono, iż mogą ulegać krzyżowej aktywacji. Autorka nie pominęła także w swych analizach problemu oporności komórek na stosowane w czerniaku chemioterapeutyki, w tym przypadku vemurafenib, którego stosowanie wiąże się z indukcją nadekspresji EGFR i c-Met. Wobec tego uważam, że wybrana tematyka badawcza jest aktualna, a przeprowadzone badania mogą być nie tylko cennym źródłem wiedzy podstawowej z zakresu biologii komórki nowotworowej, ale mogą także wspomagać wnioskowanie na temat przyczyn niektórych zjawisk obserwowanych u pacjentów poddawanych leczeniu.

Rozpoczynając od analizy formalnej pracy doktorskiej, stwierdzam, że ma ona klasyczny układ pracy naukowej o charakterze eksperymentalnym, zawierającym wszystkie





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

elementy takiego opracowania, włącznie ze streszczeniami w języku polskim i angielskim. We wstępie, który napisano w sposób syntetyczny, zawarto wszelkie informacje, niezbędne do wprowadzenia czytelnika do tematyki badawczej poruszanej w rozprawie doktorskiej, a więc rozpoczęto od ogólnych danych dotyczących czerniaka i metod leczenia pacjentów z tą chorobą, w tym omawiając terapie celowane, przechodząc następnie do szczegółowych danych na temat mechanizmów molekularnych rządzących inwazyjnym wzrostem i procesem przerzutowania, ze szczególnym uwzględnieniem EGFR i c-Met, będących centrum zainteresowania Doktorantki. Autorka wprowadza także do zagadnień związanych z założeniami stosowania terapii skojarzonych u pacjentów chorych na nowotwory. Ten rozdział rozprawy doktorskiej mgr Ewelina Dratkiewicz zilustrowała schematami i tabelami, które wzbogacają i ułatwiają śledzenie treści omawianych zagadnień.

Doktorantka w sposób klarowny przedstawiła następnie cel swoich badań, jakim jest zweryfikowanie hipotezy o EGFR i c-Met, jako celach terapii skojarzonej w czerniaku, zwracając szczególną uwagę na ich rolę w tworzeniu inwazyjnych wypustek przez komórki czerniaka.

W metodycznej części pracy, Autorka przedstawiła listę odczynników i materiałów oraz urządzeń stosowanych w badaniach, a następnie opisała metodykę badań. Opis metod mógłby być bardziej przejrzysty, gdyż po zapoznaniu się z nim, a następnie z opisem wyników i dyskusją pojawiły się pewne wątpliwości dotyczące przebiegu niektórych procedur badawczych:

1. Rozdział „4.1.1. Traktowanie inhibitorami” (mylący tytuł) – rozdział dotyczy głównie inkubowania komórek z ligandami EGFR i c-MET: EGF i HGF. Stwierdzono w nim, że komórki inkubowano z ligandami: EGF w stężeniu 31 lub 5 ng/ml a HGF w stężeniu 30 ng/ml. Moje pytanie dotyczy schematu stosowania i stężeń użytych ligandów w poszczególnych analizach. Czy używano ich do każdej analizy przedstawionej w pracy? Czy stosowano pre-inkubację czy też równoczesną inkubację z inhibitorami? Kiedy używano 31 ng/ml a kiedy 5 ng/ml EGF i dlaczego?
2. Uzyskanie linii opornych na vemurafenib: bardzo skąpo opisano procedurę uzyskania linii opornych. Jak długo trwało uzyskanie tych linii (czas, liczba pasaży, także liczba pasaży z każdym kolejnym stężeniem vemurafenibu)?
3. Biopsje pobrane od pacjentów: brakuje szczegółowych danych na temat Komisji Bioetycznej, która wydała zezwolenie na badania oraz danych takiego zezwolenia (numer, data uzyskania itp.). Brakuje także podsumowania podstawowych danych na temat pacjentów od których pobrano biopsje. Pewne elementy takiej charakterystyki pojawiają się w opisie wyników, ale np. tabelaryczne zestawienie byłoby bardziej czytelne.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

4. Nie chcąc podważać prawa Autorki do własnego sposobu przedstawienia metodyki pracy, uważam jednak, że oddzielne listy odczynników, buforów itp. z oddzielnym opisem metod są niewygodne do śledzenia. Poza tym brakuje przedstawienia jasnego schematu traktowania poszczególnymi czynnikami komórek wykorzystanych w poszczególnych analizach.

W kolejnej, bardzo obszernej części pracy Autorka zaprezentowała uzyskane wyniki swoich badań ilustrując je wykresami, zdjęciami z mikroskopu konfokalnego, tabelami itp. Ten rozdział pokazuje jaki ogrom pracy został wykonany przez doktorantkę. Zastosowała ona cały szereg technik biologii komórki czy biologii molekularnej, poczynając od testów cytotoksycznych 2D i 3D po testy oceniające ruchliwość komórek, również w układach 2D i 3D, techniki western-blot, zymografię, cytometrię przepływową, mikroskopię konfokalną czy techniki prowadzące do wyciszenia bądź nadekspresji określonych genów w komórce. Świadczy to z pewnością o godnej podziwu wszechstronności Doktorantki i doskonałym przygotowaniu do pracy badawczej. Zastosowanie więc tych różnorodnych technik umożliwiło Doktorantce najpierw wybór linii czerniaka, a następnie wybór inhibitorów EGFR i c-MET do dalszych badań. Nie chcąc streszczać wyników tego szerokiego zakresu badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, chcę podkreślić, że dobrym pomysłem było syntetyczne podsumowanie poszczególnych części/etapów przeprowadzonych badań, co bardzo dobrze uporządkowało te wyniki, a także ułatwiało śledzenie toku rozumowania Doktorantki. Jeszcze raz chcę podkreślić, że uzyskane wyniki, które w pełni odpowiedziały na założenia/cele pracy są olbrzymim zbiorem bardzo wartościowych danych, na podstawie których można stwierdzić, że łączne zastosowanie inhibitorów EGFR i c-MET może skutecznie hamować nie tylko proliferację, ale i zdolności inwazyjne komórek. Dodatkowym atutem tych badań jest niewątpliwie wykorzystanie pierwotnych hodowli komórek pochodzących od pacjentów. W tych badaniach autorka potwierdziła, że przynajmniej w przypadku komórek pochodzących od niektórych pacjentów, zaproponowana przez Nią strategia terapeutyczna mogłaby być skuteczna. Dodatkowo, znaczenie szlaków sygnałowych EGFR i c-Met zostało potwierdzone przez mgr Ewelinę Dratkiewicz przez wykorzystanie linii komórkowych z wyciszeniem/nadekspresją c-Met i EGFR. Ciekawym elementem badań są także analizy z wykorzystaniem komórek z nabytą opornością na inhibitor zmutowanej kinazy BRAF – vemurafenib, pokazujące, że zastosowanie wybranych przez doktorantkę kombinacji inhibitorów EGFR i c-Met może hamować do pewnego stopnia proliferację i inwazyjność także tych komórek.

W związku z tak szerokim zakresem badań, trudno uniknąć drobnych błędów lub mało szczegółowego (z punktu widzenia recenzenta) opisu wyników badań. Dlatego chciałabym prosić Doktorantkę o wyjaśnienia dotyczące następujących zagadnień, które nie były do końca jasno przedstawione:



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

1. Analizy western-blot oraz zymografia: w niektórych przypadkach Autorka pokazała analizę denzytometryczną wraz z analizą statystyczną tych danych, w innych nie. Dlaczego? Ja osobiście jestem zwolenniczką prezentowania analizy ilościowej, zwłaszcza, gdy nie mamy do czynienia z sytuacją zero-jedynkową, tj. jest lub nie ma prążków, jak to miało miejsce w przypadku np. ekspresji pERK1/2 czy pAKT na ryc 5.10 czy 5.41, gdzie różnice są raczej ilościowe niż jakościowe. Taka analiza, moim zdaniem, zwiększa wiarygodność wyciąganych wniosków.
2. W przypadku komórek A375, wydaje się, że zastosowane stężenie foretinibu 2 μ M było zbyt duże (przeżywalność komórek około 50%), stąd w niektórych testach nie można było zaobserwować efektu łącznego stosowania 2 inhibitorów (np. apoptoza czy cykl komórkowy itp.) bo efekt samego foretinibu był zbyt wysoki. Prawdopodobnie lepszym wyjściem byłoby dobranie stężeń inhibitorów indywidualnie dla każdej linii komórkowej/każdego użytego testu.
3. Ryc. 5.29.A oraz 5.41. – analiza ekspresji ufosforylowanych białek: nie przedstawiono poziomu białka całkowitego dla poszczególnych analizowanych białek, co w przypadku białek ufosforylowanych powinno stanowić punkt odniesienia. GAPDH nie jest wystarczającą kontrolą.

W dalszej części pracy Autorka przeprowadziła sprawną dyskusję uzyskanych wyników. Zapoznanie się z tą częścią pracy było przyjemnością, gdyż zawiera ona rzetelne podsumowanie badań z dobrą konfrontacją uzyskanych wyników z danymi z piśmiennictwa naukowego. Na koniec, w rozdziale zatytułowanym „Wnioski” znajduje się raczej podsumowanie wyników; poszczególne stwierdzenia zawierają niewiele elementów, jakie można przypisać wnioskom, ale dobrze podsumowują całość tej bogatej w wyniki pracy.

Cała praca napisana jest bardzo starannie z nieznaczną liczbą błędów literowych. Muszę jednakże zwrócić uwagę na dwa żargonowe wyrażenia, które są kalką z języka angielskiego. Zamiast nich można było użyć polskich słów (może więcej niż jednego), mianowicie: „inwadują” – jako określenie dla komórek przemieszczających się w macierzy (str. 85 i 116) oraz komórki „senescentne” dla określenia starzejących się komórek (st. 112).

Podsumowując, praca doktorska mgr Eweliny Dratkiewicz to zbiór bardzo wartościowych danych uzyskanych dzięki rzetelnemu przeprowadzeniu szeregu dobrze zaplanowanych eksperymentów. Dodatkowym potwierdzeniem znacznej wartości naukowej uzyskanych wyników jest ich opublikowanie w 4 publikacjach oryginalnych w bardzo dobrych czasopismach naukowych. W publikacjach tych doktorantka jest dwukrotnie pierwszą autorką (*Oncotarget* 2018 oraz *Int J Mol Sci* 2020). Zakres wykonanych badań oraz zastosowane techniki badawcze świadczą o wszechstronności warsztatu naukowego Doktorantki. Z kolei ciekawie



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

poprowadzona dyskusja wyników, czy fachowo wprowadzający w tematykę rozprawy wstęp rozprawy doktorskiej potwierdzają dojrzałość naukową Doktorantki.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Eweliny Dratkiewicz pt. „*Inhibitory EGFR i c-Met jako czynniki ograniczające powstawanie inwadopodiów w komórkach ludzkiego czerniaka*” jest oryginalnym rozwiązaniem niezwykle interesującego i ważnego zagadnienia naukowego. Doktorantka w pełni zrealizowała założenia i cel pracy, a uzyskane wyniki opublikowała w dobrych czasopismach naukowych. W/w rozprawa spełnia więc wymogi określone w odpowiednich przepisach i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na bardzo szeroki zakres badań, a także opublikowanie wyników badań w 4 publikacjach naukowych, w większości o wysokich współczynnikach nauko-metrycznych, a także ze względu na dużą aktywność naukową doktorantki wyrażającą się m.in. współautorstwem 7 publikacji naukowych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk

Kierownik Laboratorium

Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej

