



Warszawa, 10.09.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Marcina Leszczyńskiego
pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę
typu SWI/SNF w jasnokomórkowym raku nerki. Wpływ na metabolizm”,
wykonanej pod kierunkiem Promotora, Pani dr hab. n. med. Elżbiety Sarnowskiej prof. NIO
oraz Promotora pomocniczego, Pana dr. n. med. Michała Szymańskiego**

Rozprawa doktorska mgr. Marcina Leszczyńskiego dotyczy ważnego klinicznie i społecznie problemu jakim jest rak nerkowokomórkowy typu jasnokomórkowego (ccRCC), najczęstsza i najbardziej agresywna forma raka nerki. W stanie zaawansowanym ccRCC jest chorobą praktycznie nieuleczalną – terapie celowane, oferowane chorym z rozsianą formą choroby mają na ogół działanie jedynie opóźniające progresję nowotworu. U większości leczonych w ten sposób pacjentów z czasem rozwija się oporność na stosowane leki, co nieuchronnie prowadzi do śmierci. W związku z tym badania nad molekularnymi mechanizmami zawiadującymi rozwojem, progresją i odpowiedzią na leczenie ccRCC są jak najbardziej pożądane i pozwalają mieć nadzieję, że doprowadzą do opracowania nowych form terapii, które – jeśli nawet nie doprowadzą do całkowitego wyleczenia – umożliwią przekształcenie przerzutowego ccRCC z choroby śmiertelnej w chorobę przewlekłą.

W rozprawie Doktorant skupił się na analizie kompleksu SWI/SNF biorącego udział w remodelowaniu chromatyny, działającego jako supresor nowotworzenia w różnych typach nowotworów. Kompleks SWI/SNF odgrywa ważną rolę nie tylko w funkcjonowaniu komórek człowieka. Regulowane przez niego procesy są istotne dla wszystkich organizmów eukariotycznych, w tym drożdży i roślin, o czym m.in. świadczą ważne interdyscyplinarne badania prowadzone od lat przez prof. Elżbietę Sarnowską. Świadczy to o uniwersalności podjętej przez Doktoranta tematyki.

Ocena formalna rozprawy.

Rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich i składa się z 80. ponumerowanych stron, podzielonych na główne rozdziały (Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia). Pracę otwiera Wykaz skrótów, poprzedzający Streszczenie, przedstawione w dwóch wersjach językowych, polskiej i angielskiej. W Streszczeniu Autor pokrótce przedstawia informacje dotyczące ccRCC, w tym jego molekularnego podłoża, roli zaburzeń komórkowego metabolizmu, kinazy mTOR i kompleksu SWI/SNF. Rozdział Materiały i Metody w zwięzły sposób prezentuje wykorzystywane przez Autora materiały i techniki, którymi posłużył się wykonując eksperymenty. W rozdziale Dyskusja Autor podsumowuje uzyskane wyniki, komentując ich znaczenie na tle piśmiennictwa dotyczącego raka nerki, znaczenia kompleksu SWI/SNF i kinazy mTOR w procesie nowotworzenia. Rozprawę uzupełnia 119 pozycji Bibliografii, z których zdecydowaną większość stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat, co świadczy o tym, że Autora śledzi aktualne piśmiennictwo związane z tematyką rozprawy. Na szczególne podkreślenie zasługują załączone w rozprawie ryciny, zawierające klarowne schematy szlaków sygnałowych, wykresy i tabele przedstawiające syntetyczne zestawienia wyników.

Funkcja recenzenta nakłada na mnie obowiązek odniesienia się do formalnej strony rozprawy. Do pracy wkładły się niestety dość liczne błędy językowe i literowe, w tym m.in.:

- błędy ortograficzne: „rasy kałkaskiej” zamiast „rasy kaukaskiej” (str. 27); „gózów” zamiast „guzów”, w dodatku bez spacji przed następującym wyrazem- str. 62



- błędy gramatyczne: np. „Wzmacniaczem” zamiast „Wzmacniacz” – str. 1, „płaskonabłonkowym” zamiast „płaskonabłonkowy” – str. 3, „von Hippla-Lindaua” zamiast „von Hippel-Lindau” – str. 3, „dwoma metodami” zamiast „dwie metody” – str. 52; „wykazaliśmy na hiperaktywację kinazy mTOR przy wyciszeniu BAF155 w modelu komórkowym ccRCC” (Streszczenie)
- błędy literowe: np. „kompleksu” zamiast „kompleksu” – str. 2; „Rak nerkowo komórkowy” zamiast „Rak nerkowokomórkowy” – str. 2, str. 3; „Zależnoność” zamiast „Zależność” – podpis pod ryciną 2; „kontroluję” zamiast „kontroluje”, „hipoglikemie” zamiast „hipoglikemię” oraz „kwasice” zamiast „kwasicę” – str. 11, „Biosynteza” zamiast „Biosynteza” na rycinie 6; „jednokomórkowym raku nerki” zamiast „jasnokomórkowym raku nerki” – str. 23; „transkryptomiczynych” zamiast „transkryptomicznych” – str. 49; „białamik” zamiast „białkami” – str. 57; „genotypowanie” zamiast „genotypowanie” – str. 59; „nei” zamiast „nie” – str. 68
- błędy interpunkcyjne (np. str. 5: „Przyczyny rozwoju ccRCC nie są do końca poznane czynnikami ryzyka są między innymi” – brak kropki między „poznane” a „czynnikami ryzyka”; str. 6: „W komórkach zdrowych w których brak jest mutacji”: brak przecinka przed „w których”; brak spacji między „HIF-1” a „aktywuje”; str. 8: podwójna kropka; str. 23-brak spacji „jestrównoznaczna”; str. 59 kropka zamiast przecinka i ciągłości zdania w: „W celu sprawdzenia wpływu wyciszenia mTOR na aktywność kompleksu SWI/SNF. Zaprojektowano wyłączenie mTOR przy użyciu metody CRISPR/CAS9”)
- Błędy redakcyjne: pozostawione w opisie Tabeli 2 słowa „nature review cancer”; pozostawiony nawias zamykający w punkcie 2.7 na str. 43; „j=jednakże” na str. 53.

Z innych niedociągnięć redakcyjnych należy wymienić brak ujednoliconego formatu Bibliografii i brak pełnych danych bibliograficznych (np. roku opublikowania pracy) dla pozycji 49, 50, 53, 87, 92, 104, 110.

Powyższe błędy, w szczególności brak przecinków, powodują, że sens niektórych zdań (w szczególności wielokrotnie złożonych) może zostać wypaczony. Przykładowo, na stronie 7, podpis pod Ryc. 2 „...gdy nie ma ekspresji VHL w wyniku mutacji poziom HIF-1 gwałtownie wzrasta” może sugerować, że poziom białka HIF-1 wzrasta skutkiem mutacji genu kodującego to białko (a nie mutacji genu VHL). Podobnie, na str. 14 czytamy „mTORC1 jest hamowany przez rapamycynę, kofeinę, niedobór związków energetycznych w komórce, kwas farnezylosalicylowy (FTS), czynników wzrostu i kurkuminy” – nie wiadomo, czy Autor miał na myśli, to że kompleks mTORC1 jest hamowany przez czynniki wzrostu, czy też przez ich niedobór.

W Streszczeniu, opisując uzyskane wyniki, Autor stosuje liczbę mnogą („W naszych badaniach wykazano...”, „wykazaliśmy”, „zaobserwowaliśmy”), zamiast przyjętej w rozprawach doktorskich pierwszej osoby liczby pojedynczej („W moich badaniach...”, „wykazałem”, „zaobserwowałem”). Utrudnia to zrozumienie, które z opisanych w Streszczeniu wyników zostały przez Autora uzyskane w ramach badań własnych, a które są efektem pracy zespołu prof. Elżbiety Sarnowskiej. Przykładowo, w Streszczeniu czytamy: „(...) wykazaliśmy wzajemne oddziaływanie białek BAF155 oraz mTOR w linii komórkowej A498 (...)” oraz „wykazaliśmy na hiperaktywację kinazy mTOR przy wyciszeniu BAF155 w modelu komórkowym ccRCC” (domyślam się, że chodziło o „wykazaliśmy hiperaktywację...”). W rozprawie brak jednak wyników potwierdzających te stwierdzenia, widnieje natomiast informacja „z badań wykonanych w naszym Zespole i Zespole współpracującym z nami wynika, że białko mTOR oddziałuje w jądrze komórkowym z kompleksem SWI/SNF (podjednostka BAF155) a inaktywacja kompleksu SWI/SNF powoduje hiperaktywację kinazy mTOR (Balcerak A. i Ćwiek P., niepublikowane, informacja ustna)”.

Niektóre stosowane w rozprawie sformułowania są dość ogólne i wymagają rozwinięcia. Przykładowo, w akapicie opisującym etiologię ccRCC, po zdaniu „Niezwyczajnie istotną kwestią są także predyspozycje genetyczne” (str. 5) należało choć w skrócie wyjaśnić czytelnikowi, dlaczego predyspozycje genetyczne są tak ważne i wymienić ich przykłady. Nie podano definicji sformułowania „przełączenie metaboliczne”, które często pojawia się w rozprawie. Na str. 9 użyto niezbyt szczęśliwego sformułowania „Pod pojęciem metabolizmu rozumiemy



całość reakcji biochemicznych obecnych we wszystkich komórkach żywego organizmu... – poprawnie byłoby napisać o reakcjach zachodzących (a nie – obecnych) we wszystkich komórkach organizmu. Określenie enzymów jako białek, „których zadaniem jest przekształcanie paliwa/żywności w energię niezbędną do prowadzenia procesów komórkowych” (str. 9) jest bardziej na miejscu w opracowaniu popularnonaukowym, a nie w rozprawie stricte naukowej. W rozdziale opisującym fruktozo-1,6-bisfosfatę (str. 11) zabrakło informacji o tym, jaką reakcję katalizuje ten enzym. Na str. 59 wybór linii HeLa do doświadczeń z systemem CRISPR/Cas9 uzasadniono tym, że „efektywność transfekcji w tych komórkach jest najwyższa” – nie podano jednak informacji, na czym oparto to przeświadczenie (np. czy Autor wykonał testy wydajności transfekcji w innych liniach? W ilu? Ile razy? Jaką metodą? Czy przetestowano różne odczynniki do transfekcji? itp.).

Ocena merytoryczna rozprawy.

Autor postawił sobie trzy jasno sprecyzowane cele: analizę ekspresji podjednostek kompleksu SWI/SNF w próbkach tkanek od pacjentów z ccRCC, ocenę wpływu SWI/SNF na zmiany metaboliczne w raku nerki oraz identyfikację regulacji genu FBP1 w ccRCC. W rozprawie brakło jednak klarownie sformułowanej hipotezy. Domyślnie można przypuszczać, że Autor założył, że:

- 1) w ccRCC zachodzą zaburzenia ekspresji genów kompleksu SWI/SNF oraz FBP1, prowadzące do zaburzeń metabolicznych w komórkach ccRCC
- 2) Kompleks SWI/SNF bierze udział w regulacji ekspresji FBP1
- 3) Zaburzenia ekspresji elementów kompleksu SWI/SNF prowadzą do nieprawidłowości ekspresji FBP1 i zaburzeń metabolicznych w ccRCC

Jednym z celów pracy była „Ocena wpływu kompleksu SWI/SNF na zmiany metaboliczne w jasnokomórkowym raku nerki”. Można było zatem oczekiwać, że w Autor będzie analizował poziom metabolitów (bądź nawet przeprowadził badania całego metabolomu) w komórkach ze zmodyfikowaną aktywnością kompleksu SWI/SNF. Niestety, takich badań nie przeprowadzono. Być może trafniejsze byłoby zawężenie celu, np. do oceny wpływu SWI/SNF na ekspresję kluczowych genów glikolizy, co bardziej odpowiada przedstawionym w rozprawie wynikom.

Niewątpliwą zaletą rozprawy jest jej zwięzłość. Niestety, w niektórych przypadkach skrótowe potraktowanie opisu metod czy wyników powoduje, że wiele zagadnień pozostało niejasnych. Przykładowo:

1. Uwagi odnośnie reakcji PCR w czasie rzeczywistym: Jako gen referencyjny wykorzystano gen *UBC* kodujący ubikwitynę. Niestety, w rozprawie brakło wykresu pokazującego stabilną ekspresję tego genu w badanych próbkach. Jest to o tyle istotne, że istnieje praca pokazująca zwiększoną ekspresję *UBC* w ccRCC (Kanayama i wsp. Cancer Res. 1991;51(24):6677-6685). Zgodnie z zaleceniami MIQE, stabilna ekspresja genów referencyjnych powinna być za każdym razem zweryfikowana w danym materiale tkankowym lub komórkowym (Bustin i wsp. Clin Chem. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797). Podany w rozprawie profil temperaturowy reakcji nie wskazuje, by była prowadzona analiza krzywej topnienia produktu. W jaki zatem sposób potwierdzono specyficzność reakcji? Zgodnie z zaleceniami MIQE potwierdzenie specyficzności produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym jest obligatoryjne (Bustin i wsp., Clin Chem. 2009;55(4):611-622)
2. Punktem wyjścia do analizy poziomu ekspresji podjednostek kompleksu SWI/SNF była analiza danych mikromacierzowych zdeponowanych w bazie GEO. Niestety, w opisie metod brakło informacji, w jaki sposób ta analiza była prowadzona.



3. W rozdziale Metody brakuje opisu sekwencjonowania NGS wykorzystanego do badania rozkładu nukleosomów, którego wyniki opisano na stronie 65
4. Nie podano liczby próbek, w których wykonano analizy immunohistochemiczne (Ryc. 20, Ryc. 21, 22, 23). Dlaczego nie wykonano analizy IHC dla białka BAF-170?
5. Na obrazach z analizy Western blot nie podano wielkości prążka odpowiadającego masie badanego białka (Ryc. 20).
6. Analizę Western blot dla białka BRM- α , BAF-155 i BAF-170 wykonano w próbkach od 4 pacjentów, a dla białka INI1-tylko dwóch. Dlaczego?
7. Podsumowując wyniki dotyczące wyników uzyskanych metodą immunoprecypitacji chromatinu, Autor stwierdza „Dane te świadczą o wyłączeniu ekspresji genu FBP1 poprzez trimetylację lizyny 27 w histonie 3, co jest związane z obecnością kompleksu SWI/SNF i mTOR na tym genie”. Niestety, trudno się zgodzić z tym stwierdzeniem. Hipotezę tę można zweryfikować dopiero uniemożliwiając trimetylację histonu z udziałem kompleksu SWI/SNF i badając wpływ tej manipulacji na poziom ekspresji FBP1.
8. Na str. 57 Autor stwierdza, że istnienie korelacji między poziomem ekspresji badanych białek „świadczy o tym, że białka te mogą wzajemnie wpływać na swoje funkcję”. Korelacja między poziomami białek może jednak też wynikać z tego, że ich ekspresja jest regulowana przez jakiś wspólny mechanizm. Z kolei na brak korelacji między poziomem transkryptu a poziomem białka w komórce wpływają nie tylko mechanizmy regulacji potranslacyjnej (jak stwierdza Autor na str. 52), ale również potranskrypcyjnej (np. regulacja ekspresji przez mikroRNA, splicing alternatywny).

Niezależnie od powyższych nieścisłości, rozprawa zawiera niewątpliwie szereg interesujących wyników, które poszerzają obecną wiedzę na temat molekularnego podłoża ccRCC. W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań. Prosiłabym, aby Autor odniósł się do nich w czasie obrony:

1. Wśród analizowanych próbek guzów ccRCC znalazły się trzy zawierające komponentę rabdoidalną. Czy Doktorant mógłby skomentować uzyskane przez siebie wyniki w kontekście pracy Agaimy i wsp. Am J Surg Pathol. 2017;41(2):253-262, w której analizowano ekspresję podjednostek kompleksu SWI/SNF w nowotworach RCC o cechach rabdoidalnych.?
2. Istnieje szereg prac świadczących o roli kompleksu SWI/SNF w progresji ccRCC (Nargund i wsp. Cell Rep. 2017;18(12):2893-2906; Carril-Ajuria i wsp., Cancers, 2019;12(1):16; Bihr i wsp., Neoplasia. 2019;21(2):247-256.). Czy Autor zaobserwował jakieś różnice we wzorze ekspresji badanych białek w próbkach od 10 pacjentów z przerzutami w porównaniu z próbkami od pacjentów bez przerzutów?
3. Na str. 56 czytamy: „w próbce oznaczonej jako P3 zaobserwowano wyraźny spadek BAF170, co stanowiło wyjątek w analizie”. Na Ryc. 24 widać jednak, że wynik ten może być artefaktem, na co wskazuje brak równomiernego sygnału na obrazie barwienia kontrolnego Western blot: w przypadku próbki określanej jako ‘zdrowa’ zupełnie brakuje sygnału kontrolnego, podczas gdy w przypadku próbki nowotworowej sygnał kontrolny jest zdecydowanie silniejszy niż w przypadku pozostałych próbek. Sugeruje to, że próbka P3 w tym konkretnym doświadczeniu całkowicie odbiega od pozostałych analizowanych próbek i raczej powinna być wykluczona z analizy.
4. W podrozdziale Metody nie podano opisu transfekcji komórek, mimo, że Autor przeprowadził te doświadczenia (wyciszanie metodą CRISPR/Cas9). W opisie Materiałów podano listę wektorów: pcDNA3-FLAG-MTOR-R2505P, pUC-H1-gRNA, amirBAF155 – do czego one służyły? Jeśli wykorzystano je do transfekcji komórek – czy weryfikowano indukowane zmiany poziomu ekspresji białek metodą Western blot?



5. Str. 58: Wybór linii HeLa jako linii kontrolnej Autor uzasadnia tym, że nie stwierdzono w niej zaburzeń metabolicznych. Niestety, nie podaje przy tym żadnego odniesienia literaturowego, więc nie wiadomo na czym oparł to przeświadczenie. Linia HeLa była przedmiotem analiz, których wyniki jasno wskazują na istnienie zaburzeń metabolicznych w porównaniu z komórkami nienowotworowymi. Przykładowo, w pracy Diener C i wsp. (Sci Rep. 2016;6:28415) wykazano w komórkach HeLa zaburzenia metabolizmu, w szczególności glicyny i proliny, zaburzenia cyklu Krebsa, zwiększone zużycie ATP i nasilony eksport mleczanu – a więc zmiany charakterystyczne dla efektu Warburga i występujące powszechnie w komórkach nowotworów różnych typów, w tym raka nerki. Przeprogramowanie metabolizmu komórek HeLa, umożliwiające ich intensywną proliferację, wykazano też w pracy Osawa i wsp. Cell Rep. 2019;29(1):89-103.e7. Opisano też specyficzne dla komórek HeLa zmiany w metabolizmie w odpowiedzi na hipoksję (Rodríguez-Enríquez i wsp., Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(10):1744-1751.). W 2017 roku ukazała się praca, w której wykazano, że ekspresja FBP1 jest obniżona w raku szyjki macicy, a przywrócenie ekspresji tego enzymu hamuje proliferację i zdolność do formowania kolonii przez komórki HeLa i indukuje zmiany ekspresji transporterów glukozy (Li i wsp., Mol Med Rep. 2017;16(6):8563-8571.). Wszystko to powoduje, że wybór linii HeLa jako linii kontrolnej uważam niestety za niewłaściwy.
6. Weryfikację wyników analizy bioinformatycznej przeprowadzono metodą PCR czasu rzeczywistego w materiale pochodzącym od 10 pacjentów, podczas gdy Autor miał do dyspozycji materiał od 50 pacjentów. Dlaczego nie przeprowadzono szerszej walidacji? W rozprawie nie przedstawiono wyników od wszystkich analizowanych pacjentów, lecz jedynie przykładowe dane od dwóch pacjentów (ryc. 19). Trudno na tej podstawie wnioskować o istotności statystycznej wyników analizy walidacyjnej.
7. Regulacja genu FBP1 przez kompleks SWI/SNF była już wcześniej badana (Biddick i wsp. PLoS One. 2008;3(1):e1436, Biddick i wsp., J Biol Chem. 2008;283(48):33101-33109). Czy Autor mógłby skomentować własne wyniki w odniesieniu do tych prac?

Mimo powyższych niedociągnięć, rozprawa doktorska mgr. Marcina Leszczyńskiego niewątpliwie prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w tematyce dotyczącej prowadzonych badań oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autor przedstawił oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim była analiza poziomu ekspresji podjednostek kompleksu SWI/SNF w raku nerki i analiza potencjalnego wpływu tego kompleksu na metabolizm komórkowy ccRCC. Upoważnia mnie to do stwierdzenia, że **rozprawa doktorska mgr. Marcina Leszczyńskiego spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1668) i wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Piekietko-Witkowska

