



Wrocław, 20 listopada 2019 r.

Dziękamu MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 22-11-2018
L.dz. nr 35/2018

Ocena pracy doktorskiej mgr Dominiki Czaplińskiej zatytułowanej:
„Znaczenie biologiczne i kliniczne kinaz RSK w progresji raka piersi”

Rozwój choroby nowotworowej związany jest ze zmianami genetycznymi dotyczącymi ścieżek sygnalizacji komórkowej. Wśród nowotworów złośliwych występujących u kobiet, pierwsze miejsce, pod względem liczby zachorowań, zajmuje rak gruczołu piersiowego, prowadzący do niemal 400 tysięcy zgonów rocznie w skali świata. Badania przyczyniające się do zrozumienia mechanizmów molekularnych tej choroby są bardzo pożądane, gdyż mogą prowadzić do identyfikacji nowych celów molekularnych, które z kolei byłyby podstawą opracowania nowych terapii.

Praca doktorska mgr Czaplińskiej dotyczy badania udziału kinaz RSK i związku tych enzymów z receptorem 2 FGF (FGFR2) w progresji raka gruczołu piersiowego. Doktorat dotyczy aktualnego i ważnego zagadnienia, prezentowane wyniki są oryginalne i zostały opublikowane w formie trzech prac, których pierwszym autorem jest mgr Czaplińska. Praca doktorska została zrealizowana pod opieką merytoryczną dr hab. Anny Żaczek i dr. hab. Rafała Sądeja, którzy posiadają znaczący dorobek w badaniach mechanizmów molekularnych prowadzących do rozwoju raka piersi.

Praca doktorska mgr Czaplińskiej to napisany po polsku maszynopis liczący 85 stron, o strukturze typowej dla prac doktorskich i publikacji z obszaru nauk eksperymentalnych (*Abstract*, Streszczenie, Wstęp, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Literatura). Rozprawa napisana jest w sposób zwięzły, poprawną polszczyzną, a ilość zauważonych przeze mnie błędów jest niewielka, z wyjątkiem znacznej liczby błędów interpunkcyjnych. Oceniając redakcję pracy mam następujące uwagi:

1. Doktorantka powinna przygotować samodzielnie schematy. Wklejanie obrazków bezpośrednio z publikacji wraz z angielskimi tekstami na obrazkach obniża jakość przedstawionej pracy (np. Fig. 1 do Fig. 11).
2. Opisy pod obrazkami są zbyt ogólne i nie pozwalają na dokładną analizę przedstawionych danych. Ponadto, w języku polskim używane są terminy: rysunek lub rycina, a nie *Fig.* od angielskiego *Figure*.
3. Na przedstawionych zdjęciach z analiz mikroskopowych brakuje paska skali.

Wstęp podzielony jest na trzy zasadnicze części. Pierwsza poświęcona jest przedstawieniu raka piersi, z uwzględnieniem danych statystycznych tej choroby, jej typów, czynników ryzyka, diagnostyki i terapii. Następnie doktorantka stosunkowo szczegółowo przedstawiła kinazy RSK – ich budowę, modele aktywacji oraz udział w procesie nowotworzenia. Podobnych informacji dostarcza opis receptorów FGF, będący ostatnią częścią Wstępu. W sumie, rozdział napisany jest kompetentnie i dostarcza wszelkiej wiedzy, potrzebnej do zrozumienia dalszych części rozprawy.

Rozdziały Wyniki i Dyskusja obejmują dane eksperymentalne oraz ich wnikliwą analizę. Do najważniejszych osiągnięć doktoratu zaliczam:

1. Pokazanie, że kinaza RSK2 jest aktywowana w komórkach epitelialnych i nowotworowych piersi przez FGFR2 po związaniu liganda (FGF2). Indukowana w ten sposób progresja nowotworowa prowadzi do wzrostu komórek niezależnego od przylegania do podłoża oraz ich migrację.
2. Zaproponowanie, że RSK2 tworzy kompleks z FGFR2 i reguluje jego internalizację.
3. Pokazanie korelacji, na poziomie mRNA i białka, pomiędzy ekspresją FGFR2 i RSK2 w komórkach pobranych z guzów chorych na raka piersi. Co ważne, korelacja ta była najwyższa w przypadku potrójnie negatywnego raka piersi.
4. Wykazanie w modelu mysim wpływu RSK1 na progresję raka piersi.
5. Zaproponowanie, że obie kinazy, RSK1 i RSK2 mogą być celem molekularnym w leczeniu raka gruczołu piersiowego.

Mam następujące merytoryczne uwagi i komentarze odnośnie rozprawy doktorskiej:

1. Dobór liganda do aktywacji FGFR2 nie został w pełni poprawnie przeprowadzony. FGF2 aktywuje głównie FGFR1 i FGFR3 (izofomy c), oddziałując słabiej z FGFR2 (izofoma c), a także FGFR4. FGF1 byłby lepszym wyborem.
2. Ciekawa jest różna kinetyka aktywacji RSK2 w badanych liniach komórkowych pod wpływem FGF2. Czy doktorantka może zaproponować, skąd wynikają te różnice (Fig. 13 A)?
3. Konkluzja, że kompleks FGF2-FGFR1 nie wpływa na aktywację RSK2 w komórkach HB2 jest zbyt odważna. Uzyskana nadprodukcja FGFR1 jest nieznaczna (Fig. 13E) w porównaniu z nadprodukcją FGFR2 (Fig. 13D). Nie wykonano też eksperymentów z wyciszeniem innych, poza FGFR2, receptorów FGF, co utrudnia jednoznaczne określenie selektywnej roli FGFR2 w aktywacji RSK2. Dodatkowo Rys. 13E zawiera błędny opis (FGFR2↑ zamiast FGFR1↑).
4. Efekty biologiczne ścieżki FGFR2-RSK2 nie zostały prawidłowo wykazane. Komórki HB2 produkują FGFR1, FGFR2 i FGFR4 (i być może również FGFR3) (Fig. 12A). FGF2 jest ligandem przede wszystkim dla FGFR1c FGFR3c, ale także dla FGFR1b, FGFR2c oraz FGFR4. Poprzez stosowanie FGF2 aktywacji ulega większość receptorów FGF w komórkach HB2, więc niemożliwe jest wskazanie jednoznacznie FGFR2 jako receptora odpowiedzialnego za obserwowany efekt biologiczny. Ponadto, zastosowany inhibitor FMK blokuje jednocześnie co najmniej dwie izofomy RSK: RSK1 i RSK2 (Fig. 16). Podsumowując, eksperymenty opisane w rozdziale 5.1.3. nie wykazują, że obserwowane efekty biologiczne (migracja komórek, proliferacja) są zależne wyłącznie od ścieżki FGFR2-RSK2, a nie np. FGFR4-RSK1, itp.

3. W eksperymentach koimmunoprecypitacji brakuje analiz próbek lizatu, co utrudnia porównanie wyników eksperymentów (Fig. 17A i B). Doktorantka sugeruje, że oddziaływanie FGFR2-RSK2 jest przejściowe i może być wynikiem formowania dużego kompleksu, zawierającego również inne białka. Koimmunoprecypitacja w obecności inhibitora FGFR (PD173074) wykazała zależność wydajności oddziaływania FGFR2-RSK2 od aktywacji FGFR. Duże znaczenie miałoby określenie czy FGFR2 oddziałuje z aktywowanym RSK2 (fosfoformami RSK2). Czy takie eksperymenty zostały wykonane? Brakuje też detekcji innych izoform RSK w koimmunoprecypitacjach, co mogłoby dostarczyć istotnych informacji o specyficzności oddziaływania FGFR2-RSK2.

4. Rozdział 5.1.5.2: „RSK2 promuje internalizację FGFR2”. W eksperymentach internalizacji ponownie wykorzystano inhibitor wszystkich białek RSK, więc konkluzja jest zbyt daleko idąca. Dlaczego nie przeprowadzono eksperymentów internalizacji przy wyciszeniu RSK2, jak w Fig. 17B?

5. Konkluzja, że RSK2 nie wpływa na degradację proteasomalną FGFR2 jest zbyt wczesna, gdyż pokazano jedynie brak wpływu kinaz RSK na poziom ubikwitynylacji FGFR2, co niekoniecznie musi skutkować brakiem zmian w degradacji FGFR2 (Fig. 18B). Ubikwitynylacja receptorów może pełnić również inne funkcje, np. w regulacji komórkowego transportu receptorów błonowych.

6. Fig. 25. Różnice w poziomach białek: cykliny D3, CDK4 i CDK6 są nieznaczne, więc w celu uniknięcia nadinterpretacji powinny zostać zliczone z kilku eksperymentów i odniesione do poziomów innych białek.

Pomimo tych uwag i komentarzy, jest to wartościowy doktorat, który może być punktem wyjścia w kierunku opracowania nowych podejść terapeutycznych, zwłaszcza w przypadku potrójnie negatywnego raka piersi. Doktorantka wykazała się dobrym przygotowaniem literaturowym i wykonała szereg doświadczeń dostarczających interesujących wyników. Niektóre z nich wymagają jednak pewnego uzupełnienia.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Dominiki Czaplińskiej zatytułowanej: „Znaczenie biologiczne i kliniczne kinaz RSK w progresji raka piersi” jest pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym* z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr Czaplińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski