

Gdańsk, 4.05.2022

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Eweliny Madej z tytułu magistra
**„Zaangażowanie kinazy RIPK4 w regulację szlaków NFκB
oraz RAF/MEK/ERK w czerniaku złośliwym”**
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Wolnickiej-Głubisz, Prof.UJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Eweliny Madej jest oryginalną pracą doświadczalną poświęconą poszukiwaniu funkcji biologicznych kinazy RIPK4 w biologii komórek czerniaka.

Kinaza RIPK4 została opisana ponad 20. lat temu należąca do rodziny białek RIP (receptor-interacting proteins), które oddziałują z receptorami błonowymi. Kinazy te uczestniczą w szlakach sygnalizacyjnych różnych procesów komórkowych np. proliferacji, różnicowaniu i są elementami kontroli przeżycia oraz śmierci komórek.

Praca liczy ponad 120 stron i jest podzielona w typowy sposób na wstęp (31 stron), materiał i metody (19 stron), wyniki (40 stron), dyskusję (10 stron) oraz piśmiennictwo (207 pozycji). Poza wymienionymi rozdziałami Autorka umieściła spis skrótów, cele pracy, streszczenie i wnioski końcowe. W tekście zamieszczono Ryciny i Tabele.

We wstępie obejmującym 18. stron Doktorantka przedstawia stan wiedzy na temat patogenezы i epidemiologii czerniaka, zaburzeń głównych szlaków sygnalizacyjnych w komórkach czerniaka oraz roli kinaz RIP, a szczególnie RIPK4 w procesie nowotworzenia oraz biologii naskórka. Wstęp świadczy o bardzo dobrej ogólnej wiedzy Doktorantki na tematy będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zagadnienia wprowadzające zostały przedstawione w sposób obszerny i umożliwiły postawienie zasadniczych celów pracy, związanych z rolą kinazy RIPK4 w biologii czerniaka, szczególnie w procesach sprzyjających potencjałowi inwazyjnemu komórek tego nowotworu.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka przedstawiła wykorzystane metody z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej (western blot, PCR, cytometria przepływową, wyciszenie genu z udziałem siRNA i metodą CRISPR-Cas9, sekwencjonowanie nowej generacji, modelowanie molekularne, testy komórkowe oceniające: migrację, proliferację, metabolizm, apoptozę). Liczba wykonanych testów jest imponująca i świadczy o nabytych umiejętnościach ważnych dla kontynuacji

pracy naukowej. Doktorantka przy wykonywaniu niektórych z nich współpracowała z innymi zespołami naukowymi, co także jest bardzo istotne w pracy badacza.

Doktorantka jako model badawczy wybrała linię komórkową czerniaka A375 oraz parę linii, z których jedna jest formą pierwotną czerniaka – linia WM115, a druga jej formą przerzutową – linia WM266.6. Do szczegółowych badań molekularnych wybrano komórki czerniaka o najwyższym poziomie kinazy RIPK4 oraz różniące się fenotypem, czyli linię A375 (fenotyp nabłonkopodobny) i WM266.6 (fenotyp mezenchymalny). Doktorantka wybrała linie amelanotyczne czerniaka różniące się fenotypem, gdyż z tym wiąże się także tempo proliferacji oraz zdolność do migracji – cechy ważne przy ocenie zdolności o tworzenia przerzutów. A375 to komórki nabłonkopodobne, o mniejszej zdolności do migracji i czasie podwojenia 17. godzin, zaś WM266.6 o fenotypie mezenchymalnym, większej ruchliwości, podwajają się po dłuższym czasie tj. 26. godzinach. Na podkreślenie zasługuje wybór linii czerniaka o tym samym statusie procesu melanogenezy, gdyż forma melaniczna i amelanotyczna komórek czerniaka to zupełnie inne biologicznie komórki.

Wyniki badań zostały przedstawione na kolejnych 39. stronach wraz z graficznymi ilustracjami (36) zaobserwowanych różnic.

Porównawcza analiza udziału czynnika NFκB w ścieżce sygnalizacyjnej kinazy RIPK4 w badanych liniach czerniaka została przeprowadzona poprzez aktywację kinazy estrem forbolu (PMA) oraz wyciszenie ekspresji genu RIPK4 (siRNA). PMA, w czasie do dwóch godzin, prowadził do wzrostu zawartości ufosforylowanej formy białka p65 (P-p65), hiperfosforylacji kinazy RIPK4, spadku zawartości białka IκBα i RIPK4 w obu liniach, co w interpretacji Doktorantki świadczy o aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej z udziałem czynnika NFκB. Wynikiem działania PMA była także zwiększona mobilność komórek, a wydłużona do 48. godzin inkubacja, uwidoczniała zróżnicowaną odpowiedź badanych linii czerniaka na działanie PMA, co przejawiało się obniżonym w linii WM266, a podwyższonym w A375, poziomem białka P-p65. Prowadziło to także w komórkach WM266 do obniżenia zdolności migracyjnych i bardziej nabłonkopodobnej morfologii komórek, a w A375 do wzrostu ruchliwości przy zachowaniu nabłonkopodobnej morfologii komórek.

Technika siRNA z wysoką efektywnością pozwoliła na wyciszenie genu RIPK4 w obu badanych liniach (obniżenie mRNA i białka RIPK4) i obserwacje zmian dotyczące migracji, struktury cytoszkieletu, proliferacji, poziomu ATP i uruchamiania dróg śmierci komórek. Stwierdzono, iż w linii A375 wyciszenie RIPK4 wywiera mniejszy efekt na poziom białek szlaku NFκB, niż w komórkach

WM266.4. Do oceny zdolności migracyjnych komórek z wyciszonym genem RIPK4 wykorzystano aż trzy testy: metodę wideo-mikroskopii poklatkowej, test zarastania rasy oraz test transmigracji. **Czy nie wystarczyłby jeden test, co wnosi do obserwacji zdolności migracyjnych komórek każdy z tych testów ?**

Obniżenie poziomu RIPK4 w WM266.4 wpływa na zmniejszenie ruchliwości komórek (obserwacja 8. godz. wideo-mikroskopia), wolniejsze zarastanie rasy (48. godz.) i mniejszą liczbę komórek przechodzących przez membranę (96. godzin). Zróżnicowanie czas obserwacji nie ułatwia porównywania wyników tych metod, tym bardziej, że różnice w zachowaniu komórek w teście transmigracyjnym pojawiły się dopiero po 96. godzinach obserwacji.

Dlaczego testu zarastania rasy i transmigracji nie wykonano na A375 (na rycinie 21 jest tylko ocena ruchliwości)?

Doktorantka postanowiła także sprawdzić, czy obniżenie poziomu RIPK4 wpływa na poziom mRNA dla fibronektyny (białko macierzy pozakomórkowej) oraz metaloproteinaz 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) degradujących macierz zewnątrzkomórkową, co mogłoby również wpływać na zdolności migracyjne badanych komórek. W obu liniach z wyciszonym RIPK4 obserwowano obniżenie transkryptu dla MMP-2 i fibronektyny, ale zabrakło tu potwierdzenia z poziomu białka (western blot). Nie zaobserwowano, aby wyciszenie RIPK4 wpłynęło na zmianę morfologii komórek o fenotypie mezenchymalnym WM266.4, jak i nabłonkopodobnym A375, ani zmianę poziomu białek Snail-1, Twist-1, N-kadheryny. Jednakże analiza struktury cytoszkieletu tych komórek wykazała zaburzenia w formowaniu włókien F-aktyny oraz strukturze ognisk adhezji budowanych przez winkulinę, co stanowi ciekawą obserwację.

W kolejnych doświadczeniach Doktorantka badała wpływ wyciszenia genu RIPK4 na tempo proliferacji komórek oraz cykl komórkowy badanych linii czerniaka. Tylko w komórkach WM266.4 z wyciszoną RIPK4 dochodziło do kumulacji komórek w fazie G0/G1 i spadku odsetka komórek w fazie S, zaś linia A375 nie wykazywała zmian zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu. Obie linie nietransfekowane wykazywały podobny odsetek komórek w fazie S (ponad 30%). Ocena liczby komórek po 4. dniach od transfekcji siRNA (RIPK4.si1) wykazała podobny spadek liczby komórek w obu liniach (WM266.4 z ok. 11 mln do ok. 8 mln; A375 z ok. 14 mln do ok. 11 mln). **Czy różnica dla linii WM266.4 była znamienista statystycznie? (na wykresie 28A nie zaznaczono znamienności).**

Analiza poziomu białek regulujących cykl komórkowy, kinaz cdk, wykazała obniżenie poziomu transkryptów CDK2 i CDK6 oraz wzrost CDK14 w obu liniach czerniaka po wyciszeniu RIPK4 (RIPK4.s1). Zaobserwowane różnice były szczególnie widoczne w linii WM266.4. Doktorantka metodą western blot oceniła m.in. obecność białka Rb1, ale przedstawiono dane tylko z jednego doświadczenia bez średnich wartości (Ryc. 29B i D). Wyniki z przedstawionego doświadczenia wskazują, że wyciszenie RIPK4 w linii WM266.4 prowadzi do spadku poziomu zarówno ufosforylowanej, jak i podstawowej formy białka RB1. Natomiast w linii A375 do wzrostu po 48 godzinach, ale w obu liniach nie było różnic w zmianach między RB-1 i P-RB1.

Otrzymane wyniki dotyczące oceny udziału RIPK4 w regulacji proliferacji komórek obu linii czerniaka, nie są łatwe do jednoznacznej interpretacji, ale Doktorantka w sposób dojrzały i rozważny próbuje wyjaśniać zaobserwowane zmiany.

Po wyciszeniu RIPK4 nie zaobserwowano zmian mogących świadczyć o indukcji śmierci komórek czerniaka WM266.4. drogą apoptozy i nekroptozy.

Opisane do tej pory wyniki, uzyskane bardzo różnymi technikami badawczymi, pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż „kinaza RIPK4 poprzez regulacje przekazu sygnału szlakiem NFκB, wpływa na ruchliwość i proliferację komórek czerniaka, przez co zwiększa ich potencjał inwazyjny”.

Wpływ obniżenia poziomu RIPK4 przy pomocy systemu CRISPR-Cas9 umożliwił Doktorantce ocenę wzrostu klonów komórek guza w warunkach in vivo i tak średnia masa guzów WM266.4 stanowiła zaledwie 0,1% masy, a dla A375 ok. 33% masy guzów kontrolnych, po 32. dniach wzrostu. Te obserwacje w sposób wyraźny wskazują, że udział kinazy RIPK4 we wzroście czerniaka zależy od cech biologicznych komórek czerniaka, co jest zgodne z obserwowaną dużą heterogennością komórkową tego nowotworu.

Kolejna grupa doświadczeń miała na celu ocenę udziału RIPK4 w ścieżce sygnalizacyjnej szlaku BRAF/MEK/ERK. Białko PEBP-1 jest negatywnym regulatorem kaskady sygnałowej MAPK/ERK oraz NFκB. Analiza porównawcza poziomu ekspresji białek RIPK4 i PEBP-1 w liniach komórkowych czerniaka oraz w melanocytach wykazała odwrotną zależność w poziomie tych białek. Melanocyty przy praktycznie braku obecności białka RIPK4 miały najwyższy poziom białka PEBP-1 wśród analizowanych komórek. Poziom białka PEBP-1 w badanych czerniakach, WM266.4 i A375, w których poziom RIPK4 był najwyższy, obniżał się o ponad 70%. Wyciszenie RIPK4 nie zmieniało poziomu białek formy podstawowej i ufosforylowanej: PEBP-1, BRAF, MEK, ERK.

Doktorantka wykazała, że badane linie czerniaka mają mutacje w genie BRAF w pozycji 600 i tak walinę w linii WM266.4 zastępuje kwas asparaginowy, a w A375 kwas glutaminowy. W związku z tym postanowiła sprawdzić, jak małowcząsteczkowe inhibitory zmutowanego w pozycji 600 białka BRAF (wemurafenib, dabrafenib), wpłyną na RIPK4. Oba związki obniżyły aktywność mitochondriów (test MTT) już po 24. godzinach oraz zmniejszyły poziom białka RIPK4 i P-ERK. Zastosowanie inhibitora dla kinazy ERK wykazało, że inhibitory BRAF^{V600} wpływają na poziom RIPK4 niezależnie od ERK.

Wykonana analiza dokowania molekularnego potwierdziła, że zarówno dabrafenib, jak i wemurafenib mogą bezpośrednio oddziaływać z domeną kinazową mysiego białka Ripk4, który wykazuje wysoką homologię z ludzkim białkiem RIPK4. Uzyskane wyniki wskazują, że chociaż kinaza RIPK4 bezpośrednio nie wpływa na szlak sygnalizacyjny BRAF/MEK/ERK, to może stanowić alternatywny cel dla inhibitorów białka BRAF^{V600} w czerniaku. To bardzo cenna obserwacja wobec trwających poszukiwań dróg obejścia pojawiającej się oporności w trakcie leczenia czerniaka inhibitorami zmutowanego białka BRAF.

Ciekawych wyników dostarczyła analiza wyciszenia RIPK4 w komórkach WM266.4 na zmiany ekspresji genów, wykonana metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Zmiany dotyczyły głównie transkryptów białek związanych z adhezją komórkową, regulacją organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, chemotaksją oraz produkcją cytokin. Obniżenie RIPK4 powodowało także zmianę w poziomie mRNA kodujących białka związane z kaskadą sygnałową MAPK, w tym ze szlakiem JNK oraz ERK1/2, a także białek kontrolujących apoptozę, autofagię oraz proliferacji. Wykazano, że pod wpływem obniżenia ekspresji RIPK4 zmianie ulega 30. transkryptów, które mogą być regulowane przez szlak NFκB. Te wyniki potwierdziły obserwacje Doktorantki i mogą wskazać dalsze kierunki badań.

Przytaczając najważniejsze wyniki Doktorantki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej chciałam nakreślić bardzo szeroki zakres poczynionych obserwacji wykonanych różnymi metodami oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań. W ocenie recenzenta takie spojrzenie na porównawczą analizę zachodzących procesów w różnych biologicznych formach danego nowotworu jest niezwykle cenne i potrzebne.

W dyskusji Doktorantka odnosi swoje wyniki do obserwacji innych autorów, co w sposób wyraźny ilustruje brak informacji o roli kinazy RIPK4 w patogenezie czerniaka i oryginalność

uzyskanych wyników. Cieszę się, że zagadnienie wpływu kinazy RIPK4 na sekrecję cytokin (IL-6, IL-8) przez komórki czerniaka umieszcza Doktorantka w planach dalszej pracy badawczej. Na uwagę zasługuje graficzna propozycja udziału kinazy RIPK4 w ścieżce sygnalizacyjnej szlaku NFκB (Ryc.45) zaproponowana przez Doktorantkę.

Wnioski końcowe pracy odpowiadają założonym celom.

Uwagi :

1. Doktorantka używa określenia „ilość” do obiektów policzalnych zamiast „liczba” np: ilość komórek
2. Termin „waga” powinien być zastąpiony „masą”, bo waga to urządzenie do pomiaru masy.
3. Analizę statystyczną małych liczebnie prób należałoby wykonać testami nieparametrycznymi, po sprawdzeniu spełnienia warunków do wykonania testów parametrycznych (rozkład normalny cechy, analiza wariancji).
4. W metodach statystycznych pominięto test Walda (wyniki ekspresji genów z sekwencjonowania nowej generacji) oraz test Wilcoxona (ryc.10)

W podsumowaniu stwierdzam, iż wyniki badań przeprowadzonych przez Panią mgr Ewelinę Madej stanowią wartościowy i oryginalny wkład w poszerzenie wiedzy o roli kinazy RIPK4 w biologii komórek czerniaka, wskazując na rolę onkogenną możliwych zmian tej kinazy w patogenezie tego nowotworu. Uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora zawarte w ustawie (Ustawa 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.)

Zwracam się zatem 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.

K I E R O W N I K
Zakładu Embriologii
w Katedrze Anatomii


dr hab. Mirosława Cichorek, prof. ucz.