



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, 28 kwietnia 2022 r.

Dr hab. Katarzyna Roszek, prof. UMK
Katedra Biochemii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Madej
pt. „Zaangażowanie kinazy RIPK4 w regulację szlaków NFκB oraz RAF/MEK/ERK
w czerniaku złośliwym”**

wykonanej w Zakładzie Biofizyki i Biologii Nowotworów
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,
pod opieką naukową dr hab. Agnieszki Wolnickiej-Głubisz, prof. UJ

Recenzja została przygotowana na podstawie decyzji Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UJ
z dnia 22 marca 2022 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Eweliny Madej prezentuje wyniki badań, których celem było określenie udziału kinazy RIPK4 w przekazywaniu sygnału szlakiem NFκB oraz BRAF/MEK/ERK oraz ocena wpływu tej sygnalizacji na potencjał proliferacyjny i migracyjny komórek czerniaka. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest bardzo istotna, gdyż dotychczas nie prowadzono badań nad funkcjonalną rolą kinazy RIPK4 w komórkach czerniaka. Stan wiedzy w zakresie sygnalizacji w komórkach nowotworowych jest ciągle fragmentaryczny i niewystarczający, stąd też wyniki badań uzyskane przez panią mgr Ewelinę Madej uważam za cenne, poszerzające aktualną wiedzę z zakresu biologii nowotworów. Wpisują się też ściśle w aktualne kierunki badawcze, o czym może świadczyć m.in. uzyskane finansowanie:

- z Narodowego Centrum Nauki - grant Preludium 16 oraz z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ; w obu projektach Doktorantka pełniła rolę kierownika,
- z Narodowego Centrum Nauki - grant Opus 16, w którym kierownikiem była Pani dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ, promotor Doktorantki.

Oceniana rozprawa doktorska posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych i spełnia wymogi stawiane takim opracowaniom. Napisana jest poprawnym językiem naukowym, Autorka prawidłowo używa nazewnictwa specjalistycznego. Treść została prawidłowo podzielona na rozdziały i podrozdziały; całość przedstawionej pracy obejmuje 122 strony, z czego 17 stron manuskryptu stanowi spis cytowanej literatury (207 pozycji). Rozprawa doktorska poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów.

Pierwszy rozdział właściwego tekstu rozprawy stanowi „**Wstęp**”, wprowadzający w zagadnienia związane z etiologią i epidemiologią nowotworów skóry oraz charakteryzujący najlepiej poznane szlaki sygnałowe w komórkach czerniaka. W tej części pracy Autorka opisuje również funkcje kinaz związanych z receptorami, w tym kinazy RIPK4, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Rozdział ten jest zwięzłą, logiczną i prawidłowo przygotowaną częścią pracy, co wskazuje na dobrą znajomość badanych zagadnień oraz piśmiennictwa z tego zakresu. Na docenienie zasługują ciekawe, samodzielnie opracowane przez Autorkę schematy udziału kinazy RIPK4 w szlakach sygnałowych, stanowiące graficzne podsumowanie aktualnego stanu wiedzy. Doktorantka w przekonujący sposób uzasadnia również potrzebę podjęcia badań, będących przedmiotem Jej rozprawy doktorskiej. W tym rozdziale wkraść się też, niestety, kilka błędów: merytorycznych (np. opis na ryc. 4 „receptory kinaz tyrozynowych” zamiast „receptory o aktywności kinaz tyrozynowych”), stylistycznych (np. niezręczny tytuł podrozdziału 4.2.3) oraz edytorskich (należałoby ujednoczyć sposób cytowania materiału źródłowego w opisach rycin umieszczonych w tym rozdziale), ale nie wpływają one na pozytywną ocenę tej części rozprawy doktorskiej.

Kolejną część rozprawy stanowią „**Cele pracy**”, przedstawione w formie opisowej. Wprawdzie Doktorantka nie stawia hipotez badawczych, ale formułuje jasno i prawidłowo następujące cele:

- oznaczenie i porównanie poziomu ekspresji RIPK4 w komórkach czerniaka,
- sprawdzenie czy RIPK4 uczestniczy w transdukcji sygnału szlakiem NFκB i w regulacji potencjału inwazyjnego komórek czerniaka,
- ocenę udziału kinazy RIPK4 w kaskadzie sygnałnej szlaku MAPK/ERK oraz zbadanie wpływu inhibitorów BRAF^{V600} na poziom RIPK4 i jego aktywację przez ester forbolu w komórkach czerniaka.

Część doświadczalną rozpoczynają „**Materiały i Metody**” podzielone na 14 odrębnych podrozdziałów przedstawiających schemat prowadzenia badań laboratoryjnych i opis metod używanych w poszczególnych etapach badań. W rozdziale tym Autorka pracy w sposób szczegółowy i kompletny scharakteryzowała metodykę analiz jakościowych i ilościowych na

poziomie genów i białek, analiz proliferacji, żywotności, inwazyjności czy ekspresji białek w komórkach hodowanych *in vitro*, jak i metodykę obniżania ekspresji genu *RIPK4* wykorzystaną w analizach *in vitro* i *in vivo*. Metodykę badań uzupełniają analizy bioinformatyczne prowadzone *in silico*. Bez wątplenia, jeśli chodzi o metodykę pracy, na podkreślenie zasługuje różnorodność technik biologii molekularnej i biotechnologii opanowanych przez Doktorantkę oraz Jej dojrzałość w planowaniu i realizacji zadań badawczych. Zastosowane metody analiz statystycznych wydają się również prawidłowe i pomocne w zweryfikowaniu hipotez badawczych przedstawionych w dysertacji. Opis metod badawczych nie budzi żadnych poważnych zastrzeżeń, techniki zostały prawidłowo wybrane i zastosowane, a skrupulatny ich opis pozwoli na ewentualne powtórzenie doświadczeń w przyszłości.

Rozdział „Wyniki” stanowi szczegółową dokumentację uzyskanych przez Autorkę wyników przeprowadzonych eksperymentów i ich wstępną interpretację. Obejmuje on zarówno wyniki analiz jakościowych i ilościowych na poziomie genów i białek, wyniki analiz proliferacji, żywotności, inwazyjności czy ekspresji białek w komórkach hodowanych *in vitro*, jak i rezultaty obniżania ekspresji *RIPK4* *in vitro* i *in vivo*. Dodatkową wartość stanowią wyniki badań wpływu wyciszenia *RIPK4* na globalne zmiany w profilu ekspresji genów w komórkach czerniaka, co stanowi nowoczesne podejście metodologiczne. Uzyskane dane są solidne, prawidłowo udokumentowane i zinterpretowane. Wyniki zostały przedstawione na 40 stronach, w postaci 36 zbiorczych rycin i opracowań graficznych uzupełnionych omówieniem. Ryciny są czytelne, w większości wyczerpująco opisane i przygotowane bardzo starannie. Do najciekawszych wyników, definiujących osiągnięcia przedstawionej pracy doktorskiej, można niewątpliwie zaliczyć:

- potwierdzenie wyższego (w porównaniu z komórkami prawidłowymi) poziomu *RIPK4* w liniach komórkowych czerniaka: WM115, WM266.4 oraz A375,

- obniżenie mobilności komórek czerniaka *in vitro* oraz zahamowanie proliferacji i wzrostu guza *in vivo* po obniżeniu poziomu *RIPK4*,

- wykazanie udziału kinazy *RIPK4* w transdukcji sygnału szlakiem NFκB w komórkach czerniaka oraz w procesach komórkowych, które ten szlak reguluje, np. migracji oraz proliferacji,

- wykazanie, że wemurafenib i dabrafenib oddziałują z kinazą *RIPK4* i dokują się w miejscu wiązania cząsteczki ATP oraz prowadzą do obniżenia poziomu kinazy *RIPK4* w komórkach czerniaka.

W odniesieniu do oddziaływań powyższych inhibitorów z kinazą *RIPK4* nasuwają się jednakże pewne wątpliwości co do interpretacji wyników – skoro inhibitory potencjalnie mogą wiązać się w miejscu wiązania ATP (substratu), to powinny hamować aktywność

kinazową, a niekoniecznie ekspresję białka enzymatycznego. Czy jest możliwe oznaczenie aktywności kinazowej enzymu i potwierdzenie w ten sposób wyników dokowania? W jaki sposób można wytłumaczyć zmiany ekspresji RIPK4 wywołane inhibitorami BRAF^{V600?}

Ponadto, w kilku miejscach tej części rozprawy, niefortunny dobór zawartości podrozdziałów nastręczył trudności w zrozumieniu toku doświadczeń, np. w podrozdziale 7.2 („Charakterystyka modelu badawczego”) Autorka w pierwszym zdaniu deklaruje, że „do dalszych badań nad rolą kinazy RIPK4 wykorzystano dwie linie komórkowe czerniaka amelanotycznego – WM266.4 oraz A375”, po czym wyniki zawarte w tym podrozdziale i ujęte na rycinie 12 przedstawiają charakterystykę wszystkich trzech linii komórkowych. Czy zatem zamieszczone wyniki dotyczące fenotypu komórek miały wpływ na wybór modelu czy też nie? Z kolei podrozdział 7.3.12 „Efekt wyłączenia ekspresji genu *RIPK4* na wzrost guza w modelu *in vivo*” mógłby stanowić funkcjonalne potwierdzenie wszystkich zmian stwierdzonych w badaniach *in vitro*, a więc moim zdaniem powinien zostać umieszczony po rozdziale 7.4. Kwestią dyskusyjną są też wyniki analizy ekspresji RIPK4 w guzach u myszy (rycina 11 w podrozdziale 7.1.), które uzyskano po wszczepieniu komórek linii A375 i WM266.4, mimo iż największe różnice w ekspresji *in vitro* stwierdzono między komórkami czerniaka pierwotnego (WM115) a przerzutowego (WM266.4) – proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, co zdecydowało o wyborze tych komórek?

Autorka nie uniknęła w tym rozdziale także kilku drobnych błędów merytorycznych, np. opis osi Y na rycinie 9B (powinien brzmieć „relatywny poziom białka”) czy sformułowanie „w obrębie kieszeni aktywacyjnej” na stronie 85 (raczej chodzi tu o centrum aktywne enzymu) oraz błędów stylistycznych, np. określenie „przyhamowanie wzrostu” na s. 82 (lepiej brzmiałoby „zmniejszenie tempa wzrostu/prolifracji”).

W „Dyskusji” Doktorantka podjęła się próby oceny uzyskanych wyników badań własnych na tle dostępnej literatury światowej, w szczególności porównując w tym zakresie komórki czerniaka z innymi nowotworami. Autorka ustosunkowała się do rezultatów swoich badań, porównując i konfrontując je z dostępnymi danymi literaturowymi. Wykazała przy tym znaczną znajomość literatury przedmiotu, ale też pewną ostrożność interpretacyjną w odniesieniu do zebranych wyników, co dowodzi dojrzałości Autorki jako badacza. Z drugiej strony, podczas czytania tej części rozprawy odczułam też pewien niedosyt dotyczący wyjaśnienia „kontekstu komórkowego”, o którym jest mowa w kilku miejscach dyskusji jako o czynniki determinującym odpowiedź komórek czerniaka. Jak Doktorantka rozumie „kontekst komórkowy” w odniesieniu do własnych badań oraz generalnie w odniesieniu do szlaków sygnalizacyjnych?

Rozprawę dokorską kończy rozdział „**Wnioski końcowe**”, w którym umiejtność wyważonej oceny uzyskanych wyników umożliwiła Autorce sformułowanie czterech rzeczowych, trafnych wniosków. Ostateczna konkluzja dysertacji jest taka, iż badana kinaza

RIPK4 w komórkach czerniaka, poprzez wpływ na sygnalizację wewnątrzkomórkową, może stanowić ważny element progresji nowotworu oraz jego odpowiedzi na leczenie.

Cytowana w pracy doktorskiej literatura obejmuje 207 pozycji - dobór bogatego oraz w głównej mierze najnowszego piśmiennictwa, zarówno anglo- jak i polsko-języcznego, wskazuje na opanowanie przez Autorkę umiejętności wykorzystania literatury źródłowej. Wykorzystanie literatury nie budzi zastrzeżeń. Natomiast, z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na błędy i brak zachowania jednorodności w zapisie cytowanej literatury, przykłady których wskazuję poniżej:

- pozycja 2 – błędy literowe w tytule opracowania i nazwie wydawnictwa,
- pozycje 8, 17, 18 i inne – wymienieni są wszyscy autorzy niezależnie od liczby, a w poz. 7, 10, 21 i innych - tylko trzech pierwszych współautorów i pozostali jako „et al.” Z kolei w pozycji 192 wszyscy współautorzy wymienieni są z pełnymi imionami - należałoby ujednoczyć sposób cytowania,
- poz. 117, 189, 204 – zastosowano czcionki niejednolite z pozostałymi pozycjami,
- dobrą praktyką w edycji tekstu jest też justowanie zawartości stron, dotyczy to również spisu literatury.

Na zakończenie mojej oceny rozprawy doktorskiej **kilka uwag ogólnych** dotyczących całości tekstu rozprawy. W pracy znajdują się błędy literowe i interpunkcyjne, błędne rozwinięcia skrótów, np. CD44 to skrót od angielskiego *cluster of differentiation*; MAPK to *mitogen-activated protein kinase*; MEK to kinaza kinazy MAP. Zdarza się użycie żargonu i tzw. skrótów myślowych, np. zwrot „obniżenie RIPK4” nie precyzuje czy Autorce chodziło o obniżenie poziomu ekspresji białka czy zmniejszenie poziomu ekspresji genu, czy oba efekty. Te niedociągnięcia oczywiście nie wpływają na pozytywną ocenę pracy doktorskiej, moim celem jest raczej zwrócenie Doktorantce uwagi i ustrzeżenie Jej przed takimi błędami w przyszłości, np. podczas przygotowania artykułów do czasopism naukowych.

Podsumowując, recenzowana **rozprawa doktorska mgr Eweliny Madej pt. „Zaangażowanie kinazy RIPK4 w regulację szlaków NFκB oraz RAF/MEK/ERK w czerniaku złośliwym” stanowi spójną całość i w pełni zasługuje na pozytywną ocenę.** Dzięki odpowiednio zaplanowanym badaniom i wykonanym analizom cele pracy zostały zrealizowane. Zarówno rezultaty doświadczeń, jak i wynikające z nich wnioski, są wartościowe, wnoszą nowe oryginalne dane naukowe do rozwoju dyscypliny i zasługują na upowszechnienie. Zgłoszone do pracy uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny oraz służą wskazaniu pewnych zagadnień i obszarów wartych rozważenia czy analizy w szerszym kontekście.

Uwzględniając wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej, a także zakres wykonanych oryginalnych badań, stwierdzam, że przedłożona do oceny **rozprawa mgr Eweliny Madej w pełni spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym** z dnia 14 marca 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami. Tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o **dopuszczenie mgr Eweliny Madej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora** w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Biorąc pod uwagę wysoką ocenę rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Kierownik
Katedry Biochemii

dr hab. Katarzyna Roszek, prof. UMK