



Ewa Kuca-Warnawin
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji
Ul. Spartańska 1
02-637 Warszawa

Akceptuję
[Signature]

Recenzowana rozprawa doktorska pt.
**„Regulacja ekspresji antygenu CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-
fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z
limfocytów B”**

została przygotowana przez lek. Ninę Miązek-Zapalę
w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem dr hab. n. med. Magdaleny Winiarskiej
oraz promotora pomocniczego dr n. med. Małgorzaty Bobrowicz
Rozprawa została przedłożona w celu uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o
zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ocena wyboru tematu i znaczenia problemu badawczego

Tematyka rozprawy obejmuje bardzo istotne zagadnienia z dziedzin immunologii nowotworów oraz hematologii. Doktorantka zdecydowała się podjąć temat regulacji ekspresji antygenu CD20 – niezwykle istotnego celu terapeutycznego w leczeniu nowotworów wywodzących się z limfocytów B.

Przeciwciała skierowane przeciw cząsteczce CD20, w szczególności rytuksymab, są stosowane w medycynie od wielu lat, jednak mechanizmy związane ze zmiennością ekspresji CD20 a co za tym idzie skuteczności immunoterapii nie zostały w pełni poznane. Problem oporności pierwotnej i wtórnej na leczenie anti-CD20 jest istotny klinicznie. Próba odpowiedzi na to pytanie nadaje pracy istotny charakter aplikacyjny.

W swojej rozprawie Autorka trafnie identyfikuje szlak PI3K/AKT jako potencjalny regulator ekspresji CD20, a jednocześnie jako ścieżkę często modulowaną farmakologicznie w terapii chorób limfoproliferacyjnych. Wybór salinomycyny jako związku modelowego, o udokumentowanym działaniu przeciwnowotworowym i plejotropowym, dodatkowo podkreśla nowatorski charakter badań.

Cele pracy i hipoteza badawcza

Cele pracy zostały sformułowane jasno, logicznie i są konsekwentnie realizowane w toku badań eksperymentalnych. Głównym celem była weryfikacja hipotezy o możliwości regulacji ekspresji CD20 poprzez szlak PI3K/AKT, natomiast cele szczegółowe obejmowały analizę wpływu inhibitorów wybranych kinaz oraz ocenę potencjalnego wykorzystania salinomycyny jako czynnika zwiększającego skuteczność immunoterapii anti-CD20.

Przegląd literatury

Wstęp rozprawy stanowi obszerny, dobrze uporządkowany i merytorycznie dojrzały przegląd literatury, obejmujący zarówno aspekty kliniczne, jak i molekularne patogenyzy nowotworów

B-komórkowych. Autorka wykazuje bardzo dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy, umiejętnie łącząc dane epidemiologiczne, kliniczne oraz mechanistyczne. Moje szczególne uznanie znalazło klarowne przedstawienie mechanizmów działania przeciwciał anti-CD20, rzetelna analiza znanych mechanizmów oporności na leczenie przeciwciałami anti CD20 oraz logiczne wprowadzenie roli szlaku BCR oraz PI3K/AKT w regulacji funkcji limfocytów B. Dobór cytowanej literatury jest adekwatny, aktualny i obejmuje kluczowe publikacje z renomowanych czasopism naukowych.

Materiał i metody

Część metodologiczna została opracowana bardzo szczegółowo i poprawnie, co świadczy o wysokim poziomie warsztatu badawczego Doktorantki. Zastosowano szeroki panel nowoczesnych technik biologii komórki i molekularnej, w tym: hodowle komórkowe, cytometrię przepływową z ilościową oceną antygenów powierzchniowych jak i sortowania komórek, metody biologii molekularnej (qRT-PCR, analiza aktywności promotora), western blotting, manipulacje genetyczne (shRNA, CRISPR/Cas9, nadekspresja genów), testy cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC).

Dobór modeli in vitro jest przemyślany i pozwala na uogólnienie uzyskanych obserwacji. Analiza statystyczna została przeprowadzona w sposób prawidłowy.

Wyniki i ich interpretacja

Przedstawione dane są obszerne, logicznie uporządkowane i ilustrowane czytelnymi rycinami oraz tabelami. W rozprawie wykazano, że drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz szlaku sygnałowego PI3K/AKT powodują spadek ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych, przekładający się na obniżenie skuteczności działania przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC). Doktorantka wykazała również, że ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych pochodzenia limfocytarnego zwiększa się w wyniku aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/AKT/FOXO. W pracy przedstawiono dowody na to, że białka z rodziny FOXO pełnią funkcję negatywnych regulatorów transkrypcji genu MS4A1 kodującego antygen CD20. Istotnym elementem rozprawy jest wykazanie, iż salinomycyna prowadzi do zwiększenia aktywności kinazy AKT w wybranych liniach komórkowych wywodzących się z limfocytów B.

Co szczególnie istotne z punktu widzenia aplikacyjnego, wykazano, że salinomycyna i pochodne z grupy jonoforów nasilają przeciwnowotworowe działanie rytuksymabu i ofatumumabu wobec komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ilości CD20 na ich powierzchni.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka zaproponowała mechanizm regulacji ekspresji CD20 indukowanej przez salinomycynę, obejmujący pozytywną regulację szlaku PI3K/AKT oraz jednoczesną negatywną regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego FOXO1. Na szczególne podkreślenie zasługuje wielopoziomowe podejście analityczne, obejmujące ocenę ekspresji genu, białka całkowitego oraz białka powierzchniowego, a także funkcjonalną ocenę skuteczności immunoterapii.

Dyskusja

Dyskusja została napisana w sposób dojrzały, krytyczny i świadczący o bardzo dobrej orientacji Autorki w aktualnym stanie badań. Wyniki własne zostały właściwie odniesione do danych literaturowych, a wnioski formułowane są ostrożnie i bez nadinterpretacji. Autorka trafnie wskazuje potencjalne implikacje translacyjne uzyskanych wyników, jednocześnie zaznaczając ograniczenia badań *in vitro*.

Uwagi krytyczne

Praca jest bardzo starannie przygotowana. Moje uwagi krytyczne mają charakter drugorzędny i nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy (dotyczą głównie drobnych aspektów redakcyjnych i stylistycznych).

Podsumowanie

Na podstawie analizy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej lek Niny Miązek-Zapały pt. „Regulacja ekspresji antygenu CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B” stwierdzam, że rozprawa ma charakter oryginalnej pracy naukowej, która dostarcza informacji istotnie poszerzających wiedzę z zakresu immunologii nowotworów oraz hematologii onkologii. Doktorantka, podejmując się tematyki badawczej, wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu podjętej tematyki badawczej, uzasadniła cel przeprowadzonych badań, odpowiednio je zaplanowała i zrealizowała. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 ust. 1 i 2 z dnia 20 lipca 2018 roku i wnioskuję o dopuszczenie lek Niny Miązek-Zapały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie

Ewa Kuca-Warnawin
dr hab. n. med. Ewa Kuca-Warnawin, prof. NIGRI

