



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. Tomasz Popławski, prof. UŁ

Łódź, 07. 09. 2016

Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Machowskiej

pt. “Analiza skuteczności wybranych strategii terapii genowych – wpływ jądrowo ukierunkowanej maspiny na komórki nowotworu piersi oraz przygotowanie nośnika dla leku genetycznego”

Definicja terapii genowej obejmuje leczenie chorób za pomocą kwasów nukleinowych. Wykorzystuje się w niej zarówno kodujące jak i niekodujące DNA i RNA. Istnieją dwa główne nurty terapii genowej: wprowadzenie do komórek prawidłowej postaci zmutowanego genu w celu naprawy wady genetycznej lub modyfikacja aktywności genów. Modyfikację aktywności genów można przeprowadzić na wiele sposobów. Najczęściej wprowadza się dodatkowe kopie genów aby wzmocnić ekspresję tych genów, które nie funkcjonują wystarczająco wydajnie. Można też zahamować aktywności genów, których nadmierna ekspresja jest przyczyną chorób. W tego typu terapii genowej wykorzystuje się niekodujące sekwencje DNA lub RNA. Wybór odpowiedniej drogi postępowania zależy w głównej mierze od rodzaju choroby. Według danych z lutego tego roku na świecie rozpoczęto 2356 prób klinicznych terapii genowej. W większości są to badania I i II fazy (94%) koncentrujące się na leczeniu chorób nowotworowych (65%). W powyżej opisaną tematykę dobrze wpisuje się recenzowana praca doktorska i stanowi wąski wycinek szerszego nurtu badań, w tym Promotora pracy dr hab. Ryszarda Rzepeckiego wraz z zespołem dotyczącego podstaw molekularnych nowotworów oraz rozwoju skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Jest to tematyka bliska moim zainteresowaniom naukowym a techniki laboratoryjne w prezentowanej w recenzowanej pracy przynajmniej w części są używane przez mój zespół. Tym samym mogłem czuć się kompetentny do oceny rozprawy przedstawionej do recenzji. W bazie PubMed znalazłem 5 pozycji pod nazwiskiem Machowska z inicjałem M, z czego 4 można przypisać Doktorantce. Cała lista – prezentowana zresztą na ostatniej stronie pracy doktorskiej to dobre publikacje w uznanych czasopismach. Z tej liczby 1 pozycja dotyczy pośrednio problematyki prezentowanej w pracy, pozostałe koncentrują się na tematyce białek jądrowych. Sumaryczna wartość IF dorobku doktoranta wynosi 14,6. Całkiem nieźle jak na początek kariery naukowej.

Oceniana praca licząca 189 stron przygotowana jest według przyjętego kanonu dla dysertacji na stopień naukowy doktora w zakresie nauk eksperymentalnych. Rozpoczyna ją liczący 22 strony Wstęp w którym Doktorantka przedstawiła obecną wiedzę na temat nowotworów i ich mechanizmów rozwoju, terapii genowych a także scharakteryzowała trzy białka stanowiące cel molekularny terapii genowej, której podstawy są istotą w tej pracy doktorskiej. Wstęp kończy prezentacja nośników używanych w terapii genowej. Wszystkie zagadnienia zostały opisane w sposób kompetentny i przejrzysty. Stanowią one właściwe wprowadzenie w problematykę badawczą pracy doktorskiej. Nie dopatrzyłem się żadnych istotnych błędów zarówno w sferze tekstowej, jak i ilustracyjnej. Ta ostatnia najczęściej oznacza zapożyczenia ale ze wskazaniem

pochodzenia i autorstwa. Ponieważ recenzent musi jednak pokazać swoją wnikliwość mam kilka uwag/komentarzy do tej części pracy. W jaki sposób indukowanie stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza tworzy sprzyjające środowisko dla rozwoju nowotworu (str. 18)? Dlaczego wybrano model nowotworu piersi do badań skoro z przytoczonych przez Doktorantkę danych (str. 20) wynika, że największym problemem są nowotwory dróg oddechowych a nowotwory piersi są na ostatnim miejscu zaraz po nowotworach jelita grubego. Przy takim zestawieniu wybrałbym poważniejszy problem medyczny – nowotwory dróg oddechowych. Nie jestem przekonany czy rasa jest istotnym czynnikiem podnoszącym ryzyko zachorowania na raka piersi (str. 24). Co oznacza termin „właściwa kopia uszkodzonego genu”? Zwrot ten sugeruje, że istnieje również „kopia niewłaściwa”. Co Doktorantka rozumie przez uszkodzenie genu, skoro wyraźnie na stronie 26 rozróżnia uszkodzenie od mutacji? Nie można sprowadzać białka p53 tylko do czynnika transkrypcyjnego (strona 32). Jego rola (jak zresztą w dalszej części wstępu opisuje Doktorantka) jest znacznie szersza. Stąd bardzo często p53 nazywane jest „strażnikiem genomu”. Zwrot „wyczerpanie nukleotydów” (str. 32) jest wysoce niefortunny – jak rozumiem chodzi tu o wyczerpanie puli nukleotydów w komórce w następstwie pewnych zdarzeń. Dla kogo jest korzystne posiadanie „dzikiego typu” p53? Czy chodzi tu o komórki nowotworowe czy o pacjentkę? Bardzo prosiłbym Doktorantkę o rozwinięcie tej kwestii podczas publicznej obrony.

Cele pracy napisane są jasno i zrozumiale – nie ma najmniejszych wątpliwości do czego dąży Autorka – do opracowania strategii leczenia nowotworu piersi wykorzystując jako cele terapii genowej geny kodujące onkogen HER2 i dwa białka supresorowe: p53 i maspinę. Mam tylko jedną uwagę do tej części pracy – kryterium zaliczenia choroby do kategorii chorób cywilizacyjnych nie jest liczba zachorowań i przypadków śmiertelnych. Choroby cywilizacyjne są definiowane jako globalnie występujące, powszechne choroby, do których wystąpienia lub rozprzestrzenienia przyczynił się postęp współczesnej cywilizacji. Oczywiście zgadzam się z poglądem prezentowanym przez Doktorantkę że choroby nowotworowe zaliczane są do chorób cywilizacyjnych.

Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do bardzo dobrze opracowanej części prezentującej Materiały i Metody w pracy doktorskiej mgr Magdaleny Machowskiej. W kolejnych czterdziestu dwóch (!) podrozdziałach tej części pracy wystarczająco dokładnie i jasno opisano techniki i metody molekularne zastosowane na poszczególnych etapach pracy dla celów: przygotowania i transformacji komórek kompetentnych, izolacji DNA, klonowania molekularnego obejmującego wszystkie jego etapy. Nie mam także uwag do „eukariotycznej” części Metod zawierającej opis technik związanych bezpośrednio z doborem odpowiedniego wektora jak i opracowaniem strategii terapii genowej. Stosowane metody opisane zostały z dużą precyzją, co wskazuje na ich pełne zrozumienie przez Doktorantkę a liczba opisanych technik wyraźnie wskazuje na olbrzymi wysiłek zarówno intelektualny jak i manualny jaki podjęto podczas realizacji postawionych celów. W ten sposób przechodzimy do kluczowej części pracy doktorskiej – Wyników.

Lektura części doświadczalnej pokazuje, że wykonano rzetelny, rozległy zakres badań za pomocą logicznie uzupełniających się technik laboratoryjnych. Opis wyników poszczególnych eksperymentów został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie, a ich bardzo staranna dokumentacja nie budzi zastrzeżeń. Część doświadczalną recenzowanej pracy doktorskiej można podzielić na trzy części dotyczące próby opracowania strategii terapii genowej raka piersi wykorzystując wyciszenie ekspresji genu *erbb2*, nadprodukcji białka p53 i maspiny. Dwie pierwsze próby nie zakończyły się, jak wielokrotnie podkreśla Doktorantka sukcesem. Nie dostrzegam więc potrzeby szczegółowej oceny wyników dokładnie opisanych i udokumentowanych na 9 kolejnych stronach monografii, ale pozwolę sobie na komentarz. W nauce wyniki powinno się opisywać stosując liczby a nie niewiele mówiące czytelnikowi zwroty takie jak stosunkowo niska wydajność (str. 89) czy też zdecydowanie wyższy poziom (str. 89). Bez punktu odniesienia czytelnik może jedynie domyślać się o co Autorce chodzi. Takie swobodne interpretacje nie powinny mieć miejsca w dziełach naukowych. Ten komentarz dotyczy większości wyników prezentowanych w rozdziałach 6.1 i 6.2. Brakuje statystyki i analizy wyników za pomocą liczb – aczkolwiek takowa zapewne została przeprowadzona skoro Autorka posługuje się takimi zwrotami jak „niższy poziom białka”, „wyższy poziom

wyciszenia” etc. Nie mogę wykluczyć, że to „brak sukcesu” spowodował Doktorantkę do takiej formy prezentacji tej części wyników. W jaki sposób został oceniony efekt synergistyczny wyciszenia *erbb2* i docetakselu? Najlepszą metodą, powszechnie uznaną i stosowaną jest obliczenie tzw. współczynnika CI (ang. *combination index*). Ocena indukcji procesu apoptozy w komórkach nowotworowych z nadprodukcją białka p53 mogła być przeprowadzona za pomocą metod dających się zmierzyć a nie na przysłowiowe „oko” analizując kolorowe obrazki. Moja końcowa, ogólna ocena tej części doświadczalnej jest nieco odmienna od tej zaprezentowanej przez Doktorantkę w pracy. Uważam, że jest ona sukcesem albowiem wysiłek intelektualny włożony w tą część pracy zaowocował sukcesem naukowym w dalszej części eksperymentalnej pracy. Na dalszych etapach kariery naukowej sugerowałbym bym obecnej Doktorantce więcej optymizmu podczas krytycznej prezentacji swoich wyników, tym bardziej że przyjęty logiczny schemat sekcji zawierającej Wyniki sprawia, że tą część pracy czyta się bardzo dobrze.

Do najważniejszych oryginalnych wyników badań należy opracowanie strategii terapii genowej skierowanej przeciwko nowotworom piersi. Doktorantka z sukcesem zarówno otrzymała lek genetyczny jak i opracowała wydajną metodę dostarczania go do komórek nowotworowych. Pewien niedosyt płynący z lektury tej części pracy budzi fakt, że wyniki badań *in vivo* okazały się nieco mniej spektakularne niż *in vitro* i tym samym nieco ostudziły mój entuzjazm, ale Doktorantka w Dyskusji podaje kilka pomysłów na przełamanie problemów związanych z optymalizacją procesu dostarczania leku *in vivo*. Żałuję, że w tej części pracy mgr Magdalena Machowska nie zdecydowała się na analizę uwrażliwiania komórek nowotworowych z wprowadzonym lekiem genetycznym na powszechnie używane cytostatyki. Tym bardziej, że pojawiły się już prace naukowe, które takie zależności sugerują (uwrażliwianie komórek nowotworowych z nadekspresją maspiny na cisplatinę).

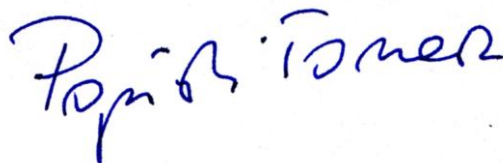
Obszerna dyskusja wyników w odniesieniu do dobrze dobranej literatury naukowej, przeprowadzona jest we właściwy sposób. Wszystkie najważniejsze wyniki zrealizowanych badań zostały skonfrontowane z aktualną wiedzą w zakresie przedstawianego problemu badawczego. Mój jedyny komentarz do tej części pracy dotyczy obecności w niej dwóch pierwszych akapitów, które znakomicie nadają się do Uzasadnienia podjęcia tematu. W Dyskusji powinno się też unikać odwoływań do poszczególnych rycin a raczej przedstawić ogólny opis wyników.

Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest starannie z drobnymi wyjątkami i co należy podkreślić napisana jest poprawną polszczyzną. Wyjątki należą do tzw. „literówek” i można je policzyć na palcach jednej ręki. Należy to uznać za dobry wynik przy tak obszernym dziele. Zwrot PCR kolonijny brzmi dziwnie – lepiej jest stosować zwrot PCR do kolonii. DNA jest rodzaju męskiego (str. 57), po liczbie a przed znakiem °C stawiamy spację. Ilość dodawanego enzymu lepiej jest przedstawiać w jednostkach enzymatycznych a nie objętości (str. 58). Zamiast samozamykanie plazmidu można stosować zwrot samoligacja. W pracy znajdują się bardzo długie zdania (rekordzista ma 5 linijek) co utrudnia czytanie. Sam układ pracy jest przejrzysty, a proporcje poszczególnych rozdziałów właściwe. W pracy wykorzystano prawie 300 pozycji literaturowych w których brakuje mi cytatu pracy naszego Wielkiego Rodaka – profesora Wacława Szybalskiego, który razem z zespołem opublikował w roku 1962 wyniki transformacji genetycznej komórek eukariotycznych i wprowadził do leksykonu biologicznego termin „terapia genowa”.

Przystępując do oceny końcowej pragnę podkreślić, że badania zrealizowano zgodnie z wytyczonymi założeniami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych, a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretowano na podstawie analiz własnych i danych literaturowych. Badania zostały przeprowadzone kompetentnie, wnioski są przekonujące, a sugestie na temat zastosowań są racjonalne i stanowią dobrą podstawę do dalszych badań. Nie mam informacji odnośnie publikacji wyników przedstawionych w recenzowanej pracy. W mojej ocenie brak takiej publikacji nie jest problemem a dowodem, że nadrzędnym celem pracy było rozwiązanie problemu badawczego, a nie pogoń za publikacjami. Zasluguje to niewątpliwie na podkreślenie, gdyż w obecnym sparametryzowanym systemie oceny naukowców, trudno nie ulec pokusie publikowania za wszelką cenę. Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki i Jej Promotora i spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach

naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 r. z późniejszymi zmianami. Jednocześnie stwierdzam, że dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Machowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Popławski