



Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 12.04.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Magdaleny Śmiech**

pt. "Badanie wpływu wybranych mutacji genu *BRAF* na rozwój nowotworu wątroby – badania modelowe z wykorzystaniem linii komórkowych ssaków"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Pierzchały

Przestawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Śmiech obejmuje badania z zakresu genetyki i onkologii molekularnej. Dotyczą one próby poznania i zdefiniowania roli wybranych mutacji genu *BRAF* w transformacji nowotworowej ludzkich hepatocytów. Ponadto Autorka starała się określić skutki jakie może wywierać mutacja w tym genie na przekazywanie sygnału poprzez szlak RAS/RAF/MAPK/ERK, a w konsekwencji zakłócenie ekspresji kolejnych genów w komórkach wątrobowych implikującej fenotypowymi oraz funkcjonalnymi zaburzeniami ich aktywności. Badania wykonane zostały w oparciu o szereg metod inżynierii genetycznej, elektroforetycznych metod analiz białka, metod cytometrycznych oraz oceny cytotoksyczności i obrazowania wykonywanych w hodowlach komórkowych *in vitro*.

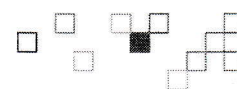
Choroba nowotworowa jest obecnie jedną z najczęstszych przyczyn śmiertelności pacjentów na świecie. Mimo, że poznano wiele przyczyn ryzyka tej choroby jak również rozwinięto jej diagnostykę, to nadal nie jesteśmy w stanie zapobiegać, w pełni kontrolować i skutecznie leczyć



pacjentów z nowotworami. Zmiany nowotworowe mogą dotyczyć wszystkich tkanek i narządów w organizmie prowadząc do upośledzenia ich funkcji i śmierci pacjentów. Jednym z najczęściej występujących złośliwych postaci nowotworów wątroby jest rak wątrobowokomórkowy (HCC) wywodzący się z komórek miększu tego narządu, czyli hepatocytów. Jest wiele czynników etiologicznych związanych z rozwojem tego schorzenia, jednak zgodnie z klasycznymi poglądami, istotnym bodźcem promującym rozwój nowotworu są zmiany genetyczne w komórkach wywołane sygnałami wewnętrznymi i zewnętrznymi. Jednym z genów ulegających częstym mutacjom w hepatocytach jest proto-onkogen *BRAF*, którego białkowy produkt należący do rodziny kinaz serynowo-treoninowych prowadzi do aktywacji szlaku sygnałowego MAPK. Szlak ten wpływa na wzrost oraz różnicowanie komórek. Z tego względu mutacje w genie *BRAF* prowadzi do niekontrolowanego wzrostu, proliferacji i różnicowania komórek jak również do zwiększenia ich potencjału mobilności. Występuje jednak wiele wariantów mutacji genu *BRAF*. Określenie, który z nich zaliczyć można jako najistotniejszy czynnik wiążący się z patologiczną transformacją hepatocytów oraz stanowiący najpoważniejszy czynnik związany z rozsiewem komórek nowotworowych w organizmie jest więc istotne z punktu widzenia rozwoju nie tylko wiedzy podstawowej, lecz również praktycznego wykorzystania klinicznego podnoszącego standard leczenia pacjentów onkologicznych. Przedmiotem badań prowadzonych przez Doktorantkę było zrozumienie zasad funkcjonowania szlaku sygnałowego RAS/RAF/MAPK/ERK aktywowanego przez konkretne mutacje genu *BRAF*, a tym samym określenie która z nich może prowadzić do transformacji nowotworowej hepatocytów. Jest to temat niezmiennie aktualny, dlatego też uważam, że prowadzenie prac badawczych w tej tematyce jest potrzebne i znaczące.

Biorąc pod uwagę ważny naukowo, i potencjalnie praktyczny wymiar zaplanowanych badań uważam pojęcie tematu rozprawy doktorskiej za uzasadnione.

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona w języku angielskim. Tekst jest napisany zrozumiale i zwięźle. Wykonane opisy są spójne i dotyczą ściśle zagadnień zasygnalizowanych w tytule rozprawy. Plan dysertacji oparty jest o klasyczny układ, ogólnie

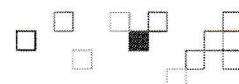


przyjęty jako standard dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Praca liczy 74 strony, a zawarta w niej treść podzielona została na 11 rozdziałów i wyróżnionych w ich obrębie podrozdziałów. Opisy wzbogacone zostały o 19 figur jak również 12 tabel obrazujących uzyskane wyniki oraz charakteryzujące omawiane procesy. Schematy włączone w skład rozprawy są bardzo pomocnym elementem pozwalającym na zwięzłą prezentację opisywanych zjawisk.

Oceniana rozprawa doktorska, zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Prezentuje ono w zwięzłej formie założenia pracy, krótki opis podstaw teoretycznych na bazie których sformułowano hipotezę badawczą, jak również przegląd podstawowych osiągnięć uzyskanych w rozprawie. Rozdział ten jest napisany poprawnie, umożliwiając wstępne zapoznanie się z założeniami i problemami badawczymi podjętymi w rozprawie.

Wstęp pracy w bardzo zwięzłej formie prezentuje najważniejsze informacje związane z analizowanym zagadnieniem. Opisane zostały podstawy genetyczne prowadzące do inicjacji rozwoju nowotworów, epidemiologia raka wątroby jak również mutacje w genie *BRAF* i związane z tym zaburzenia przekazywania sygnałów w szlaku MAPK/ERK. Uważam, że istotną umiejętnością Doktorantki jest zdolność do przedstawienia w zwartej formie wielu informacji w uporządkowanej i logicznej strukturze. Nie ma w tym opisie chaosu, a zawarte w rozdziale treści pozwalają na pełne zorientowanie się w idei, która była motywacją do zaplanowania dalszych badań. Rozdział ten w odpowiedni sposób wskazuje więc na podstawy teoretyczne związane z podjętym zagadnieniem badawczym.

W kolejnych rozdziałach Autorka wskazuje na trzy hipotezy badawcze stanowiące przesłankę do zaplanowania eksperymentów. Przedstawione założenia opierają się na znanych z literatury faktach, jednak uściślają niektóre zagadnienia. Zaproponowany został również cel pracy opisany w dwóch uzupełniających się zagadnieniach. Stanowią one punkt wyjścia do zaplanowania konkretnych eksperymentów, na bazie których Doktorantka starała się udowodnić słuszność Swoich tez. Przedstawione cele badawcze są realne do wykonania w oparciu o

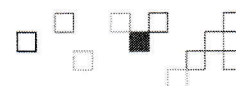


wskazane w kolejnym paragrafie metody doświadczalne i w pełni oparte na przesłankach naukowych.

Paragraf materiały i metody jest bardzo obszerny. Na uznanie zasługuje szeroki warsztat metodyczny Doktorantki. Wykorzystany został cały panel różnych metod doświadczalnych w celu udowodnienia postawionych tez oraz rzetelnego wykonania badań. Autorka bardzo szczegółowo przedstawiła wszystkie wykorzystane procedury analiz genetycznych, molekularnych oraz związanych z hodowlami komórek *in vitro*. Opis stosowanych technik pozwala na ich odtworzenie w innych ośrodkach. Zaproponowany zakres eksperymentów jest, moim zdaniem, wystarczający do realizacji założeń uwzględnionych w celu pracy. Testy statystyczne wykorzystane do opracowania i analizy uzyskanych danych eksperymentalnych zostały dobrane poprawnie.

W rozdziale wyniki zaprezentowano klarowne opisy efektów przeprowadzonych badań oraz zestawienia wyników w formie tabelarycznej, zdjęć i wykresów. Wykonane analizy oraz przeprowadzone obliczenia są czytelne, a przez to wiarygodne. Na podkreślenie zasługuje zwięzła interpretacja wyników jak również, bardzo pomocne w ocenie, schematyczne ich zobrazowanie. Po lekturze rozdziału materiały i metody oraz wyniki nasunęły mi się jednak następujące pytania i sugestie:

- Autorka wskazuje w rozdziale 8.7, że wydajność transfekcji była zbliżona dla wszystkich grup badawczych. Chciałbym jednak zapytać jaka była skuteczność, stopień powodzenia wykonanych transfekcji?
- Autorka w badaniach na hodowlach komórkowych do analizy mobilności komórek wykorzystwała tzw. metodę rysy. Myślę, że korzystnym postępowaniem eksperymentalnym byłoby uzupełnienie tej analizy o metodę migracji przez porowate membrany (transwell migration). Pozwoliłoby to na potwierdzenie uzyskanych wyników, ich weryfikację, zważywszy że istotnym aspektem analizowanych mutacji genu *BRAF* może być wzrost mobilności komórek.
- W pracy wykonano badanie WST-1 wskazujące na stopień proliferacji komórek. Jest to metoda bazująca na ocenie metabolizmu komórek, a przez to jedynie pośrednio na stopniu ich



proliferaacji. Proponowałbym więc w kolejnych badaniach rozważyć dodatkową analizę ilościową opartą o bezpośrednią ocenę ilości komórek opartą na ich żywotności, np. Neutral Red (NR) uptake assay.

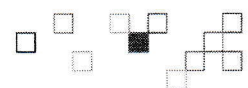
Niemniej jednak, mimo tych sugestii uważam, że wykonane badania pozwoliły w pełni zrealizować cel pracy. Przedstawione wyniki stanowią cenny materiał do analiz oraz wartościowy rezultat będący przyczynkiem do rozważań nad udoskonaleniem już prowadzonych terapii opartych np. na inhibitorach BRAF.

Rozdział dyskusja ocenianej pracy zawiera próbę wyjaśnienia uzyskanych wyników na podstawie własnej wiedzy Doktorantki, popartej danymi pochodzącymi z literatury światowej. Autorka słusznie skupiła się na opisie roli mutacji genu *BRAF* i jego konsekwencjach w kontekście choroby nowotworowej. Był to zasadniczy cel rozprawy, skupienie się więc na konkretnym zagadnieniu pozwoliło na przygotowanie logicznego omówienia wyników własnych i ich zwięzłej interpretacji. W mojej ocenie, przeprowadzona dyskusja w sposób prawidłowy i obiektywny wyjaśnia przeprowadzone obserwacje eksperymentalne, dokumentując równocześnie realizację celu badań.

W kolejnym rozdziale Doktorantka zaproponowała cztery konkretne wnioski wynikające z przeprowadzonych w rozprawie badań. Zawierają one jednoznaczne stwierdzenia wskazujące na rolę konkretnych mutacji genu *BRAF* jako czynnika ryzyka transformacji nowotworowej komórek. Ostatni wniosek zawiera jednak wskazanie potencjalnego praktycznego wykorzystania wiedzy dotyczącej roli BRAF z mutacją V600E. Proszę Autorkę o rozwinięcie tego wniosku i zasugerowanie potencjalnych korzyści terapeutycznych opartych na uzyskanych w rozprawie wynikach.

Piśmiennictwo obejmuje 210 pozycji, dobranych prawidłowo. Są to badania opublikowane w materiałach o zasięgu międzynarodowym. Pozycje literatury są aktualne i dobrane konkretnie do badań podjętych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorantka w pełni zrealizowała zadania jakie zostały postawione w celu pracy. Przeprowadzone eksperymenty wskazały na konkretną mutację genu



BRAF, która mogłaby być oznaczona jako potencjalny czynnik ryzyka rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Autorka wykazała, że mutacja ta ma wpływ na zaburzenie przekazywania sygnału poprzez szlak MAPK/ERK. Ponadto określiła, że zmiany ekspresji określonych genów wynikających z konkretnych mutacji genu *BRAF* mogą być zbliżone do występujących w przypadku innych nowotworów. Przeprowadzone analizy są aktualne, wpisujące się w nowoczesny trend poprawy i udoskonalania prowadzonych terapii na bazie nowych odkryć eksperymentalnych. Badania zostały zaplanowane prawidłowo, starannie wykonane, opracowane i zinterpretowane. Wskazując mocną stronę rozprawy, to uważam, że może ona zostać wpisana w próby badań eksperymentalnych dotyczących poprawy stosowanych już terapii blokujących nieprawidłowe białko, które kodowane jest przez zmutowany gen *BRAF*.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Śmiech jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Śmiech do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań, potencjalny praktyczny wymiar uzyskanych wyników oraz rzetelną i obiektywną ich interpretację wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Katedry


Dr hab. Roman Paduch, prof. UMCS

Roman Paduch

