



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Zakład Immunologii Klinicznej

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW
Department of Clinical Immunology

Warszawa, 09 marca 2021

dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon
Zakład Immunologii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Nowogrodzka 59
02-006 Warszawa
Email: radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: Rola białka BRM, podjednostki ATPazowej kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF, w przejściu epithelialno-mezenchymalnym w potrójnie ujemnym raku piersi

Autor: mgr Iga Jancewicz

Promotor: dr hab. n. med. Elżbieta Sarnowska, prof. NIO-PIB

Rada Naukowa: Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

Tematyka Badawcza Rozprawy

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej odnosi się do roli, jaką białko BRM, będące produktem genu *SMARCA2*, odgrywa w biologii raków gruczołu piersiowego, ze szczególnym uwzględnieniem potrójnie ujemnego raka piersi. W szerszym ujęciu, w tematyce badawczej recenzowanej pracy odniesiono się również do regulacji zjawiska przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT) przez czynniki transkrypcyjne z rodziny SNAIL oraz wzajemnych interakcji pomiędzy białkiem BRM a tymi czynnikami. Opisane w rozprawie badania były prowadzone głównie w warunkach hodowli komórkowej za pomocą szerokiego zakresu technik biologii molekularnej, z dodatkowym wsparciem w postaci analizy materiału klinicznego.

Prezentowane w rozprawie wyniki badań powstały w oparciu o finansowanie w ramach projektu Diamentowy Grant z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grantu z Narodowego Centrum Nauki, jak również ze środków przyznanych na działalność statutową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego

Poruszany w rozprawie temat badawczy jest bardzo istotny z punktu widzenia doświadczalnej onkologii, jak również może znaleźć przełożenie na praktykę medyczną, gdyż prawidłowe zrozumienie procesów regulujących zjawisko przejścia epithelialno-mezenchymalne w trakcie progresji choroby nowotworowej może przyczynić się do rozwoju nowych, skutecznych testów diagnostycznych lub metod terapeutycznych. Na korzyść tematyki badawczej recenzowanej rozprawy przemawia również fakt, że zjawiska biologiczne związane z przejściem epithelialno-mezenchymalnym odgrywają znaczącą rolę także np. w procesach organogenezy embrionalnej lub podtrzymywaniu zdolności do samoodtwarzania komórek macierzystych. Oznacza to, że

Nowogrodzka 59, 02-006 Warszawa/Warsaw
tel. 0-22 502-14-72, 502 12 60, fax: 0-22 502-21-59
e-mail: radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl, ewa.rusinowicz@uckwum.pl
zik.wum.edu.pl

wyniki obecnej rozprawy doktorskiej mogą mieć implikacje wykraczające poza rozumienie procesu nowotworzenia, czy też progresji nowotworu. Podnosi to dodatkowo wartość rozprawy.

Należy również podkreślić aktualność podjętej tematyki badawczej z epidemiologicznego punktu widzenia, gdyż raki gruczołu piersiowego są obecnie najczęstszymi (11,7%) nowotworami złośliwymi nowotworami na świecie, zaś jako przyczyna śmierci ustępują jedynie rakom płuc, co zostało ogłoszone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) 4 lutego 2021 roku, z okazji przypadającego na ten dzień Światowego Dnia Raka. Przytoczone dane pochodzą z analiz Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC) i wynika z nich, że raki piersi są szczególnie dominujące w krajach o wysokim rozwoju gospodarczym, wliczając kraje europejskie. Warto także zaznaczyć, że o ile w przypadku raków piersi hormono-zależnych i HER2-dodatnich istnieją opcje terapeutyczne istotnie poprawiające długość przeżycia pacjentek, o tyle w przypadku potrójnie ujemnego raka piersi, którego model doświadczalny opisany jest w recenzowanej rozprawie, brak jest wciąż wystarczająco skutecznych terapii celowanych.

Forma Rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została napisana w języku polskim. Rozprawa liczy łącznie 169 strony. Praca została napisana przejrzysto i z dbałością o estetykę edytorską w standardowym układzie rozpraw doktorskich związanych z dziedziną biotechnologii. Recenzowana praca doktorska zawiera 7 rozdziałów zasadniczych: I – Wstęp teoretyczny, II – Cele pracy, III – Materiały, IV – Metody, V – Wyniki, VI – Dyskusja, VII – Wnioski oraz sekcje pomocnicze: Spis skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo (300 pozycji publikacyjnych lub odnośników internetowych), Spis tabel, Spis rycin i Materiały uzupełniające. Tekst pracy wsparty jest graficznie za pomocą 8 tabel w części głównej i 5 tabel w części uzupełniającej oraz łącznie 37 rycin, zawierających informacje pomocnicze do wstępu teoretycznego, przedstawiających metodykę badawczą lub prezentujących wyniki oryginalne prac doświadczalnych Doktorantki, a na zakończenie schemat podsumowujący powstałą na podstawie poczynionych obserwacji hipotezę działania białka BRM oraz białek z rodziny SNAIL w rozwoju przejścia epitelialno-mezenchymalnego w rakach piersi.

Zakres merytoryczny rozprawy

Oceniana rozprawa obejmuje swoim zakresem szereg zagadnień związanych z regulacją przejścia epitelialno-mezenchymalnego w rakach piersi, a w szerszym aspekcie zmian fenotypowych w komórkach raków piersi związanych z procesem progresji nowotworu i tworzeniem przerzutów. Omówienie tych zagadnień podzielone jest pomiędzy poszczególne rozdziały rozprawy:

I – Wstęp teoretyczny. Przedstawiona jest w przystępny sposób epidemiologia i charakterystyka biologiczna raków piersi, wliczając ich klasyfikację na podstawie różnic molekularnych, takich jak obecność receptorów hormonalnych lub receptora HER2. Następnie opisany został bardziej szczegółowo podtyp potrójnie ujemnego raka piersi, jako jedna z najbardziej agresywnych postaci tego nowotworu. Doktorantka w swoim opisie zwraca uwagę na niehomogenność tej grupy raków pod względem patomechanizmu biologicznego i markerów molekularnych oraz idącą za tym konieczność dalszej subklasyfikacji w obrębie potrójnie ujemnych raków piersi, aby uzyskać wystarczającą precyzję terapeutyczną. Kolejnym podrozdziałem wstępu jest opis zjawiska przejścia epitelialno-mezenchymalnego i jego roli w rozwoju osobniczym, a następnie opisanie roli tego procesu w tworzeniu się przerzutów nowotworowych. Doktorantka słusznie zauważa nie-binarność procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego w procesie progresji nowotworu i tym samym znaczną trudność wypracowania zadowalających modeli eksperymentalnych do badania tego zjawiska. Opisana jest rola poszczególnych czynników biologicznych, a zwłaszcza czynników transkrypcyjnych aktywujących EMT (EMT-TFs), na przykład białek z rodziny SNAIL, w regulacji zarówno tego procesu, jak też zmian metabolicznych z nim związanych. Na zakończenie tego podrozdziału opisana jest, nie do końca wyjaśniona, rola zjawiska przejścia epitelialno-mezenchymalnego w kontekście tworzenia przerzutów raków piersi. Kolejny podrozdział wstępu dotyczy kompleksu remodulującego chromatynę SWI/SNF i roli jego

składowych, czyli podjednostek ATPazowych BRM i BRG1, w regulacji funkcjonowania tego kompleksu w organogenezie i rozwoju nowotworów. W odniesieniu do białka BRM opisane są też niejednorodne obserwacje w różnych typach nowotworów sugerujące zarówno jego potencjalną rolę supresyjną, jak też możliwą promocyjną rolę tego białka w zależności od typu nowotworu. Doktorantka zauważa, że zwłaszcza w raku piersi doniesienia na temat roli białka BRM nie są między sobą w pełni zgodne, co uwydatnia konieczność kompleksowej oceny funkcji tego białka w nowotworach gruczołu piersiowego.

II – Cele pracy. Na podstawie wiedzy literaturowej przedstawionej we Wstępie teoretycznym, Doktorantka podejmuje się w swojej rozprawie oceny, „czy zaburzenia ilości zaburzenia ilości białka BRM mogą wpływać na cechy agresywności komórek raka piersi ze szczególnym uwzględnieniem procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego”, co określone zostało jako cel główny. Dodatkowymi celami pracy jest ocena potencjalnej współpracy pomiędzy białkiem BRM a białkami z rodziny SNAIL oraz wpływ zmienionego poziomu białka BRM na efekty wywoływane przez inhibitory proteasomów w modelowych liniach raków piersi.

III – Materiały. Przedstawiona jest lista sprzętu, odczynników i innych substancji chemicznych oraz czynników biologicznych użytych w trakcie badań. Opisane są również sekwencje kwasów nukleinowych oraz podana informacja na temat plazmidów i konstruktyw użytych w procedurach inżynierii genetycznej przedstawionych w obecnej rozprawie. Zamieszczone są również informacje związane z hodowlami bakteryjnymi i komórkowymi, a na zakończenie z materiałem klinicznym wykorzystanym w opisywanych badaniach.

IV – Metody. W tej części sprawy znajduje się klarowny opis zastosowanych technik badawczych. Należy przyznać, że zarówno liczba, jak i różnorodność używanych metod laboratoryjnych jest znaczna. Oprócz standardowej metodologii biotechnologicznej in vitro, takiej jak hodowle bakteryjne, drożdży i komórek ludzkich, ocena żywotności komórek, testy migracji komórkowej, klonogenności w miękkim agarze, metoda Western blotting, PCR i qPCR, inżynieria plazmidów, transfekcja komórek plazmidami i wyprowadzanie klonów komórkowych, testy metaboliczne, barwienia materiału biologicznego (IHC, ICC, IF), opisane są nowoczesne i zaawansowane techniki laboratoryjne, z których warto wymienić metodę dopełnienia fluorescencyjnego, immunoprecypitację chromatyny, RNA-Seq, ocenę metabolomu i metody bioinformatyczne analizy tych danych. Uwagę zwraca współpraca międzynarodowa z Instytutem Maxa Plancka w Golm w jednej z technik badawczych. Na uwagę zasługuje również wykorzystanie pierwotnego materiału klinicznego i odpowiednich danych klinicznych pacjentek ze zdiagnozowanymi potrójnie negatywnymi rakami piersi.

V – Wyniki. Ze względu na użycie licznych technik badawczych, rozdział ten jest rozbudowany i podzielony na następujące obszary tematyczne:

- Analiza poziomu białka BMR w badanych modelach komórkowych oraz opis wytworzenia pochodnych linii komórkowych MCF7 i MDA-MB-231 ze zmienioną ekspresją białka BRM (odpowiednio metodą RNAi i egzogennej ekspresji) i wpływ tych modyfikacji na charakterystykę komórek linii raków piersi, badaną w obszarze proliferacji i mobilności, transkryptomu, zmian w obecności innych białek, jak też metabolomu. Na uwagę zasługuje ocena wpływu zmian w obecności białka BRM w komórkach MDA-MB-231 na obecność białka PD-L1 i wpływ na limfocyty CD4(+) w warunkach ko-hodowli. Oceniona również została podatność komórek na inhibitory proteasomu.
- Ocena współdziałania podjednostek kompleksu SWI/SNF z białkami z rodziny SNAIL. Wyniki w tej części rozprawy sugerują, że białko BRM i białka z rodziny SNAIL mogą wzajemnie oddziaływać na siebie, na przykład regulując swoją ekspresję.
- Ocena korelacji ekspresji BRM/*SMARCA2* w pierwotnym materiale klinicznym z danymi klinicznymi pacjentek ze zdiagnozowanymi potrójnie ujemnymi rakami

piersi, wykazująca obniżenie obecności białka BRM w tkance nowotworowej w porównaniu ze zdrową.

VI – Dyskusja. W odpowiednich podrozdziałach dyskusji Doktorantka odnosi się szczegółowo do uzyskanych wyników. Na zakończenie dyskusji przedstawione jest podsumowanie powstałej hipotezy badawczej w formie graficznej, co istotnie zwiększa przejrzystość prezentacji badawczych Doktorantki.

VII – Wnioski. Przedstawionych jest 10 głównych wniosków końcowych wynikających z opisanych w ocenianej rozprawie badań, w odpowiedni sposób podsumowujących większość wyników opisanych w pracy doktorskiej.

Istotne elementy rozprawy

Do najbardziej znamienitych i oryginalnych wyników rozprawy zaliczam:

- Kompleksową identyfikację białka BRM jako istotnego czynnika regulującego, w roli supresora, przejście epitelialno-mezenchymalne w rakach piersi, a w szczególności rakach o typie potrójnie ujemnym, stanowiących wciąż wyzwanie terapeutyczne dla współczesnej onkologii i onkobiologii. Jako całość jest to obserwacja nowa i oryginalna, dodatkowo zgodna z częścią wcześniejszych fragmentarycznych doniesień innych autorów.
- Stworzenie stabilnych modeli eksperymentalnych do dalszych badań nad rolą białka BRM zarówno w modelu raka piersi wykazującego ekspresję receptora estrogenowego (MCF7), jak też modelu raka potrójnie ujemnego (MDA-MB-231). Ponieważ obie linie komórkowe wykazują wzrost jako ksenografty u myszy z upośledzonym układem odpornościowym, należy z niecierpliwością oczekiwać dalszych prac badawczych w ustalonych modelach *in vivo*.
- Opisanie wpływu zmian obecności białka BRM na konstytutywną obecność białka PD-L1 w modelu potrójnie ujemnego raka piersi, linii MDA-MB-231. Sugeruje to konieczność zainteresowania się potencjalnym znaczeniem ekspresji białka BRM jako czynnika zmieniającego skuteczność terapii inhibitorami immunologicznego punktu kontroli PD-1/PD-L1 w potrójnie ujemnych rakach piersi. Jest to o tyle istotne, że dotychczas nie udało się uzyskać w pełni zadowalającej skuteczności tych terapii we wspomnianym typie nowotworu, pomimo iż raki potrójnie ujemne mają znaczną tendencję do obecności białka PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych.
- Identyfikację oddziaływań pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi EMT z rodziny SNAIL a kompleksem SWI/SNF. Jest to obserwacja o znaczeniu w rozumieniu biologii przejścia epitelialno-mezenchymalnego w komórkach ludzkich.
- Identyfikację znacznej korelacji pomiędzy indukcją zmian obecności białka BRM a ekspresją genu dla czynnika transkrypcyjnego SOX2 (omówione poniżej).

Przeprowadzona w rozprawie dyskusja wyników jest rozbudowana i merytorycznie zasadna. Większość uzyskanych w ocenianej pracy wyników jest prawidłowo zinterpretowana i odniesiona do obecnego stanu wiedzy w danej dziedzinie. Ogólnie, jestem pod wrażeniem zakresu przeprowadzonych w projekcie badań oraz potencjalnych implikacji diagnostycznych i/lub terapeutycznych, a także w zakresie biologii molekularnej, wynikających z części uzyskanych wyników.

Uwagi i komentarze merytoryczne

Poniżej wymienione są główne uwagi merytoryczne i komentarze odnośnie opisanych w rozprawie wyników badań:

- Próbkę użycia linii komórkowej MCF10A jako kontroli do linii nowotworowych użytych w pracy doktorskiej należy uznać za słuszną, gdyż jest to linia spontanicznie unieśmiertelniona bez ewidentnych cech transformacji nowotworowej. Pomimo jednak

częstego określania w literaturze tych komórek jako „normal”, w mojej opinii nie jest jednak do końca zasadne uznanie tej linii za „model linii zdrowej”, jak to wstępnie uczyniła Doktorantka, gdyż proces naturalnego uniesmiertelnienia w swojej naturze wiąże się stabilnymi zmianami molekularnymi niecharakterystycznymi dla komórek zdrowych. Z tego względu, bardziej precyzyjny byłby opis tych komórek w rozprawie jako „nienowotworowych”. Istotnie, w Dyskusji rozprawy Doktorantka trafnie cytuje wcześniejsze doniesienia na ten temat. W dodatku, Doktorantka niejako potwierdza „nienormalność” komórek MCF10A poprzez zaprezentowane obserwacje dotyczące poziomu obecności białka BRM, a także SLUG, N-kadheryny i wimentyny w tych komórkach i prawidłowo została podjęta decyzja o zaprzestaniu użycia linii MCF10A jako kontroli w badaniach opisanych w rozprawie. W moim rozumieniu najbliższym fenotypowi komórek zdrowych mógłby być model komórek HMEC (human mammary epithelial cells) uniesmiertelnionych telomerazą i być może w dalszych badaniach nad rolą białka BRM w rakach piersi, takie komórki mogłyby służyć jako kontrola, jeśli oczywiście one również nie wykażą odstępstw fenotypowych.

- W przypadku niemożności wyprowadzenia stabilnej linii z obniżoną ekspresją jakiegoś białka, tak jak miało to miejsce przy opisanej przez Doktorantkę próbie knockdownu lub knockoutu białka BRM w linii MDA-MB-231, zasadne jest niekiedy użycie systemu indukowalnej ekspresji shRNA w celu krótkoterminowego obniżenia obecności takiego białka w czasie wykonywania doświadczenia.
- Ze względu na użycie materiału klinicznego przydatna byłaby w tekście rozprawy informacja o ewentualnej opinii Komisji Bioetycznej na temat przeprowadzenia opisanych badań lub też informacja o braku konieczności uzyskania takiej opinii np. ze względu na retrospektywny charakter badania.
- Za jedną ze szczególnie interesujących i znamiennych obserwacji w opisanych przez Doktorantkę wynikach badawczych, aczkolwiek nie uwydatnioną w Dyskusji, uważam dramatyczną zmianę poziomu ekspresji genu *SOX2* w wyniku modulacji obecności białka BRM zarówno w komórkach MCF7, jak też MDA-MB-231. W obu przypadkach w RNASeq obserwuje się największą zmianę krotności w ekspresji właśnie *SOX2* spośród wszystkich innych transkryptów, co zaprezentowane jest odpowiednio w Tabeli uzupełniającej 3 i Tabeli uzupełniającej 5. Jest to o tyle istotnie, że białko *SOX2* zostało zidentyfikowane między innymi jako znaczący czynnik regulujący proliferację i przerzutowość potrójnie ujemnych raków piersi (Liu i wsp. *Front Pharmacol.* 2018;9:942), jak też uważa się to białko za jeden z podstawowych wyznaczników macierzystości w komórkach nowotworowych (Novak i wsp. *Semin Cancer Biol.* 2020;67(Pt 1):74-82). Obserwacja wydaje się być zgodna z oczekiwaniami, gdyż opisano wcześniej wpływ białka BRM na ekspresję *SOX2* w procesie organogenezy zarodkowej (Papanayotou i wsp., *PLoS Biol.* 2008;6(1):e2), jednak w procesach nowotworzenia zależność ta nie była dotychczas szczegółowo badana. Być może Doktorantka będzie mogła wykorzystać tę obserwację w planowaniu dalszych badań nad rolą białka BRM w nowotworach.

Przedstawione w powyżej uwagi merytoryczne, w głównej mierze mające charakter marginalny lub polemiczny, w nieznacznym tylko stopniu wpływają na jednoznacznie pozytywną ogólną ocenę przedstawionej pracy doktorskiej.

Uwagi redakcyjne

- Użycie określenia „całkowita mutacja w obu genach” (str. 38) wydaje się zbytnim skrótem myślowym, gdyż mutacja jest zjawiskiem binarnym i jeśli występuje, to raczej jest całkowita. Może natomiast dotyczyć obu alleli lub też powodować pełną penetrację fenotypu, co być może Doktorantka miała na myśli.

- Przy prezentacji wyników techniki Western blotting korzystne byłoby umieszczenie znacznika molekularnego przy blotach.
- W tekście rozprawy znajduje się kilka nieistotnych błędów literowych.

Wymienione powyżej uwagi redakcyjne w żaden sposób nie zmieniają ogólnie korzystnego wrażenia odnośnie formy edytorskiej ocenianej rozprawy.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Reasumując, w swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Iga Jancewicz podjęła istotny i aktualny temat badawczy we współczesnej onkologii doświadczalnej. Znaczną część uzyskanych wyników cechuje nowatorstwo i mogą one, wliczając prezentowane wyniki negatywne, stanowić podstawę do dalszego ukierunkowania badań nad znaczeniem białka BRM w potrójnie ujemnym raku gruczołu piersiowego.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Igi Jancewicz pod tytułem: „Rola białka BRM, podjednostki ATPazowej kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF, w przejściu epitelialno-mezenchymalnym w potrójnie ujemnym raku piersi” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668) oraz wymogi regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym (załącznik do Uchwały nr 283/2019 Rady Naukowej Centrum Onkologii- Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie).

W związku z powyższym składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie mgr Igi Jancewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony. Jednocześnie, ze względu na istotne znaczenie tematu badawczego, wysoki poziom merytoryczny prezentowanych wyników, a w szczególności obszerny zakres stosowanych technik laboratoryjnych, wnioskuję o wyróżnienie w/w rozprawy doktorskiej.

Warszawa, dnia 09 marca 2021 roku.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Klinicznej

dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon