



Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 08.09.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Zimy

p.t.: Opracowanie modeli *in vitro*, analiza wpływu genisteiny oraz ocena udziału lizosomu w łuszczycy /

Establishment of *in vitro* models, assessment of genistein impact, and evaluation of lysosomal involvement in psoriasis

wykonanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej jako promotora
oraz dr Marty Moskot jako promotora pomocniczego
na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Zimy dotyczy modeli *in vitro* i zaburzeń komórkowych zachodzących w łuszczycy. Mimo znaczącego postępu w leczeniu i dostępności terapii, ta przewlekła choroba o podłożu autoimmunologicznym nadal stanowi wyzwanie medyczne, a pacjenci cierpią z powodu utraty skuteczności leczenia lub nawrotów choroby. Z tych powodów dalsze badania, które mogą prowadzić do identyfikacji nowych punktów uchwytu leków czy innowacyjnych podejść terapeutycznych są bardzo istotne. Wymagają one jednak dogłębnego zrozumienia mechanizmów molekularnych i zaburzeń komórkowych występujących w różnych typach komórek skóry, biorących udział w patogenezie łuszczycy. Taka motywacja przyświecała badaniom Doktorantki i jest w pełni uzasadniona. Rozprawa prezentuje wyniki opisane w trzech pierwszoautorских publikacjach Doktorantki (Bocheńska i wsp. 2019 *International Journal of Molecular Sciences*; Bocheńska i wsp. 2021 *Cells*; Bocheńska i wsp. 2021 *Scientific Reports*) oraz dane niepublikowane i przygotowywane do druku jako kolejny pierwszoautorский manuskrypt.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa liczy 124 stron maszynopisu, jest napisana w języku angielskim i zasadniczo ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim (15 stron), po których następuje wstęp (7 stron) i określenie celów pracy. Opis

materiałów i metod (10 stron) jest zawarty w 11 podrozdziałach. Sekcja wyniki liczy 54 strony, a dyskusja 13 stron wraz z jednostronicowymi konkluzjami. Każda z głównych sekcji rozprawy (wstęp, cele, wyniki, dyskusja) została podzielona na te same trzy tematyczne części (odpowiednio: 1. Establishing *In Vitro* Psoriasis (Ps)-like Inflammation Models Utilizing Multiple Induction Techniques; 2. Investigating the Effects of Genistein Isoflavone on Psoriasis in *In Vitro* Studies; 3. The Role of Endo-Lysosomal Function and Dysfunction in Psoriatic Inflammation). Bibliografia zawiera 178 pozycje literaturowe. Rozprawę kończy suplement z listą publikacji oraz jedną dodatkową ryciną z wynikami badań.

Ocena merytoryczna

Otwierające rozprawę **Streszczenia** (w języku polskim i angielskim) są zaskakująco długie – każde liczy ponad 7 stron (tyle samo ile cały wstęp rozprawy). Mimo swej nadmiernej szczegółowości, streszczenia nie kończą się żadnym podsumowaniem czy konkluzją, a jedynie opisem konkretnych wyników, przez co wydają się niedokończone, a czytelnik pozostawiony bez opinii Autorki co do wniosków i znaczenia Jej badań.

Wstęp rozprawy jest stosunkowo krótki i z tego względu jedynie powierzchownie przedstawia tematykę szerokiego zakresu wykonywanych w rozprawie badań. W dodatku, w jego trzech podrozdziałach jest wiele powtórzeń tych samych lub podobnych treści, co wynika z zamieszczenia w nich treści wstępów (lub ich fragmentów) z pierwszoautorskich publikacji Doktorantki (np. informacje o patogenezie łuszczyca pojawiają się w podrozdziałach 1.1 i 1.2). Nie ma więc w rozprawie szerszego wprowadzenia do całości badań. We wstępie nie zamieszczono rycin czy schematów, które są powszechnie używane w rozprawach do ilustracji wprowadzanych zagadnień.

Cele pracy, w podziale na 3 części tematyczne, zostały poprawnie sformułowane i zrealizowane w toku badań.

Materiały i metody zostały dobrane właściwie do założonych celów. Metody stosowane przez Doktorantkę obejmowały dwu- i trójwymiarową hodowlę komórek, analizy ekspresji genów, cytometrię przepływową, obrazowanie mikroskopowe z użyciem barwień immunofluorescencyjnych, wyciszenie ekspresji genów z użyciem siRNA, testy: żywotności komórek, ELISA oraz Luminex Bead. Jest to szeroki warsztat doświadczalny. Na podkreślenie zasługuje także owocna współpraca z klinicystami w celu pozyskania do badań materiału klinicznego (biopsji skóry od pacjentów z łuszczycą).

Opis większości metod jest zasadniczo poprawny. Moje zastrzeżenia budzi jednak opis obrazowania z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, który jest sprowadzony do jednego zdania („The visualization was performed using fluorescent microscope at a 100 × magnification”), przez co nie zawiera podstawowych informacji o sprzęcie i warunkach obrazowania. Właściwe standardy raportowania obrazowania są obecnie tematem wielu publikacji i opracowań, z którymi warto zapoznać się na przyszłość (np. <https://focalplane.biologists.com/2021/05/25/preparing-your-manuscript-guidelines-for-writing-microscopy-methods-and-figures/>). Przy obecnych standardach obrazowania z użyciem kamer cyfrowych, podawanie powiększeń np. 100x jest niepoprawne (prawdopodobnie Doktorantka wyliczyła powiększenie mnożąc powiększenie obiektywu i okularu, ale jest to powiększenie

dla obserwatora patrzącego przez okular, a nie obrazowania z użyciem kamery). Podziałki (wg opisu w metodach oznaczające 28,5 μm) powinny być na każdym zamieszczonym obrazie (a w sekcji Wyniki niekiedy ich brakuje) oraz każdorazowo opisane w legendzie, a nie jedynie w sekcji Metody. Ponadto, w Metodach nie ma w ogóle opisu ilościowej analizy obrazów mikroskopowych, która jest wspomniana w legendach i znów sprowadzona do jednego zdania (np. „Quantification of mean fluorescence intensity of (...) by ImageJ software” lub “Pearson's correlation coefficient for co-localization of different organelle markers was performed using ImageJ and JACoP (Just Another Colocalization Plugin)”).

Z drobnych niejasności, co na czym polega badanie żywotności komórek poprzez ocenę statusu metabolicznego jądra (str. 38 „Cell viability was assessed by the metabolic status of the cell nucleus”)? Nie znalazłam też wzmianki o pochodzeniu surowicy od pacjentów, która była używana w badaniach (podrozdział 3.1.6).

Sekcja **Wyniki**, podobnie jak inne części, jest podzielona na trzy bloki tematyczne, a uzyskane dane doświadczalne zostały przedstawione na 21 rycinach. Generalnie, doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane i wykonane, a ilość wyników jest bardzo duża, dokumentując niewątpliwie duży nakład pracy Doktorantki. Mam jednak pewne zastrzeżenia co do czytelności tekstu i prezentacji wyników. Przykładowo, czytanie tego rozdziału utrudnia zamieszczanie rycin kilka stron po ich pierwszym wspomnieniu w tekście (rycina powinna być zamieszczona na tej samej lub następnej stronie po jej pierwszym zacytowaniu w tekście). Ryciny z wykresami mają bardzo różne wielkości i konwencje graficzne. Ponadto wielkość czcionki zastosowanej na niektórych panelach rycin jest tak mała, że uniemożliwia przeczytanie opisów w wydrukowanej rozprawie (np. Ryc. 3, 4, 11, 19), a w niektórych innych jest na granicy czytelności. Poniżej wymieniam dalsze uwagi i wątpliwości dotyczące sekcji Wyniki:

- Tytuł podrozdziału 4.1.6 „Statement of *In Vitro* Culture and Skin Biopsies Data from GEO in Relation to the Results” jest niejasny – słowo “statement” wydaje się w tym kontekście nieodpowiednie. Podobnie nieprawidłowe jest to słowo w zdaniu: „a percentage statement of their activity was performed in NHEK/pKC1/pKC2/pKC3 cells (str. 69).

- Na początku podrozdziału 4.2 (badania z użyciem genisteiny) brakuje jakiegokolwiek uzasadnienia jaki był cel i uzasadnienie wykonywania opisanych doświadczeń (pomiar poziomu fosforylowanych kinaz ERK). Przeskok logiczny jest tym większy, ponieważ poprzedni podrozdział dotyczy zupełnie innych, niepowiązanych tematycznie zagadnień.

- W rozdziale 4.3, Doktorantka nieprecyzyjnie stwierdza, że mierzy liczbę („number”) kwaśnych organelli (str. 54) lub wczesnych endosomów (str. 57), ale w rzeczywistości mierzy ilość barwników znakujących te przedziały, a nie liczy ile tych struktur występuje w komórce. Podobnie nieprecyzyjne jest stwierdzenie, że współwystępowanie pomiędzy markerami EEA1, LAMP1 i LC3 określa zakres fuzji pomiędzy wczesnymi endosomami, lizosomami i autofagosomami (str. 58: „Co-localization between early endosome antigen 1 (EEA1), lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1) and microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (LC3B) was performed in HaCaT (Fig. 6A, B and C) and pKC (Fig. 6D, E and F) cultures to determine the extent of fusion between early endosomes, lysosomes and autophagosomes”). Jest to nadinterpretacja, bo kolokalizacja (lub jej brak) może wynikać także z procesów innych niż fuzja.

- Czy dane mikroskopowe z podrozdziału 4.3.2 sugerujące zmianę poziomu białek, zwłaszcza LC3B, pod wpływem traktowania komórek cytokinami zweryfikowano analizami western blot? Jak Doktorantka interpretuje sugerowany spadek poziomu LC3B pod wpływem cytokin, w kontekście różnicowania keratynocytów i rozwoju fenotypu przypominającego łuszczycę?

- Jakość niektórych obrazów mikroskopowych nie jest satysfakcjonująca, np. barwienia lizosomów powinny być punktowe, a nie rozmyte jak np. na Ryc. 5C. Na większości paneli brakuje podziałek. Ponadto, na obrazach powinno się zaznaczyć prostokątem miejsca, które są powiększone jako dodatkowa ramka („zoom”), czego zabrakło na Ryc. 6A i D.

- Jak wyliczano stosunek pul jądrowej i cytoplazmatycznej czynnika transkrypcyjnego TFEB (podrozdział 4.3.3)?

- Koncepcja pomiarów „procentowej dystrybucji regulacji genów” („percentage distribution of genes regulation”), których wyniki przedstawiono na Ryc. 9, 11, 12, 13 nie została jasno wytłumaczona i jest dla mnie niezrozumiała. Co dokładnie mierzono oraz jakie są znaczenie i interpretacja uzyskanych wyników?

- W wielu miejscach sekcji Wyniki brakuje odnośników do literatury, gdy Autorka przedstawia fakty wynikające z wcześniejszych badań innych naukowców, w tym będące podstawą wyboru Jej strategii doświadczalnych lub interpretacji uzyskanych wyników (np. informacje o czynnikach transkrypcyjnych MITF na str. 61, zaburzeniach MAPK1 i UPS w odniesieniu do łuszczycy na str. 69, znanych funkcjach wielu genów omawianych na str. 74 i 75, genach kodujących podjednostki kalcyneuryny na str. 78, itp.). Ponadto, stwierdzenie „*RAB5A* controlling early endosome to late endosome transport exocytosis process” (str. 74) jest nieprawidłowe.

- Niedociągnięcia edytorskie: brak odnośnika w tekście do Ryc. 1A, nieprawidłowy odnośnik do Ryc. 4B i E na str. 69.

W pierwszej sekcji **Dyskusji** (podrozdział 5.1) Doktorantka omawia różne modele komórkowe łuszczycy, ich wady i zalety oraz zastosowania. Jest to solidne omówienie, choć w wielu miejscach brakuje odnośników do literatury. Następnie Autorka podsumowuje wyniki swoich badań z sekcji 4.1 Wyników. Co zaskakujące, ostatnie zdanie tej części Dyskusji przypomina ponownie cel wykonanych badań, bez słowa podsumowania, które byłoby oczekiwane w takim miejscu: czy cel zrealizowano i z jakim efektem? Podrozdział 5.2 dotyczy badań wpływu genisteiny na fenotyp łuszczycowy i sygnalizację wewnątrzkomórkową. Także w tej części brakuje odnośników do literatury przy podawaniu informacji niewynikających z prac Doktorantki. Oprócz omówienia własnych wyników z badań *in vitro*, ciekawym fragmentem tego podrozdziału jest omówienie wyników badania klinicznego z zastosowaniem genisteiny u pacjentów z łuszczycą, w którym Doktorantka brała udział. W ostatniej części Dyskusji (5.3) Autorka komentuje szczegółowo i krytycznie swoje wyniki dotyczące roli systemu endolizosomalnego w różnicowaniu keratynocytów i patogenezie łuszczycy na poziomie komórkowym. Identyfikuje także potencjalne ograniczenia swoich badań i trudności w interpretacji wyników, biorąc zwłaszcza pod uwagę pracę z ludzkim materiałem klinicznym.

Sekcja **Konkluzje** kończąca rozprawę jest niezwykle ogólnikowa i w bardzo niewielkim stopniu odnosi się do badań prezentowanych w rozprawie i wniosków z nich wynikających.

W większości jest przedstawieniem szerszego kontekstu i znaczenia badań nad modelami łuszczycy oraz rolą lizosomów w patogenezie tej choroby.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana zasadniczo poprawnym językiem angielskim, choć Autorka nie ustrzegła się błędów literowych i gramatycznych oraz pewnych niezgrabności językowych (z tych ostatnich zacytuję jedną przykładową: “In recent years, the activity of the mammalian target of rapamycin (mTOR) (..) has played a key role in the control of cell proliferation, growth and differentiation”; str. 89). Pod względem redakcyjnym, w konstrukcji rozprawy moje największe zastrzeżenia budzą dysproporcje pomiędzy poszczególnymi sekcjami dysertacji (wspomniana już długość streszczeń i wstępu), a także dobór i podział treści przedstawionych w tych sekcjach. Pozornie porządkujący zamysł podziału wstępu, celów, wyników i dyskusji na trzy części o tych samych tytułach utrudnia jednak czytanie rozprawy w kontekście logiki wykonywanych badań i powiązań pomiędzy trzema podrozdziałami. W zasadzie rozprawę należałoby czytać w kolejności: podrozdziały nr 1 wstępu, wyników i dyskusji, podrozdziały nr 2 tych sekcji i wreszcie podrozdziały nr 3. W tym kontekście dziwi dlaczego nie zamieszczono w rozprawie wprost trzech publikacji/manuskryptów, z jednym wspólnym wstępem i jedną podsumowującą dyskusją, co na pewno ułatwiłoby lekturę i polepszyło całościowy odbiór rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Zimy podejmuje istotne pytania naukowe z dziedziny molekularnej biologii komórki, które mają możliwe implikacje dla badań translacyjnych w celu poprawy skuteczności terapii łuszczycy. Wykonane badania te wymagały bardzo dużego nakładu pracy, zostały zasadniczo dobrze zaplanowane i wykonane, a ich wyniki opublikowane z wiodącym wkładem Doktorantki. Przedstawione przeze mnie wątpliwości i uwagi mają przede wszystkim charakter dydaktyczny i nie umniejszają wartości rozprawy, a mają za zadanie wzbudzić dyskusję i są wskazówkami do planowania i prezentacji wyników przyszłych badań.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Zimy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marta Kizyńska

