

Kraków, dn. 01.11.2019



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Prełowskiej pt "Ocena roli kinazy
MLK4 w procesach nowotworzenia i progresji potrójnie negatywnego raka piersi"**

Terapia potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC) jest szczególnie trudna i perspektywy wyleczenia chorych z tym nowotworem są dalece niezadowalające. Mimo stosowanych chemioterapii rokowanie chorych na TNBC jest najgorsze ze wszystkich raków piersi, a problem ten dotyczy bardzo dużej liczby pacjentek, bowiem TNBC stanowi 15-20% wszystkich raków piersi.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Moniki Prełowskiej przygotowana została pod kierunkiem prof. dr hab. Dominiki Nowis oraz promotora pomocniczego dr Anny Marusiak w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach studiów doktoranckich w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Celem badań mgr Moniki Prełowskiej było lepsze poznanie roli kinazy MLK4 w procesach nowotworzenia i progresji TNBC. Do tego problemu Doktorantka podeszła bardzo wszechstronnie i przygotowana rozprawa może być uznana za bardzo dobrą pod względem zaproponowania hipotezy badawczej i zadań badawczych, wyboru narzędzi badawczych, jakości uzyskanych wyników, ich dyskusji, oraz sposobu prezentacji. Praca doktorska mgr Moniki Prełowskiej zwraca uwagę starannością przeprowadzenia doświadczeń, obejmujących zarówno analizy dostępnych genetycznych baz danych, szerokie badania in vitro, badania in vivo oraz analizę materiału klinicznego.

Wybór kinazy MLK4 jako najmniej zbadanej kinazy z rodziny kinaz MLK okazał się słuszny. Podyktowany on był także faktem niejednoznacznej dotychczas roli tej kinazy opisywanej w literaturze a dotyczącej rozwoju i progresji nowotworów, a zarazem wyników wskazujących, że rola ta może być istotna.

Praca doktorska mgr Moniki Prełowskiej ma klasyczny układ i przygotowana jest bardzo poprawnie pod względem językowym i edytorskim. Lektura tekstu

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Kierownik zakładu
Prof. dr hab. Józef Dulak

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6375

tel. +48 506 006 083

fax. +48 12 664 6918

jozef.dulak@uj.edu.pl

<http://www.zbm.wbbib.uj.edu.pl>

rozprawy sprawia dużą przyjemność – Doktorantka najwyraźniej posiadała umiejętność jasnego i precyzyjnego, a zarazem zwięzłego przekazywania informacji oraz zdolność krytycznej analizy wyników. Ponieważ w zasadzie nie mam zastrzeżeń do żadnej z części rozprawy, więc nie będę szczegółowo omawiał zawartości Wstępu, Materiałów i Metod, Wyników oraz Dyskusji. Ograniczę się przede wszystkim do omówienia celów, jakie postawiła sobie Doktorantka, zastosowanych metod oraz uzyskanych wyników.

Opierając się na niejednoznacznych dotychczas wynikach, a także zwracając uwagę, że duża częstość mutacji genu *MLK4* występuje w przerzutach u chorych na raka piersi Doktorantka postawiła sobie następujące cele:

- 1) Zbadanie wpływu selektywnego wyciszenia *MLK4* na procesy wzrostu, proliferacji, migracji oraz inwazji komórek TNBC;
- 2) Zbadanie wpływu selektywnego wyciszenia *MLK4* na wzrost ludzkich nowotworów TNBC w modelu *in vivo* (ksenoprzeszczepy u myszy);
- 3) Ocena skuteczności drobnocząsteczkowych inhibitorów *MLK4*;
- 4) Określenie ekspresji *MLK4* w materiale klinicznym (bioptatach) od chorych z rakiem piersi).

Tak zarysowane cele posłużyły do weryfikacji hipotezy o roli zwiększonej ekspresji kinazy *MLK4* w procesach nowotworzenia i progresji TNBC.

Metodyka zastosowana przez Doktorantkę jest bardzo bogata. Prezentację wyników rozpoczyna od analizy danych genomowych i transkryptomowych dostępnych w bazie TCGA, obejmujących guzy od 818 chorych na inwazyjnego raka piersi oraz 82 chorych na TNBC. Analizy (wykonane częściowo przez inną osobę), co Doktorantka wyraźnie zaznacza w pracy, pozwoliły na wykazanie, że inwazyjny rak piersi charakteryzuje się amplifikacją genu oraz zwiększoną ekspresją mRNA dla kinazy *MLK4*. U chorych na potrójnie negatywnego raka piersi odsetek tych chorych jest jeszcze większy i sięga 54%. Wyniki te wydają się być znaczące, bowiem pozostałe kinazy z rodziny *MLK* wykazują mniejszą w porównaniu z *MLK4* częstość amplifikacji u chorych z inwazyjnym rakiem piersi oraz TNBC. Jak wskazały dalsze analizy zwiększona ekspresja *MLK4* jest związana z krótszym czasem całkowitego przeżycia oraz czasem przeżycia wolnego od nawrotu chorych na raka piersi.

Przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo* na modelu zwierzęcym przeszczepu ludzkich komórek raka piersi potwierdziły znaczenie *MLK4* w TNBC. Doktorantka wykorzystwała do tych badań liczne narzędzia badawcze, które zostały bardzo dobrze opisane w rozdziale Materiały i Metody. Do zbadania kilkunastu linii

komórkowych raka piersi wykorzystwała klasyczne techniki *in vitro* badania proliferacji, migracji i zdolności przerzutowania nowotworów. Na uwagę zasługuje wszechstronna analiza wpływu ekspresji MLK4 – Doktorantka wykorzystwała w tym celu hamowanie ekspresji za pomocą siRNA, stworzyła linie komórkowe, w których uzyskiwała wyciszenie ekspresji MLK4 poprzez indukcję za pomocą doksycykliny ekspresji shRNA kodowanego w wektorze regulowanym przez ten antybiotyk, uzyskała komórki z całkowicie wyłączoną ekspresją genu MLK4 poprzez zastosowanie edycji CRISPR/Cas9 i wreszcie uzyskała linie komórkowe z nadekspresją MLK4. Badania przeprowadzała w klasycznych hodowlach 2D a następnie częściowo zweryfikowała w hodowlach sferoidowych. Dzięki tak wszechstronnie przeprowadzonym analizom uzyskała wyniki, które wzajemnie się uzupełniają i potwierdzają. Z tych powodów, analizując przedstawione przez Doktorantkę dane, wykresy i fotografie można się w pełni zgodzić z jej stwierdzeniami, że MLK4 zwiększa proliferację i potencjał klonogeny komórek TNBC, nasila ich zdolności migracyjne oraz inwazyjne, potwierdzone zarówno w hodowlach komórkowych 2D jak i w modelu 3D (sferoidów).

Rola MLK4 została następnie zweryfikowana w badaniach *in vivo*. Wykorzystując uzyskane linie komórkowe z shRNA dla MLK4 indukowanym przez doksycyklinę Doktorantka wykazała, że wyciszenie ekspresji genu MLK4 prowadzi do znacznego zahamowania wzrost guzów TNBC u myszy. Zwraca uwagę wykonanie prawidłowych doświadczeń kontrolnych, w których Doktorantka zbadała wpływ samej doksycykliny na komórki raka HCC1806, wykluczając działanie tego związku.

Kolejna część pracy wskazuje na możliwość zastosowania drobnocząsteczkowych inhibitorów MLK4, które jak Doktorantka wykazała we wstępnych doświadczeniach, hamują wzrost i tworzenie kolonii komórek TNBC oraz hamują wzrost sferoidów w modelu 3D.

Potwierdzeniem analiz genomowych i transkryptomowych, badań *in vitro* oraz *in vivo* są przedstawione na końcu wyniki oceny ekspresji MLK4 w bioptatach chorych na TNBC. Analizy immunohistochemiczne wykonane na skrawkach parafinowych pochodzących od 129 chorych, w tym 49 chorych z TNBC wykazały, że komórki TNBC wykazują zwiększoną ilość białka MLK4, a obecność tej kinazy koreluje z wystąpieniem przerzutów do węzłów chłonnych. Uzasadnia to konkluzję Autorki, że kinaza MLK4 może być związana z agresywnym fenotypem TNBC i może regulować proces tworzenia jego przerzutów.

Uzyskane wyniki Doktorantka krytycznie omawia w rozdziale „Dyskusja” i ten fragment pracy po raz kolejny dowodzi umiejętności i wiedzy Autorki, w pełni potwierdzających jej kwalifikacje do uzyskania stopnia doktora. Autorka nie tylko omawia uzyskane wyniki, ale wyjaśnia, dlaczego nie wszystkie doświadczenia udało się przeprowadzić. Dotyczy to planowanych doświadczeń z zastosowaniem w modelu *in vivo* komórek z ekspresją MLK4 wyłączoną za pomocą edycji CRISPR/Cas9. Taki model byłby właściwą weryfikacją omówionego powyżej modelu wyciszenia ekspresji za pomocą shRNA, jednak jak zauważa Doktorantka, nie było możliwe jego wykonanie, bowiem klony komórek po edycji CRISPR/Cas9 mimo początkowego spowolnienia proliferacji po pewnym czasie w hodowli nabierały odwrotnych właściwości. Zdaniem Doktorantki mogło to być wynikiem kompensacyjnego przejęcia roli MLK4 przez inną kinazę. W swojej krytycznej dyskusji Doktorantka zwraca także uwagę na wstępny charakter badań nad wykorzystaniem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy MLK4, których ograniczeniem jest mała specyficzność.

Uzyskane wyniki oraz ich analiza w pełni potwierdzają konkluzję Doktorantki, stwierdzającą, że MLK4 odgrywa znaczącą rolę w rozwoju TNBC i może tym samym stanowić obiecujący cel terapeutyczny. Zwraca także uwagę, w którym kierunku powinny zmierzać te badania, podkreślając znaczenie zaprojektowania specyficznego inhibitora tej kinazy.

Jak już zaznaczyłem kilkakrotnie, rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Prełowskiej zasługuje na uznanie. Jest ona przykładem bardzo dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych doświadczeń, dowodzi umiejętności Doktorantki zarówno w zakresie prezentacji wyników oraz ich krytycznej analizy. Wskazuje, że Doktorantka posiada wszystkie cechy badacza, jakich oczekuje się od kandydatów do stopnia doktora.

Z nielicznych krytycznych uwag czy też sugestii chciałbym wskazać na wstępny charakter badań *in vivo* na modelu zwierzęcym. Oprócz problemów z linią modyfikowaną CRISPR/Cas9, omówionych przez Doktorantkę, brakuje np. wyników z analiz histologicznych guzów. Ciekaw jestem, czy Doktorantka takie posiada, czy też badania te są zaplanowane na przyszłość. Mam także wątpliwości co do używania przez Doktorantkę określenia „wzrost” komórek nowotworowych w badaniach *in vitro*. Termin ten wydaje się bowiem obejmować proliferację bądź zdolność do tworzenia kolonii, a używany w sposób przez Doktorantkę zdaje się sugerować jakąś odrębną właściwość komórek nowotworowych. Nie jest bowiem tym samym, czym

wzrost sferoidów w modelu 3D czy guzów *in vivo*, bowiem w tym dwóch przypadkach Doktorantka stosuje określoną miarę wzrostu.

W przedstawionych wynikach analiz Western blot oraz na Ryc. 15 brak informacji o liczbie wykonanych powtórzeń. Badania na zwierzętach są w gestii komisji etycznej, a nie bioetycznej, jak Doktorantka napisała na stronie 54. Na tej samej stronie znalazło się także stwierdzenie, na które chcę zwrócić uwagę, gdyż rozumiejąc konieczność wzbogacania zasobu polskich słów i ich znaczenia, „literacka” część mojej osobowości burzy się na używanie określenia „dedykowany” zamiast „przeznaczony”. Zastosowane w takim znaczeniu słowo („*hodowlę myszy prowadzono w dedykowanym do tego pomieszczeniu*”) jest nieładną kalką z języka angielskiego i należy tego unikać (zainteresowanych odsyłam do publikacji popularno-specjalistycznych, np. prof. Markowskiego czy wreszcie Słownika Języka Polskiego PWN). „Dedykować” znaczy bowiem coś zupełnie innego..

Te nieliczne uwagi nie mają oczywiście wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę pracy, a przede wszystkim jakości zawartych w niej badań, co nie ulega wątpliwości jest zasługą Doktorantki, ale także jej opiekunek, prof. dr hab. Dominiki Nowis oraz dr Anny Marusiak. Oceniona rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Prełowskiej jest także kolejnym dowodem na wysoką jakość badań naukowych realizowanych w zespole prof. Dominiki Nowis.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonej analizy uważam, że rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Moniki Prełowskiej spełnia pod każdym względem wymagania zwyczajowe i ustawowe. Lektura pracy przekonuje, że Doktorantka posiada niezbędne kwalifikacje praktyczne oraz wiedzę oczekiwaną od kandydatów do stopnia doktora. W rozprawie Doktorantka dowiodła przekonująco umiejętności prezentacji wyników badań oraz ich interpretacji.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska oraz dorobek naukowy Pani mgr Moniki Prełowskiej spełniają wszystkie warunki określone w art. 186 i 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. RP Poz. 1668, dnia 30 sierpnia 2018 r.). Na tej podstawie zgłaszam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Medycyna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Moniki Prełowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę jakość przygotowanej rozprawy doktorskiej oraz fakt, iż Doktorantka jest współautorem pracy prezentującej wyniki

zawarte w rozprawie, a praca ta ukazała się bardzo dobrym czasopiśmie „Oncogene”,
uważam, że rozprawa zasługuje na stosowne wyróżnienie.

Jacek Szulc