



*Prof. dr hab. Anna Żaczek*  
*Zakład Onkologii Translacyjnej*  
*Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii*  
*Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego*  
*ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk*

Gdańsk 18.05.2022

### RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Kamili Soboskiej pt. **„Neuromedyna U (NMU) jako regulator aktywności komórek mikrośrodowiska raka jelita grubego”** wykonanej w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora dr hab. Joanny Bonceli, prof. IBM PAN oraz promotora pomocniczego dr Patrycji Przygockiej.

Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania były finansowane z projektu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata Bis: „Neuromedyna U (NMU) jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita i odbytnicy”, kierowanego przez dr Patrycję Przygocką.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy analizy roli małego białka wydzielniczego neuromedyny U (NMU) w regulacji aktywności wybranych komórek mikrośrodowiska w raku jelita grubego. Rak jelita grubego (RJG) jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym oraz drugą przyczyną zgonów z powodu nowotworów. Jest również wysoce heterogenną chorobą o zróżnicowanym podłożu molekularnym i kilku wyodrębnionych podtypach molekularnych. Mimo wieloletnich badań, wciąż jest wykrywany zbyt późno, a rokowania w przypadku zaawansowanego stadium choroby są niepomyślne. Przerzuty pozostają największym wyzwaniem, podobnie jak w przypadku innych guzów litych. Jednocześnie wiedza na temat procesu przerzutowania i czynników zaangażowanych w ten proces jest niepełna. Nadzieję na poprawę wyników leczenia wiąże się z lepszym poznaniem biologii RJG, a w ostatnim czasie badania skupiają się na oddziaływaniu pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami otaczającego je mikrośrodowiska. Biorąc pod uwagę powyższe informacje stwierdzić należy, że zagadnienia podjęte w pracy doktorskiej mgr Kamili Soboskiej nakierowane na poznanie, słabo do tej pory opisanej, roli NMU w regulacji aktywności komórek mikrośrodowiska RJG są aktualne i istotne z poznawczego punktu widzenia. Lepsze poznanie wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i komórkami niszy jest kluczowe dla opracowania nowych możliwości terapeutycznych, badania posiadają więc też potencjalny wymiar aplikacyjny w kontekście nowych strategii terapeutycznych.



Rozprawę stanowi przygotowane w języku polskim opracowanie liczące 111 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych. Posiada następujące rozdziały: Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literatura. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Skrótów. Zarówno kompozycja pracy, jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa, a spis treści dobrze przygotowany. Praca napisana jest przejrzysto i zwięźle, co uważam za jej duży atut. Z technicznego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest bardzo starannie; tekst jest napisany poprawną polszczyzną, błędów jest bardzo niewiele; literówek praktycznie nie zauważyłam, zdarzają się nieliczne błędy interpunkcyjne. Praca posiada czytelną oprawę graficzną i dobrze opracowane ryciny. Na szczególną uwagę zasługują bardzo starannie przygotowane schematy – moja uwagę szczególnie przykuły Ryc. 6 przedstawiająca schemat różnicowania i polaryzacji makrofagów oraz Ryc. 46 stanowiąca graficzne podsumowanie uzyskanych wyników. Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń, co dowodzi umiejętności Doktorantki do właściwego przedstawienia problemu naukowego i sposobu jego rozwiązania. Taka staranność dodatkowo utwierdza czytelnika w przekonaniu, iż same badania i analizy laboratoryjne przeprowadzone były w sposób zachowujący najwyższe standardy.

Liczący 12 stron **Wstęp** jest napisany syntetycznie i ciekawie. Dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Autorka przedstawia kolejno ogólną charakterystykę raka jelita grubego, mikrośrodowisko nowotworu, neuromedynę U, jej receptory i ich działanie, jak również działanie NMU w procesach fizjologicznych i patologicznych, również w kontekście mikrośrodowiska nowotworu. Finalnie przedstawione dane prowadzą do przekonującego uzasadnienia podjęcia tematu udziału NMU w rozwoju RJG. Rozdział ten świadczy o tym, że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematu i jest zorientowana w bieżącym piśmiennictwie naukowym. Jedyne, czego mi nieco zabrakło to dokładniejszy opis znaczenia klinicznego NMU i jej receptorów w RJG. Czy wiadomo coś o znaczeniu prognostycznym wymienionych białek? Poprosiłabym Doktorantkę o komentarz, co rozumie przez stwierdzenie (str 10), że mutacje genu *TP53* (punktowe) prowadzą do utraty funkcji kodowanego białka.

**Cel pracy** został określony jednoznacznie i wystarczająco. Głównym zamierzeniem badawczym była ocena oddziaływania NMU na modelowe mikrośrodowisko nowotworu poprzez weryfikację hipotezy, że NMU wydzielona przez komórki nowotworowe reguluje aktywność makrofagów oraz komórek śródbłonna w sposób sprzyjający rozwojowi RJG. Weryfikacji hipotezy posłużyła realizacja celów szczegółowych obejmujących kolejno:

1. Stworzenie modelu komórek RJG ze stabilną nadekspresją i wysokim poziomem wydzielania NMU;
2. Opracowanie metody różnicowania monocytów i polaryzacji do makrofagów o różnych fenotypach;
3. Określenie charakterystyki modelowych monocytów, makrofagów i komórek śródbłonna pod względem ekspresji NMU i NMURs na poziomie mRNA i białka;



4. Ocenę aktywności receptorów dla NMU w makrofagach i komórkach śródbłonna;
5. Ocenę zmian fenotypowych i funkcjonalnych w komórkach mikrośrodowiska pod wpływem NMU;
6. Ocenę wpływu czynników wydzielonych przez komórki modelowe makrofagów pod wpływem NMU na migrację linii komórkowej RJG.

Cel pracy został zobrazowany schematem badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej, który niewątpliwie ułatwia poruszanie się po pracy, natomiast bardzo by zyskał w moim odczuciu, gdyby został omówiony chociaż w skrócony sposób, bezpośrednio poniżej schematu.

Rozdział **Materiały i Metody** w większości został przygotowany starannie i szczegółowo. Przygotowano kompleksowe zestawienie używanych odczynników i linii komórkowych, natomiast zabrakło mi listy sprzętów i stosowanego oprogramowania. Według mnie również w tym rozdziale powinna się pojawić informacja na temat materiału pochodzącego od dawców, wraz z opisem kryteriów włączenia do badania i liczebnością tej grupy. Na podstawie tekstu pracy trudno się zorientować, od ilu osób pochodził materiał do badań i jak szybko od pobrania był procesowany, co może mieć istotne znaczenie. Z dalszej części pracy można wywnioskować, że ekspresja NMU w monocytach zależna była od dawcy, od którego pochodził dany materiał. W przypadku stosowanych przeciwciał warto by wskazać również numer klonu, sama nawa producenta nie zawsze pozwala zidentyfikować jednoznacznie dane przeciwciało.

Przechodząc do metod, w pracy stosowano szerokie spektrum technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej, w tym metody hodowli komórkowej, stabilnej modyfikacji komórek, analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu (wykonane metodami RT-qPCR) i białka (wykonane metodami Western blot, barwienia immunofluorescencyjnego), cytometrii przepływowej oraz szereg testów funkcjonalnych takich jak test chemotaksji, migracji czy tworzenia struktur pseudokapilarnych. Dodatkowo Autorka wykazała się sprawnym warsztatem analizy sygnalizacji komórkowej. Bardzo chciałabym docenić profesjonalnie przygotowany opis metod statystycznych i świadome ich stosowanie podczas wszystkich analiz.

Nawiązując do opisu tej części pracy, chciałam zapytać się, na jakiej podstawie dokonano wyboru genu referencyjnego do analizy qPCR; stosowano jeden gen: GAPDH lub  $\beta$ -aktynę. Od czego zależał wybór konkretnego genu? Według powszechnie stosowanych wytycznych dotyczących opracowywania metody qPCR (*np. Bustin SA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 55:611-22; <http://miqe.gene-quantification.info/>*) zaleca się użycie minimum 2 genów referencyjnych do analizy poziomu transkryptów i starannej walidacji ich stabilności w analizowanym materiale. Poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tych wytycznych w świetle zastosowanego układu doświadczalnego. Jaka była stabilność wybranego genu referencyjnego? Jakie były wartości Ct dla wybranego genu referencyjnego w poszczególnych oznaczeniach? Czy porównywano go z innymi kandydatami? Jaka była wydajność amplifikacji dla poszczególnych par starterów, o której Autorka wspomina na str 38?



Podsumowując tę część pracy, uważam, że metodyka była różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań. Opis metod został przygotowany starannie i pozwala dobrze zrozumieć wykonane eksperymenty. Szerokie spektrum stosowanych metod badawczych potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

**Wyniki** pracy Doktorantka przedstawia na 32 stronach w punktach dotyczących przedstawionych wyżej celów szczegółowych. Bardzo wysoko oceniam tę część pracy. Eksperymenty zostały dobrze zaplanowane, a ich dokumentacja przedstawiona rzetelnie. Szczególnie doceniam staranne opracowanie całego modelu badawczego, włączając w to utworzenie modelu komórek RJG ze stabilną nadekspresją i wysokim poziomem wydzielania NMU oraz opracowanie metody różnicowania monocytów i polaryzacji do makrofagów o różnych fenotypach aż w dwóch modelach badawczych: komórkach linii THP-1 oraz monocytach izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców. Co ważne i ciekawe oba modele dają spójne wyniki, pozwalając stwierdzić że NMU promuje zmianę fenotypu makrofagów w pronowotworowy fenotyp M2, działa na nie chemotaktycznie, zwiększa ich aktywności migracyjne i wpływa na profil wydzielanych cytokin. W przypadku komórek śródbłonna mikronaczyniowego HMEC-1 NMU wiązała się ze zmianą ich fenotypu na charakterystyczny dla mikronaczyń nowotworowych oraz z ich zwiększoną migracją i intensywnością tworzenia struktur pseudokapilarnych. Uzyskane wyniki w sposób przekonujący wskazują na promujące rozwój RJG działanie NMU wydzielanej przez komórki nowotworowe, związane zwłaszcza z jej pro-angiogennym oraz pro-migracyjnym wpływem na komórki mikrośrodowiska w opracowanym modelu badawczym.

Na koniec w **Dyskusji** Autorka w sposób dojrzały i krytyczny dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Tę część pracy czyta się bardzo dobrze. Pokazuje ona dobrą znajomość i płynne poruszanie się przez Doktorantki w tematyce związanej z prowadzonymi badaniami.

Zważywszy na bardzo ciekawe wyniki *in vitro* i ich potencjalne znaczenie kliniczne, w pracy zabrakło mi trochę analizy z wykorzystaniem materiału klinicznego lub choćby wykorzystania publicznie dostępnych baz danych. Czy Doktorantka mogłaby trochę przybliżyć temat, tego co wiadomo o NMU w kontekście kliniki NMU? Jak często występuje ekspresja NMU u chorych z RJG? Czy w konkretnym podtypie molekularnym? Czy wiadomo jakie jest znaczenie kliniczne (prognostyczne) badanej sygnalizacji NMU-NMURs? I czy różni się ono zależnie od podtypu?

Jakie dalsze badania, by Doktorantka zaproponowała w celu sprawdzenia możliwości wykorzystania terapeutycznego zidentyfikowanych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a makrofagami i komórkami śródbłonna w raku jelita grubego?

Pracę kończą dobrze napisane **Wnioski końcowe** oraz podsumowanie graficzne pracy w postaci bardzo przejrzystego schematu. Krótka legenda pod schematem, opisująca co jest na obrazku sprawiłaby, że mógłby on stanowić samodzielne, niezależne bardzo trafne podsumowanie całości pracy. **Bibliografia** obejmuje listę 86 pozycji związanych z tematem pracy; większość cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dziesięcioleciu.



Przystawione wyżej nieściśności czy drobne uchybienia nie obniżają wartości naukowej dysertacji. Cele pracy zostały z powodzeniem zrealizowane. Należy podkreślić, że tematyka badań podjęta w pracy doktorskiej jest jak najbardziej istotna i aktualna, a uzyskane wyniki w sposób znaczący poszerzyły wiedzę o roli neuromedyny U w regulacji komórek mikrośrodowiska w modelu RJG. Przedstawione i przedyskutowane przez Doktorantkę wyniki uważam za bardzo interesujące. W moim odczuciu powinny stać się podstawą dobrej publikacji pierwszoautorskiej Doktorantki, co jest tym bardziej prawdopodobne że, według danych znalezionych przeze mnie w Pubmedzie, jest ona już współautorką 2 prac dotyczących NMU (*Exp Clin Cancer Res. 2021* i *Cancers 2019*) oraz jednej dotyczącej indukcji EMT w RJG (*Cancers 2021*). Wartość merytoryczną dysertacji i uzyskanych wyników oceniam wysoko.

Podsumowując, według mnie uzyskane wyniki stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała postawiony problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazała się wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biologii komórki i biologii molekularnej oraz umiejętnością prezentacji i interpretacji wyników.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym w pełni spełnia warunki określone ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Dlatego wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Kamili Soboskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy i wyróżniającą jakość badań wnioskuję o wyróżnienie pracy. Praca dostarcza nowych, ważnych danych na temat roli NMU w raku jelita grubego, wskazując na promujące rozwój RJG działanie NMU wydzielanej przez komórki nowotworowe, związane zwłaszcza z jej pro-angiogennym oraz pro-migracyjnym wpływem na komórki mikrośrodowiska. Na szczególne wyróżnienie zasługuje rzetelność warsztatu badawczego, opracowanie nowego modelu badawczego, profesjonalnie przygotowany opis metod statystycznych i świadome ich stosowanie podczas wszystkich analiz. Warto podkreślić, że lepsze poznanie wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i komórkami niszy, które stanowi zasadniczy temat pracy, jest kluczowe dla opracowania nowych możliwości terapeutycznych. Tym samym wyniki pracy mają również potencjał aplikacyjny.

Zakład Onkologii Translacyjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
prof. dr hab. Anna Żaczek

  
Kierownik