

Wol 19.11.2018
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
M. Podhorska-Okolow
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolow

Lublin, dnia 12 listopada 2018 roku

OCENA

dysertacji doktorskiej mgr Izabeli Szczuki pod tytułem „Wpływ 3-bromopirogronianu na właściwości katepsyny B w aspekcie potencjału metastatycznego komórek raka jelita grubego”

Badania naukowe prowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej, Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego imienia Piastów Śląskich we Wrocławiu, pod kierownictwem promotora pracy doktorskiej dr hab. Grzegorza Terleckiego, prof. nadzw. UM ukierunkowane są, między innymi, na analizy biochemii i funkcji katepsyny B oraz wpływ takich związków jak bromopirogronian czy triterpenoidy na stany patologiczne. Dodatkową opiekę od strony merytorycznej oraz metod aparaturowych koordynował promotor pomocniczy dr Jerzy Wiśniewski. Praca doktorska pani magister Izabeli Szczuki powstała dla Wydziału Lekarskiego, pod nadzorem obu promotorów.

Głównym i oryginalnym założeniem pracy doktorskiej mgr Izabeli Szczuki było poznanie efektów działania 3-bromopirogronianu na właściwości komórek nowotworowych wybranych linii raka jelita grubego, które decydują o potencjale metastatycznym tych komórek. Istotny element tego mechanizmu stanowi katepsyna B. Osiągnęła to doktorantka poprzez ocenę potencjału migracyjnego i inwazyjności ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego linii Caco-2 i HCT 116 poddanych działaniu 3-bromopirogronianu, oraz określenie wpływu 3-bromopirogronianu na poziom sekrecji i na aktywność enzymatyczną katepsyny B w komórkach linii Caco-2 i HCT 116, a także w płynach pochodzących. Obserwowała również wpływ 3-bromopirogronianu na występowanie zmian w pojawianiu się (ekspozycji?) katepsyny B na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej badanych komórek nowotworowych. Ponadto doktorantka zbadła skutki bezpośredniego działania 3-bromopirogronianu na cząsteczkę katepsyny B w warunkach *in vitro*. Osiągnęła to poprzez analizę wpływu 3-bromopirogronianu na aktywność enzymatyczną oczyszczonej ludzkiej katepsyny B oraz określenie charakteru inhibicji i próbę identyfikacji ewentualnych modyfikacji cząsteczki tego białka. Z tych względów temat i zakres badań dysertacji doktorskiej uważam za trafiony i interesujący, gdyż uzupełnia naszą wiedzę o biochemii i funkcji katepsyny B, w tym rolę w metastazie nowotworów.

Oceniana rozprawa doktorska mgr Izabeli Szczuki obejmuje 107 stron standardowych tekstu, w tym 27 ilustracji (rysunków, schematów, wykresów i fotografii) oraz 8 tabel we wszystkich częściach pracy. Jest podzielona na typowe dla rozpraw doktorskich części, czyli wstęp i cel pracy, oraz część doświadczalną podzieloną na materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie po polsku i po angielsku oraz spis literatury.

Doktorantka rozpoczyna swoją rozprawę doktorską od 20-stronicowego przeglądu literatury na temat katepsyny B. Omawia samą katepsynę B (w tym jej miejsce w klasyfikacji enzymów proteolitycznych, zarówno EC, jak i MEROPS; jej strukturę przestrzenną i mechanizm katalityczny; syntezę, lokalizację i funkcje w stanach fizjologicznych; funkcje w stanach patologicznych) jak i inhibitory (z naciskiem na 3-bromopirogronian, jego strukturę i właściwości chemiczne, jego transport do wnętrza komórki, jego wpływ na enzymy szlaków metabolicznych oraz wpływ na organizmy pasożytnicze, grzyby i bakterie). Omawia także relacje katepsyny B i 3-bromopirogronianu z nowotworami, potencjalną rolę katepsyny B w chorobach nowotworowych, jej lokalizację oraz kierowanie i sekrecję na zewnątrz komórki, w tym asocjację z błoną komórkową). Dodatkowo skupia się na roli katepsyny B w nowotworach jelita grubego, oraz 3-bromopirogronianie jako związku o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Cenne jest doprowadzenie cytowanych publikacji do roku bieżącego, co dowodzi dobrego podejścia do doboru literatury oraz umiejętnego wykorzystywania źródeł..

Zagadką jest dla mnie określenie „Propeptyd, wiążący się z enzymem podobnie jak substrat, ale w przeciwnym do niego kierunku...” (choć domyślam się o co chodzi). Tutaj można by również podyskutować o określeniach typu – widok cząsteczki białka „od frontu” lub „od góry”, czy subdomena (nie domena) „lewa” lub „prawa”, które to określenia nawet w oryginalnych publikacjach są brane w cudzysłów. Definiowanie powinno się odbywać w oparciu o koniec N i koniec C polipeptydu. Podobnie określanie inhibitorów kompetycyjnych jako konkurencyjne, podczas gdy lepsze tłumaczenie słowa angielskiego to rywalizujące. Albo zgodnie z podręcznikami biochemii pozostawienie określenia oryginalnego (choć to anglicyzm, ale czyż biochemia nie posługuje się w większości terminami angielskimi). Jednak to historia na osobną dyskusję, podobnie jak, w innym obszarze biochemii, nazywanie chaperonów białkami opiekuńczymi (opieka ciągła) a nie białkami-przyzwoitkami (opieka okresowa). Ponownie lepsze byłby termin oryginalny.

Brakuje mi również większej ilości informacji o pętli zamykającej, kluczowej dla przełącznika aktywności „endo-” – „egzo-” oraz precyzyjniejszego określenia sposobu asocjacji enzymu z błoną komórkową (czy tylko histydyna?).

Co do celu pracy, to jest on przedstawiony w sposób zwięzły i klarowny, oraz podkreślający oryginalność pracy. Ułatwia także śledzenie przez czytającego następującej po nim części badawczej.

Materiały i metody są czytelne oraz przedstawione w sposób umożliwiający powtórzenie i dokładniejszą analizę badań w przyszłości. Odczynniki oraz aparatura badawcza zostały przedstawione w klarowny sposób w tabelach (w sumie 6 tabel). Test migracji i test inwazyjności dla ułatwienia zostały zilustrowane schematami na rysunkach. Dwie rzeczy pobudzają mnie do dyskursu. Pierwsza to ekspresja katepsyny B na powierzchni komórek – chyba raczej „pojawienie się” na powierzchni komórek, gdyż ekspresja zarezerwowana jest dla genów. A ekspresja w cudzysłowie pojawia się dopiero na stronie 55. Druga to analizy spektrometryczne - czym jest niecałe 0,2 kDa przy 25 kDa? Urozmaicone metody badawcze świadczą o wszechstronnym i krytycznym podejściu mgr Izabeli Szczuki do podjętego problemu badawczego. A ich użycie dowodzi znajomości trafnego dobierania

Wyniki opisane są bardzo dobrze, a ich opracowanie graficzne jest poprawne i czytelne. Dla osoby zajmującej się enzymologią niejako „mówią same za siebie”. Sumarycznie rozdział ten czyta się płynnie i poza jedną uwagą (raczej o charakterze dyskusyjnym) należy uznać go za bardzo dobrą część rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Szczuki, będącą równocześnie pełną realizacją założonych celów pracy. Moja uwaga dotyczy zymografii, czyli ryciny 25. Rzeczywiście prążki po działaniu 3BrPA nie wydają się słabsze, co jest ewidentne dla 2B3NAP, ale wykazują tak zwane „dolne rozmycie”, co jest jednak dowodem na jakąś interakcję z inhibitorem. Sądzę, że należało popracować jeszcze nad zymografią (substrat i jego stężenie, stężenie żelu, czasy inkubacji) i jej densytometrią, która często ujednoznacza interpretację.

Dyskusja wyników jest wnikliwa i dość obszerna, daje też „rzut” wyników doktorantki na wyniki i dyskusje innych badaczy tematu. Dowodzi to zapoznania się doktorantki z optymalnym doбором technik i narzędzi badawczych do analizy zagadnienia. Poza paroma rzeczami do polemiki, należy uznać, że jest ona prowadzona w sposób rzeczowy i krytyczny,

świadczący o satysfakcjonującej znajomości zagadnienia, czyli enzymologii i funkcji katepsyny B oraz jej inhibitora 3BrPA.

Polemizować można z takimi rzeczami w dyskusji jak:

- rozkład białek (obejmujący ich aktywację i wytwarzanie izoform – tzw. nicking) to też szlak metaboliczny, choć pośredni a nie podstawowy czy wtórny (z kolei bardziej typowy do różnicowania tkanka normalna – nowotwór);
- porównanie miejsc katalitycznych enzymów metabolizmu podstawowego (np. heksokinazy) i triady katalitycznej katepsyny B daje odpowiedź na ko-inhibicję *in vitro* (być może i *in vivo*) – i tu, i tu mamy Asn; działanie na Cys jest dodatkowym (?) oddziaływaniem inhibitora;
- porównywanie katepsyny B ze zdrowej wątroby z enzymem z nowotworów też jest obarczone pewnym przybliżeniem, ze względu choćby na nie rozpoznane izoenzymy i izoformy;
- w dyskusji z Hulkovert'em i wsp. przychyliam się do zdania doktorantki, że decyduje nie ilość komórek, a sposób hodowli (jak w pracy!); choć można by się pokusić o zbadanie enzymu w subfrakcjach komórkowych;
- dowody na wnioski idące dalej niż wynikające z części doświadczalnej pracy, co do biosyntezy, dystrybucji i sekrecji katepsyny B, są chyba jeszcze za słabe;
- chyba nie bada się inhibicji białek rozfałdowanych i zdenaturowanych; pojawiająca się wtedy wielokrotność wiązania inhibitora jest wynikiem dostępności aminokwasów spoza centrum aktywnego;
- no i odwieczna dyskusja co do substratów syntetycznych; analizy kliniczne – „tak!”, ale enzymologia (w tym mechanizm inhibicji i sposoby oddziaływania) – „nie!”.

Rozprawę kończą zwięzłe Wnioski, które są chyba śmielsze co do braku alkilacji niż dyskusja wyników i za mało śmiała co do metastazy w stosunku do dyskusji wyników. Streszczenie w języku polskim i angielskim stanowi klarowny bryk do zawartości dysertacji doktorskiej.

Drobne pomyłki i literówki oraz parę zjawisk typu „jest – nie ma”, ze względu na obszerność poruszanych zagadnień oraz dużą ilość cytowań praktycznie nie mają znaczenia. Powinny być wyłapano, w miarę możliwości do końca, przed opublikowaniem pracy lub jej fragmentów. Istotnych błędów redakcyjnych, językowych czy nomenklaturowych nie

zauważyłem. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna nie budzi istotnych zastrzeżeń.

Powyższe uwagi i polemiki nie mają wpływu na dobrą merytoryczną wartość pracy doktorskiej i jej ogólną wysoką pozytywną ocenę. Dla doktorantki powinny zaś stanowić bodziec do dalszego treningu precyzyjnego myślenia czy wyrażania w pełni swoich, jak i innych autorów, hipotez i przemyśleń otrzymywanych rezultatów badań. Całą dysertację czyta się płynnie i, mimo pewnych wyhamowań, z dużą przyjemnością. Jest jedną z licznych prac o katepsynie B, ale reprezentuje nieco świeższe podejście do zagadnienia (i przez to może być uważana za oryginalną).

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska Izabeli Szczuki pod tytułem „Wpływ 3-bromopirogronianu na właściwości katepsyny B w aspekcie potencjału metastatycznego komórek raka jelita grubego” spełnia warunki określone w art. 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.). W pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, jest dobrze zaplanowana, starannie wykonana i poprawnie napisana. Jest także przykładem rozwiązywania problemu naukowego z wykorzystaniem różnych metod badawczych, zawiera elementy nowości naukowej i dowodzi osiągnięcia zamierzonego celu. Otwiera również perspektywę dalszego rozwoju naukowego mgr Izabeli Szczuki w wyznaczonym przez jej pracę kierunku, a także możliwość praktycznego zastosowania rezultatów przedstawionych badań w praktyce klinicznej.

Uwzględniając wartość poznawczą rozprawy doktorskiej i wykazaną przez doktorantkę dobrą znajomość problematyki przedkładam Radzie Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczeniu mgr Izabeli Szczuki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Krzysztof Grzywnowicz



Prof. dr hab. Krzysztof Grzywnowicz

Zakład Biochemii

Wydziału Biologii i Biotechnologii

Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie