

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Leszczyńskiego pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w jasnokomórkowym raku nerki. Wpływ na metabolizm”.

Praca doktorska mgr Marcina Leszczyńskiego pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w jasnokomórkowym raku nerki. Wpływ na metabolizm” działa na wyobraźnię klinicysty, ponieważ wpisuje się w podstawowe zagadnienie współczesnej medycyny – czy rak będzie uleczalny? Postępy w farmakoterapii nowotworów złośliwych ostatnich lat, szczególnie wyraźne w odniesieniu do raka jasnokomórkowego nerki, wynikają wprost z badań, których charakter ilustruje oceniana praca. Ten fakt czyni temat pracy niezwykle interesującym i niesie z sobą potencjał ważkich odkryć naukowych w drodze do poznania mechanizmów nowotworzenia oraz poszukiwania skutecznych sposobów hamowania procesu chorobowego.

Rozprawa doktorska pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w jasnokomórkowym raku nerki. Wpływ na metabolizm” „” dotyczy badań podstawowych z dziedziny biologii molekularnej i opiera się na wielokierunkowej analizie zjawisk dotyczących procesów regulacji kompleksu SWI/SNF na materiale tkankowym raka jasnokomórkowego nerki uzyskanym po wycięciu nerki z powodu nowotworu (n=50). Praca dotyczy aktualnych zagadnień onkologii urologicznej, a przez połączenie patomorfologii w zakresie badań immunohistochemicznych i zaawansowanych technik biologii molekularnej ma charakter wielodyscyplinarny, co czyni rozprawę interesującą dla szerokiego grona odbiorców, mimo, iż w swej zasadniczej części odnosi się do zagadnień wysoce specjalistycznych na polu biologii molekularnej i genetyki.

Kompleks remodelujący chromatynę SWI/SNF działa jako supresor procesu nowotworzenia. W ok. 40% przypadków raka jasnokomórkowego nerki występują mutacje w genie PBRM1, który koduje podjednostkę BAF180 kompleksu SWI/SNF. Obniżenie ekspresji PBRM1 wiąże się z gorszym rokowaniem. Wykazanie zależności pomiędzy kompleksem remodelującym chromatynę typu SWI/SNF, a kinazą mTOR, która ogrywa istotną rolę w rozwoju raka jasnokomórkowego nerki jest nowym odkryciem o potencjalnie dużym znaczeniu klinicznym. Obecnie w leczeniu zaawansowanego ccRCC stosuje się m.in. inhibitory mTOR np. ewerolimus/temsyrolimus, co pozwala na dłuższe przeżycie pacjentów z rozsianym rakiem jasnokomórkowym nerki. Kompleksy SWI/SNF są niezwykle ważne w regulacji ekspresji genów, są również regulatorami epigenetycznymi. Dlatego zidentyfikowanie i opisanie interakcji pomiędzy jądrową frakcją kinazy mTOR i kompleksem SWI/SNF w kontekście regulacji genu FBP1, kodującego ważny enzym metabolizmu glukozy, może być istotne dla pacjentów z tym typem raka nerki. Obecnie szeroko testowane są nowe leki przeciwnowotworowe tzw. *epidrugs*, czyli leki modulujące aktywność regulatorów epigenetycznych. Kompleks SWI/SNF należy do takich regulatorów. W związku z tym, nie jest wykluczone, że w przyszłości będą stosowane terapie oparte na badanych zależnościach w zaawansowanym ccRCC, w monoterapii lub w połączeniu z inhibitorami mTOR. Być może pozwoli to, na precyzyjne regulowanie ekspresji genów m.in. genów związanych z metabolizmem glukozy, ponieważ właśnie w raku jasnokomórkowym nerki następuje tzw. przeprogramowanie metaboliczne. W świetle tych informacji

wybór tematu dysertacji wydaje się zasadny i oparty na przesłankach naukowych wynikających z aktualnego stanu wiedzy opartej na współczesnej literaturze tematu.

Nie sposób zgodzić się ze stwierdzeniem zawartym w streszczeniu, że rak jasnokomórkowy nerki jest nowotworem nerki najgorzej rokującym (str.3), gdyż za najgorzej rokujący uznawany jest rak wywodzący się z kanalików zbiorczych nerki (ang. collecting duct carcinoma Bellini) lub postać sarkomatoidalna raka nerki, czy też rak rdzeniasty. Autor podaje ponadto, że rocznie stwierdza się w Polsce ok. 4600 nowych zachorowań. Wydaje się, że ta liczba jest zaniżona. W publikacji pt. „Nowotwory Złośliwe w Polsce na podstawie KRN w 2017 roku” pochodzącej z macierzystego ośrodka Autora w tabeli zachorowania na nowotwory złośliwe z rozpoznaniem C64 znajduje się liczba 3144 u mężczyzn i 2088 u kobiet (Tabela 6.7 i 6.9 onkologia.org.pl), co pozwala uznać liczbę 5232 za właściwą w tej materii w roku 2017. Uwzględniając trendy rozpoznawalności i zachorowalności na raka nerki w Polsce można założyć, że rocznie rozpoznaje się obecnie ok. 6000 przypadków raka nerki, z czego większość stanowi rak jasnokomórkowy. Warto zaznaczyć, że zasadniczym sposobem leczenia tego nowotworu jest leczenie chirurgiczne o charakterze radykalnym, stosowane u zdecydowanej większości chorych. Przeżycia 5-letnie w tej grupie sięgają ok. 60% (OS). W przypadkach uogólnienia procesu nowotworowego stosowane jest leczenie systemowe o charakterze paliatywnym.

Wstęp rozprawy zawiera się na 21 stronach i wprowadza w temat rozprawy łącząc wiedzę o charakterze podstawowym z wątkami naukowymi odnoszącymi się do zasadniczej treści pracy jakim są mechanizmy regulujące biologię komórek raka jasnokomórkowego nerki. Czytelnik dowiadyuje się zeń najważniejszych informacji dotyczących się m.in. mutacji i zaburzeń molekularnych w raku nerki, metabolizmu komórek raka nerki, znaczenia kinazy mTOR oraz roli kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF w procesach komórkowych raka jasnokomórkowego nerki. W sposób przejrzysty Autor przedstawia uwarunkowania genetyczne i metaboliczne w raku jasnokomórkowym nerki skutkujące nasileniem angiogenezy i osłabieniem apoptozy, co w efekcie stwarza warunki do ekspansji nowotworu. Szczególne miejsce Autor przeznaczył dla roli kinazy mTOR w procesie nowotworzenia, co leży u podstaw skuteczności klinicznej inhibitorów tej kinazy (everolimus i temsyrolimus). Kontynuując te rozważania Autor przedstawia znaczenie kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF, podkreślając jego rolę w procesie nowotworzenia. Należy zatem uznać, że wstęp pracy wprowadza w zagadnienie będące przedmiotem rozprawy w sposób merytorycznie zasadny, jasno określając przesłanki pozwalające na sformułowanie celu pracy.

Cele pracy Autor sformułował jasno (str.26) i w dalszej części rozprawy konsekwentnie zmierza do ich realizacji. Celem pierwszorzędowym pracy była analiza ekspresji podjednostek kompleksu SWI/SNF w próbkach klinicznych uzyskanych od pacjentów z rozpoznaniem jasnokomórkowym rakiem nerki. Celami drugorzędowymi analizy były: ocena wpływu kompleksu SWI/SNF na zmiany metaboliczne w jasnokomórkowym raku nerki oraz identyfikacja regulacji ekspresji genu FPB1 w jasnokomórkowym raku nerki.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera się na kolejnych 20 stronach. Autor przedstawia w nim sposób przeprowadzenia analizy na materiale pochodzącym z linii komórkowych HeLa i A498 oraz na tkankach pochodzących od 50 pacjentów z rozpoznaniem rakiem jasnokomórkowym nerki poddanych nefrektomii w macierzystym ośrodku. Zwraca uwagę fakt (co w żadnej mierze nie dotyczy oceny merytorycznej rozprawy), że 53% materiału stanowili chorzy (n=26) poddani nefrektomii w stadium

pT1 raka nerki, podczas gdy standardem leczenia w tym stadium jest operacja nerkooszczędzająca. Kwestia wskazań do wycięcia nerki z powodu guza z całą pewnością wykracza poza warstwę merytoryczną rozprawy, niemniej wiąże się w sposób istotny z oceną procesu leczenia chorych na raka nerki. W dalszej części rozprawy wyczerpująco podano zestawy użytych odczynników, metodologię przeprowadzonych doświadczeń oraz wykorzystany w tych doświadczeniach sprzęt, a także niezwykle szczegółowo opisano techniczną stronę analiz (odczynniki i procesy laboratoryjne), co jest typowe dla technik biologii molekularnej zastosowanych w pracy. Wybór tych metod i sposób ich przeprowadzenia nie budzą zastrzeżeń merytorycznych. Stosowano standardowe procedury izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji, real time qPCR, a także barwienia immunohistochemiczne i analizę Western blot, badanie immunoprecypitacji chromatyny oraz analizę pozycjonowania nukleosomów i in. Sposób przeprowadzenia wymienionych analiz został przedstawiony wyczerpująco i zgodnie z obowiązującymi w tej materii zasadami. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania MedCalc i GraphPad Prism 5.0 z zastosowaniem testu normalności Shapiro-Wilka, sparowanego testu t-Studenta oraz testu Manna-Whitneya dla próbek niezależnych i regresji wielokrotnej. Wartość $P < 0,05$ uznano za istotną statystycznie. Do oszacowania zależności między ekspresją genu a wskaźnikiem przeżycia przy użyciu platformy SurvExpress (a także danych uzyskanych z bazy danych GEO GSE3538, zawierającej dodatkowe informacje kliniczne takie jak stopień, stan sprawności, płeć, wiek i stadium choroby) zastosowano model Coxa. Dwie grupy ryzyka wygenerowano przy użyciu mediany wskaźnika prognostycznego. Test log-rank został użyty do oceny równości krzywych przeżycia.

Wyniki pracy znajdują się na kolejnych 19 stronach i podane są w sposób czytelny i przejrzysty. Wykazano spadek ekspresji genów kodujących podjednostki rdzeniowe: BRM, BRG1, BAF155 i INI1 związanych z kompleksem SWI/SNF w komórkach raka jasnokomórkowego. w przypadku genu SMARCA2, kodującego podjednostkę BRM największy spadek ekspresji obserwowany był w zaawansowanym stadium choroby. Analiza ilości poszczególnych podjednostek metodą immunohistochemii i Western blot wykazała, że w komórkach ccRCC znajduje się ich znacznie mniej w porównaniu ze zdrową tkanką. Wyjątek stanowi podjednostka BAF170, której ilość nie była zmieniona w sposób istotny statystycznie. Wyniki uzyskane i przedstawione w tej pracy wskazują na to, że kompleks SWI/SNF bezpośrednio oddziałuje z kinazą mTOR w jądrze komórkowym. Dodatkowo, częściowe wyłączenie funkcji kompleksu SWI/SNF poprzez wyciszenie podjednostki BAF155 powoduje hiperaktywację kinazy mTOR. Wyniki te wskazują na znaczące obniżenie ekspresji genu SMARCC1 kodującego podjednostkę BAF155, co ma miejsce na wczesnych etapach rozwoju ccRCC i powoduje nieprawidłowe działanie kompleksu i hiperaktywację mTOR. Wykazano znaczące obniżenie poziomu ekspresji genów FBP1 i ENO1 w linii A498 w porównaniu do poziomu ekspresji tych genów w linii HeLa. Poziom ekspresji LDHA był w linii A498 podwyższony w stosunku do tego obserwowanego HeLa. Poziom ekspresji FBP1 oceniony metodą IHC wykazał istotne obniżenie ilości tego enzymu w linii A498 w porównaniu do tej obserwacji w lini HeLa. Dane prezentowane w niniejszej rozprawie wskazują na to, że wiązanie się kompleksu SWI/SNF oraz kinazy mTOR do promotora genu FBP1 może prowadzić do trimetylacji lizyny 27 w histonie H3 oraz zagęszczenia nukleosomów, co w konsekwencji doprowadzi do represji genu FBP1 i przetłoczenia metabolicznego w komórkach ccRCC. W tym przypadku kompleks SWI/SNF zawierający ATPazę BRM wiążąc się do promotora genu FBP1 działa jako represor ekspresji tego genu.

W rozdziale pt. „Wyniki” brak informacji o wzajemnych relacjach badanych zjawisk do cech klinicznych choroby/chorego. Na stronie 66 znajduje się stwierdzenie Cyt. „Co ciekawe, w przypadku

genu SMARCA2, kodującego podjednostkę BRM największy spadek ekspresji obserwowany był w zaawansowanym stadium choroby” oraz dalej Cyt. „Zmniejszenie ilości podjednostek BRM, BRG1, BAF155 i INI1 było niezależne od stopnia zaawansowania choroby jak również od płci i wieku”, które nie znajduje uzasadnienia w rozdziale „Wyniki”. Ponadto w rozdziale metody (pkt.2.13 str.46) podano Cyt. „Do oszacowania zależności między ekspresją genu a wskaźnikiem przeżycia przy użyciu platformy SurvExpress (a także danych uzyskanych z bazy danych GEO GSE3538, zawierającej dodatkowe informacje kliniczne takie jak stopień, stan sprawności, płeć, wiek i stadium choroby) zastosowano model Coxa. Dwie grupy ryzyka wygenerowano przy użyciu mediany wskaźnika prognostycznego. Test log-rank został użyty do oceny równości krzywych przeżycia”. W rozdziale „Wyniki” brak informacji na temat wykorzystania tych metod w pracy. Dlatego uważam za ważne, aby Doktorant odniósł się do tego zagadnienia podczas publicznej obrony pracy.

Dyskusja zawarta na kolejnych 3 stronach rozprawy i mimo, że bardzo skąpa objętościowo, stanowi dowód znajomości przez Autora zagadnień związanych z tematyką rozprawy. Autor konfrontuje własne wyniki z danymi literaturowymi obnażając jednocześnie słabe punkty własnego dokonania. Autor w niezwykle treściwej naukowo formie odnosi się do zasadniczych kwestii wynikających z przeprowadzonej analizy. Wszystkie kluczowe elementy pracy poddano krytycznej ocenie w konfrontacji z danymi literaturowymi wskazując bez wątpienia na nowatorskie wnioski uzyskane przez Autora.

Wnioski (str.69) , w liczbie trzech, są zwięzłe, odpowiadają na cel pracy i wynikają z uzyskanych wyników. Autor wykazał w toku rozprawy, że :

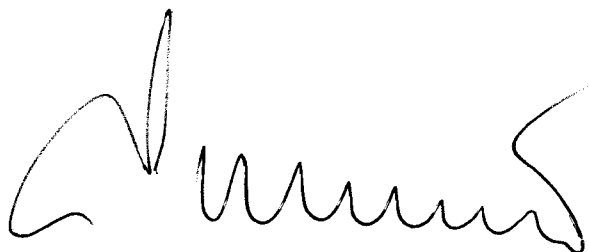
- ☐ Ekspresja genów kodujących podjednostek (w oryginale - podjednostki) kompleksu SWI/SNF w próbkach klinicznych od pacjentów ccRCC ulega znaczącemu obniżeniu,
- ☐ Jasnokomórkowy rak nerki charakteryzuje się utratą lub znaczącym obniżeniem ilości białek będących składnikami kompleksu SWI/SNF,
- ☐ Białka kompleksu SWI/SNF wraz z kinazą mTOR są zlokalizowane w tym samym regionie chromatyny w obrębie genu FBP1 w modelu komórkowym ccRCC oraz uczestniczą w represji tego genu, co w konsekwencji może powodować przełączenie metabolizmu w komórkach nowotworowych.

Piśmiennictwo liczy 11 stron i zawiera 119 pozycji literatury naukowej podanej w stosowanym współcześnie systemie vancouverskim tj. w formie numerowanych odnośników podanych w kolejności cytowania w tekście i uzupełnionych ich listą. Wszystkie pozycje cytowane są prawidłowo. Zwracają uwagę cytowane w tekście rozprawy dokonania macierzystego zespołu Autora odnoszące się do tematu rozprawy, co wskazuje na doświadczenie badawcze tego zespołu oraz wartość naukową jego działań (poz. 86. Sarnowska E, Gratkowska DM, Sacharowski SP, Cwiek P, Tohge T, Fernie AR, Siedlecki JA, Koncz C, Sarnowski TJ. *The Role of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Hormone Crosstalk. Trends Plant Sci.* 2016 Jul;21(7):594-608. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.017; poz 89. Sarnowska E, Szymanski M, Rusetska N, Ligaj M, Jancewicz I, Cwiek P, Skrodzka M, Leszczynski M, Szarkowska J, Chrzan A, Stachowiak M, Steciuk J, Maassen A, Galek L, Demkow T, Siedlecki JA, Sarnowski TJ. *Evaluation of the role of downregulation of SNF5/INI1 core subunit of SWI/SNF complex in clear cell renal cell carcinoma development. Am J Cancer Res.* 2017 Nov 1;7(11):2275-2289).

Przestawiona do recenzji rozprawa odpowiada w swym kształcie edycyjnym współczesnym standardom tego rodzaju dzieł zawierając 80 ponumerowanych stron, wśród których, obok treści rozprawy znalazły się: spis treści, wykaz skrótów, a także streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Układ rozprawy jest przejrzysty i dobrze orientuje Czytelnika w przebiegu wywodu. Praca zawiera 12 czytelnych tabel i 31 starannie przygotowanych rycin. W tekście rozprawy nie znalazłem istotnych błędów językowych, chociaż (co nieodmiennie mnie zadziwia) można natrafić na błędy ortograficzne (vide „gózów” str. 62) oraz stylistyczne. Zwraca uwagę nadzwyczaj duża liczba błędów maszynopisania (ang. *typing error*), które stosunkowo łatwo byłoby usunąć z zastosowaniem edytora tekstu. Wśród nich znalazłem m.in. w wykazie skrótów VHL- „von Hippla-Lindaua” zamiast von Hippel Lindau; w streszczeniu: „charakteryzuję się” zamiast charakteryzuje się, „obserwuję się” zamiast obserwuje się itp. Idąc dalej: „zaburzeniami metabolitycznymi” zamiast metabolicznymi, czy „dodatkowy zaobserwowaliśmy metylację DNA” etc. Nie sposób przytaczać bez końca wspomnianych błędów, niemniej z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na te najbardziej widoczne: str. 23 „nwootworu”; str 57 „pomiedzy białamik”; str 68 „Posumowując” itd. Ten sposób prezentacji dokonania naukowego w formie niedoskonałego edycyjnie maszynopisu nie koreluje z powagą rozprawy doktorskiej oraz wagą zagadnień naukowych w niej poruszanych. Rzecz jasna, wspomniane usterki w żaden sposób nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną dysertacji.

Podsumowując, temat podjęty przez Doktoranta jest aktualny i ważny z punktu widzenia klinicznego i naukowego. Doktorant zna literaturę przedmiotu i potrafi ją twórczo wykorzystać. Na podstawie przedstawionej dysertacji należy uznać, że Doktorant zna i prawidłowo stosuje dostępne metody badawcze, umie prawidłowo zaplanować, zorganizować i przeprowadzić badanie naukowe, a następnie poprawnie zinterpretować jego wyniki. Rozprawa wnosi do nauki istotne wiadomości dokumentujące potencjalną rolę kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF w procesie nowotworzenia na przykładzie raka jasnokomórkowego nerki.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marcina Leszczyńskiego pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w jasnokomórkowym raku nerki. Wpływ na metabolizm” spełnia warunki 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. nr 65, poz.595 z późn. zm.). Dlatego stawiam wniosek do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony pracy.



dr hab. n. med. Artur A. Antoniewicz, FEBU

Kierownik Oddziału Urologii i Onkologii Urologicznej

Międzyleski Szpital Specjalistyczny w Warszawie

Konsultant krajowy w dziedzinie urologii

Warszawa, 2020.09.30.