

ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00  
fax +48/61/823 32 35  
e-mail: igcz@man.poznan.pl

[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, prof. nadzw. PAN  
Zakład Genetyki Nowotworów  
[malgorzata.jarmuz-szymczak@igcz.poznan.pl](mailto:malgorzata.jarmuz-szymczak@igcz.poznan.pl)

## OCENA

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych

mgr Roberta Łukasza Kleszcza

pt. "Modulacja kanonicznej ścieżki Wnt w komórkach płaskonabłonkowych głowy i szyi -  
poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych"

Celem recenzowanej pracy była ocena możliwości modulacji kanonicznego szlaku sygnałowego Wnt w wybranych liniach komórkowych płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi (HNSCC) oraz wskazanie najkorzystniejszych punktów uchwytu w tym szlaku, które mogłyby być wykorzystane w terapii HNSCC. Kolejnym zadaniem była ocena wpływu modulacji kanonicznego szlaku Wnt na metabolizm energetyczny badanych komórek.

Szlak sygnałowy Wnt pełni istotną rolę w regulacji wielu procesów takich jak: embriogeneza, różnicowanie, przeżywalność i proliferacja komórek. Zaburzenia jego funkcjonowania stwierdzono w wielu stanach patologicznych, obejmujących różne typy nowotworów, choroby neurodegeneracyjne i metaboliczne.

Wiele leków stosowanych w leczeniu wykazuje zdolność do modulacji sygnalizacji Wnt zależnej od  $\beta$ -kateniny. Ponadto na aktywność sygnalizacji Wnt mają wpływ różne związki pochodzenia naturalnego a ze względu na duże zainteresowanie w ostatnich latach dokonano syntezy wielu substancji blokujących różne białka tej ścieżki, co szczegółowo opisuje Doktorant we wstępie pracy.

Nadmierna aktywność szlaku Wnt została wykryta w wielu nowotworach np. w nowotworach jelita grubego, gdzie u 70% pacjentów stwierdza się mutacje genu *APC*

kodującego białko regulatorowe tego szlaku. W przypadku płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi nie odkryto głównej przyczyny często zwiększonej aktywności kanonicznej ścieżki Wnt. Z tego powodu zasadne są cele pracy doktorskiej mgr Roberta Kleszcza czyli poszukiwania białek szlaku Wnt, mających znaczenie dla jego aktywności w tych nowotworach.

Wstęp pracy pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z dość trudnym zagadnieniem a w szczególności z wiadomościami dotyczącymi samej ścieżki/ścieżek sygnałowych Wnt, jej odkrycia oraz struktury organizacyjnej i regulacji kanonicznej ścieżki sygnałowej. Co więcej Doktorant opisał kanoniczny szlak w nowotworach jelita grubego oraz w HNSCC, znaczenie zmienionego metabolizmu energetycznego dla rozwoju komórek nowotworowych, znaczenie kliniczne i podłoże molekularne HNSCC, terapię stosowaną w tych nowotworach a także terapeutyczne możliwości inhibicji kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt.

Osobiście nieco zmieniałbym kolejność podrozdziałów we Wstępie pracy. Warto również zaktualizować dane epidemiologiczne dotyczące nowotworów głowy i szyi w Polsce z roku 2014 na dane z roku 2015. W opisie "Standardowa terapia HNSCC" wskazałabym, który lek biologiczny jest stosowany w Polsce w leczeniu HNSCC, ponieważ niestety nie wszystkie wymienione są dostępne w naszym kraju.

Mimo tych uwag uważam, iż wstęp napisany jest syntetycznie, wyczerpująco i przejrzysto a dodatkowo niektóre zagadnienia zobrazowano rycinami pomagającymi w ich zrozumieniu.

Cel pracy został sformułowany jasno i poprawnie a materiał badawczy i zastosowane metody pozwoliły na jego realizację.

Materiały i metody zostały opisane szczegółowo i ze zrozumieniem, jednakże z małymi wyjątkami. Czytelnikowi byłoby łatwiej, gdyby Doktorant w podrozdziale "Badane związki" lepiej je scharakteryzował a nie ograniczył się tylko do wzorów chemicznych i nazw firm, w których zostały wyprodukowane lub zakupione. Pewne informacje o tych związkach oczywiście można znaleźć we wstępie lub w wynikach pracy, ale w czym rozpuszczono poszczególne badane związki można dopiero wywnioskować czytając wyniki.

Doktorant w podrozdziale "Warunki hodowli komórek" napisał, iż "W ramach wykonywanych eksperymentów zawartość FBS w kompletnej pożywce DMEM obniżano do 5%." W związku z tym mam pytanie: w których eksperymentach zastosowano obniżoną zawartość FBS i dlaczego?

Natomiast w opisie testu migracji komórek nie wskazano jakie warunki zastosowano w celu badania migracji komórek, tak aby nie badać ich proliferacji. Czy obniżenie zawartości FBS do 5% dla badanych linii komórkowych było wystarczające by badać migrację komórek? A może

dotatkowo wzięto pod uwagę, iż większość badanych substancji była rozpuszczana w DMSO, który minimalizuje proliferację *per se*? Uważam, iż w opisie metod brakuje wyjaśnienia dlaczego zastosowano dwa testy na żywotność komórek.

Pomimo pewnych uwag co do opisu zastosowanych metod, uważam, iż zostały one dobrze dobrane i umiejętnie wykorzystane.

Badania zostały przeprowadzone na liniach komórkowych w odpowiednio następujących po sobie etapach. W pierwszej kolejności Doktorant wybrał spośród 8 linii komórkowych pochodzących z HNSCC dwie najbardziej podatne na modulację kanonicznej ścieżki Wnt. W następnym etapie przeprowadził skrining 43 genów z użyciem pomiaru aktywności reportera zależnego od aktywacji kanonicznej ścieżki Wnt w linii komórkowej wyprowadzonej z raka jelita grubego. Wybór akurat tej linii komórkowej został uzasadniony poprzez przeprowadzenie szeregu doświadczeń udokumentowanych w aneksie pracy doktorskiej. Do kolejnych analiz wybrał 16 genów, których ekspresja została wyciszona w 3 liniach komórkowych (raka jelita grubego i w dwóch liniach HNSCC najbardziej podatnych na modulację kanonicznej ścieżki Wnt). Po ocenie wpływu wyciszenia wybranych genów na ekspresję 6 genów docelowych ścieżki Wnt (*Axin2*, *CCND1*, *MMP7*, *c-MYC*, *BIRC5* oraz *VEGF*) zaobserwował, iż najistotniejsze znaczenie dla modulacji tego szlaku w badanych liniach komórkowych ma wyciszenie genów kodujących porcupinę i białko dishevelled oraz acetylotransferazę CBP, demetylazy KDM1A, KDM4C, KDM6A i metylotransferazy CARM1 i KMT2A. Jednocześnie wykazał, iż głównym efektem wyciszenia wyżej wymienionych genów jest obniżenie ekspresji dwóch genów docelowych ścieżki Wnt: genów kodujących aksynę 2 i metaloproteinazę 7. Weryfikacja potencjalnych terapeutycznych punktów uchwytu ścieżki Wnt została przeprowadzona z wykorzystaniem drobnocząsteczkowych inhibitorów 8 genów/białek, których wyciszenie z zastosowaniem siRNA skutkowało obniżoną ekspresją genów docelowych kanonicznego szlaku Wnt. Użycie inhibitorów pozwoliło na wytypowanie czterech potencjalnych farmakologicznych punktów uchwytu w kanonicznej ścieżce Wnt dla PRI-724 - inhibitora interakcji CBP/ $\beta$ -katenina, IWP-2- inhibitora porcupiny oraz Dv1-PDZ Domain inhibitor 2 - inhibitora domeny PDZ białek dishevelled i MS049 - inhibitora CARM1. Doktorant wykonał testy weryfikujące komórkowe efekty działania wytypowanych związków, przeprowadził analizę ich wpływu na migrację, cykl komórkowy i zdolność do indukcji apoptozy. Analizy te wykazały, iż inhibitory porcupiny i acetylotransferazy CBP hamowały migrację komórek, zaburzały cykl komórkowy i wykazywały działanie proapoptotyczne.

Dodatkowo Doktorant poddał ocenie potencjalny związek modulacji kanonicznej ścieżki Wnt z regulacją metabolizmu energetycznego. Wykazał, iż komórki FaDu są podatne na

modulację metabolizmu energetycznego pod wpływem inhibicji czynnika transkrypcyjnego c-MYC oraz działania 2-deoksyglukozy (referencyjny inhibitor glikolizy).

Doktorant przeprowadził bardzo wnikliwą analizę uzyskanych wyników i przedstawił je w formie opisowej oraz zobrazował przejrzystymi wykresami i rycinami. Dodatkowo pod każdym podrozdziałem przygotował podsumowanie, w którym zawarł najistotniejsze wyniki, będące podstawą do podjęcia kolejnych etapów badań.

Opracowanie tak ogromnej ilości wyników zapewne nie było łatwe, ale Doktorant doskonale sprostał temu zadaniu. Należy jeszcze zwrócić uwagę na fakt, iż przeprowadzone badania były metodologicznie skomplikowane i trudne. Podkreślam, że podczas pracy z komórkami należy wykazać się niezwykłą starannością, sumiennością i dokładnością a niekiedy i wielką cierpliwością. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie 6 wniosków, które zostały prawidłowo sformułowane. Proponuję jednak, aby Doktorant rozważył dołączenie do przyszłej publikacji wyników rozprawy doktorskiej analizy przynajmniej dwóch punktów uchwytu bezpośrednio na poziomie białka.

W rozdziale Dyskusja Doktorant omówił uzyskane wyniki i w dojrzały sposób je przedyskutował umiejętnie odnosząc się do danych literaturowych.

Należy podkreślić, że wartość merytoryczna pracy, swoboda poruszania się w imponującej liczbie wyników badań oraz rzeczowa dyskusja uzyskanych wyników z bieżącą literaturą dowodzi biegłej znajomości tematu przez Autora pracy.

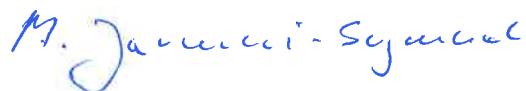
Praca pod względem struktury formalnej jest starannie dopracowana, układ rozprawy jest prawidłowy z wyodrębnieniem wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków oraz piśmiennictwa a także streszczeń w języku polskim i angielskim. Praca liczy 188 stron, zawiera 9 tabel, 119 rycin, cytuje 304 pozycje piśmiennictwa oraz 3 źródła internetowe. Drobne uwagi dotyczące formalnego układu pracy dotyczą:

1. W pracy w języku polskim w cytowaniu piśmiennictwa lepiej używać skrótu "i wsp." aniżeli "et al."
2. W podpisach pod rycinami od 1 do 3 oraz przy niektórych wykresach brakuje wyjaśnienia skrótów.
3. Prawidłowa nazwa genu p53 to *TP53* (str. 27).
4. W tabelach od 5-8 brakuje wyjaśnienia co oznacza starter F i R.
5. Na niektórych stronach występują drobne błędy literowe.

W podsumowaniu stwierdzam, iż wszystkie uwagi zamieszczone w niniejszej recenzji mają jedynie charakter korekcyjny i nie wpływają na jakość i zasadność przeprowadzonych badań. Rozprawę doktorską oceniam wysoko ze względu na jej ważne walory poznawcze. Recenzowana praca doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 31 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.).

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Roberta Kleszcza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność i ważne walory poznawcze wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak