



Warszawa, dn. 07.02.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Stachowiak pt. „Rola białka SS18 i kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie nowotworów układu moczowego”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Rola białka SS18 i kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie nowotworów układu moczowego” została wykonana w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego pod kierunkiem dr hab. n. med. Elżbiety Sarnowskiej, prof. Instytutu oraz dr Michała Szymańskiego jako promotora pomocniczego.

Jak wskazano, badania stanowiące podstawę rozprawy finansowane były m. in. ze środków pozyskanych w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Diamantowy Grant”, którego Doktorantka była kierownikiem.

Rozprawa zawiera wszystkie elementy wymagane w pracy doktorskiej: wstęp, cel pracy, wyczerpująco opisaną metodykę. Wyniki są bogato ilustrowane rycinami i przedyskutowane. Praca opatrzona jest wnioskami, bibliografią oraz dodatkowo suplementami zawierającymi szczegółowe mapy przygotowanych i użytych w badaniach plazmidów. Dysertacja napisana jest w języku polskim i opatrzona streszczeniem (również w języku angielskim). Informacja o zgodach Komisji Bioetycznych na przeprowadzenie badań znajduje się na str. 53 (III.16. *Materiał kliniczny i etyka doświadczeń*).

Doktorantka jest współautorką 10 publikacji naukowych opublikowanych w pismach z bazy Journal Citation Reports (JCR) o wysokich wskaźnikach „imapaact factor” i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W jednej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem, w dwóch drugim. Znacząca część dorobku publikacyjnego Doktorantki dotyczy badań nad rolą kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) w patogenezie nowotworów.

Wartość naukowa rozprawy

Rozprawa doktorska obejmuje analizę roli zmian molekularnych oraz metabolicznych w patogenezie raka pęcherza moczowego oraz jasnokomórkowego raka nerki, najczęściej diagnozowanych nowotworów w obrębie układu moczowego. Przedmiot badań jest istotny zarówno z powodów naukowych, poznawczych, jak i społecznych. Oba typy badanych raków należą do często diagnozowanych nowotworów zarówno w populacji kobiet, jak i mężczyzn oraz cechuje je duży stopień agresywności. Jasnokomórkowy rak nerki stanowi około 70–80% przypadków nowotworów nerki. Rak pęcherza jest piątym najczęściej diagnozowanym typem nowotworu u mężczyzn. Nowotwory złośliwe układu moczowego stanowią 11% wszystkich diagnozowanych raków u mężczyzn i 5% u kobiet. Odpowiadają odpowiednio za 8% i 4% zgonów nowotworowych. W ciągu ostatnich dekad obserwuje się wzrost zachorowalności na oba



typy nowotworów i co istotne, cechuje je wysoki stopień agresywności. Przedstawione w rozprawie badania skupiają się na analizie roli wybranych białek kompleksu typu SWI/SNF odpowiadającego za zmiany struktury chromatyny i regulację ekspresji genów. Doktorantka przyjmuje, że zaburzenia ekspresji podjednostek tworzących kompleksy remodelujące chromatynę mogą stanowić istotny czynnik promujący powstawanie i propagację nowotworów układu moczowego. Drugim problemem podjętym w pracy jest zbadanie zależności pomiędzy stopniem deregulacji metabolizmu różnych substancji (glukozy, witaminy D), a patogenezą nowotworów układu moczowego. Praca ma charakter wielowątkowy i uważam to za zaletę dysertacji. Kompleksowy charakter badań wpisuje się w realizowane w zespole Promotora projekty dotyczące molekularnych mechanizmów kancerogenezy i terapii eksperymentalnych.

Wybór problemu badawczego uważam za w pełni uzasadniony. Badania są nowatorskie. Praca z zakresu badań podstawowych ma na celu lepsze zrozumienie biologii komórki nowotworowej, a otrzymane wyniki również mogą prowadzić do ulepszenia metod diagnostycznych, czy terapii nowotworów złośliwych. O znaczeniu badań świadczy opublikowanie w r. 2020 części zawartych w rozprawie wyników w piśmie IUBMB (Wiley) o wskaźniku IF ~4. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy.

Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko. W pierwszej części wstępu Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat chorób nowotworowych. Uwagę zwraca bardzo przystępna, obrazowa i opatrzona adekwatnymi odnośnikami forma opisu obu badanych raków. Szczególnie chciałem wyróżnić bardzo jasny opis klasyfikacji obu nowotworów, dodatkowo podsumowany w tabelach. W drugiej części Doktorantka omawia budowę kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF konsekwentnie, w bardzo przystępnej formie, opisując poszczególne podtypy kompleksów. Odnosi się do opisanych zmian w składzie, czy aktywności omawianych kompleksów w nowotworach. Wyczerpująco opisuje aktualny stan wiedzy na temat białka SS18 - podjednostki zewnętrznej kompleksu SWI/SNF. Wskazuje, że pomimo przypisania tej podjednostce roli czynnika transkrypcyjnego, wciąż funkcja tego białka jest niejasna, zwłaszcza w kontekście aktywności w komórce nowotworowej. W ostatniej części wstępu Doktorantka omawia zmiany metaboliczne obserwowane w komórce nowotworowej, ich związek z aktywnością kompleksu SWI/SNF i progresją badanych typów raków. Zwraca uwagę na dwa ważne czynniki: (i) zaburzenia w metabolizmie witaminy D₃, której aktywna biologicznie forma (kalcytriol) produkowana jest w nerkach oraz (ii) szlak glikolizy i rolę kluczowych w tym procesie enzymów. Uważam, że Doktorantka bardzo płynnie porusza się w omawianych zagadnieniach i rozdział ten stanowi wartościowe kompendium wiedzy na temat raków układu moczowego, kompleksów typu SWI/SNF oraz roli zmian metabolizmu glukozy w karcynogenezie. Wstęp jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy i uzasadnia celowość przeprowadzonych badań.

Cele badań są jasno zdefiniowane i obejmują:

- ustalenie zmian w poziomie ekspresji wybranych białek rdzenia oraz



podjednostek kompleksu SWI/SNF w patogenezie jasnokomórkowego raka nerki i pęcherza moczowego;

- analizę funkcji białka SS18 jako potencjalnego czynnika biorącego udział w progresji badanych raków;
- zbadanie zależności pomiędzy aktywnością podjednostek kompleksu a receptorem witaminy D, z uwzględnieniem zaburzeń metabolizmu witaminy D;
- określenie profilu metabolicznego komórek raka pęcherza, odpowiadające różnym stadiom zaawansowania nowotworu.

Pracę cechuje szeroki zakres i bogata metodologia. Materiał badawczy stanowił materiał kliniczny oraz linie komórkowe wyprowadzone z badanych typów raków oraz komórki HeLa. Jako materiał kontrolny został użyty margines niezmienionej chorobowo tkanki pobrany podczas resekcji guzów. Materiał kliniczny został prawidłowo scharakteryzowany. Należy wyróżnić wzorowy, wyczerpujący opis użytych procedur materiałów (z podaniem numerów katalogowych produktów oraz warunków, w których wykonano eksperymenty, czy sekwencji użytych starterów). Doktorantka wykazała się ponadprzeciętną znajomością technik badawczych i analiz wymagających wysokich umiejętności niezbędnych w analizie wygenerowanych danych. Zastosowała imponującą gamę zaawansowanych technik biologii molekularnej, w tym: sekwencjonowanie DNA, immunoprecypitację białek, klonowanie, immunofluorescencję, Western blot, reakcję PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) i inne. Analizy danych zostały wykonane przy użyciu dedykowanego oprogramowania oraz odpowiednich narzędzi bioinformatycznych. Doktorantka na potrzeby analizy statystycznej wykorzystała program Prism (GraphPad), który równocześnie umożliwia graficzne opracowanie wyników. Zastosowane w analizie testy statystyczne (parametryczne i nieparametryczne) zostały odpowiednio dobrane i wykonane. Każdy z wyników został zweryfikowany niezależną techniką. Otrzymane rezultaty zaprezentowane są czytelnie w postaci rycin, wykresów i tabel, co bardzo ułatwia ich analizę.

Pierwsza część wyników opisuje doświadczenia, w których Doktorantka zaobserwowała niższą ekspresję genu *SS18* kodującego podjednostkę kompleksu SWI/SNF w komórkach jasnokomórkowego raka nerki (ccRCC). Ponadto wykazała, że poziom ekspresji *SS18* jest tym niższy, im wyższe jest stadium zaawansowania nowotworu. Następnie podjęła próbę otrzymania stabilnej nadekspresji lub wyciszenia białka *SS18* w celu analizy regulacji i oddziaływań białka *SS18*. Uzyskanie takich konstruktów okazało się niemożliwe, natomiast Doktorantka otrzymała komórki z przejściową nadekspresją podjednostki *SS18*. Zaobserwowała, że nadekspresja genu *SS18* prowadzi do wzrostu ilości białka *SNAIL*, kluczowego w transycji epithelialno-mezenchymalnej. Dodatkowo, Doktorantka wykazała, że białko *SS18* wiąże się do promotora genu *SNAIL1*, kodującego białko *SNAIL*, co sugeruje, że może regulować jego ekspresję. Co ciekawe, otrzymane dane nie wykazały oddziaływania białka *SS18* z białkami rdzenia kompleksu.



Doktorantka poszerzyła badania o analizę oddziaływań z receptorem witaminy D – VDR a białkami kompleksu SWI/SNF i wykazała, że składniki kompleksu SWI/SNF oddziałują z receptorem VDR, przy czym oddziaływanie to zachodzi w obecności witaminy D. Jednocześnie wykazała, że receptor VDR lokalizuje się głównie w cytoplazmie w badanym materiale, co może skutkować niedoborem bioaktywnej witaminy D. Dodatkowo, suplementowała witaminą D komórki wyprowadzone z raka nerki i wykazała wzrastającą translokację receptora VDR z cytoplazmy do jądra komórkowego.

Kolejnym sukcesem było otrzymanie przez Doktorantkę stabilnej linii raka nerki z nadekspresją receptora VDR w celu analizy zmiany w poziomie ekspresji genów zależnych od aktywnego VDR. Analizę przeprowadziła dla komórek traktowanych i nietraktowanych witaminą D. W tej części badań użyła technik wielkoskalowych (RNAseq) i wykazała, że obniżony był poziom ekspresji grupy genów o aktywności czynników transkrypcyjnych łączących się z DNA. Tę spadkową tendencję wykazała również dla poziomu ekspresji genów kodujących wszystkie podjednostki rdzeniowe kompleksu SWI/SNF. Wyniki zostały prawidłowo zwalidowane przez Doktorantkę metodami RT-qPCR i Western blot.

W drugiej części wyników Doktorantka przeanalizowała ekspresję genów kodujących główne podjednostki kompleksu SWI/SNF oraz ich potencjalny wpływ na geny związane z metabolizmem glukozy i procesem przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Materiał badawczy stanowiły próbki utrwalone w parafinie, pobrane od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz seria linii komórkowych wyprowadzonych z raków pęcherza. Doktorantka wykazała obniżony poziom transkryptu genu *SMARCA2* kodującego białko BRM rdzenia kompleksu SWI/SNF. Obserwację tę potwierdziła analizując dane bioinformatyczne z baz danych i wykazała, że zmiana poziomu ekspresji genu *SMARCA2* zależy od molekularnego podtypu nowotworu oraz że niski poziom ekspresji tego genu koreluje z szybszym nawrotem choroby i krótszym czasem przeżycia pacjentów. W dalszych badaniach również wykazała, że niższy poziom ekspresji *SMARCA2* koreluje ze wzrostem poziomu ekspresji genów metabolicznych. Analizowała również poziom ekspresji kompleksu SWI/SNF w liniach komórkowych raka pęcherza. Wykonała doświadczenia polegające na przejściowej nadekspresji genu *SMARCA2* w wybranych liniach i zaobserwowała, że podtyp molekularny raka determinuje poziom ekspresji genów kompleksu SWI/SNF oraz genów zaangażowanych w metabolizm glukozy.

Dodatkowo przeanalizowała i zaobserwowała wzrost poziomu ekspresji genu *VDR* w komórkach raka pęcherza. Zaproponowała, że receptor VDR można rozważyć jako potencjalny cel terapeutyczny w raku pęcherza moczowego zakładając, że nadekspresja *VDR* w raku pęcherza może promować tranzycję epitelialno-mezenchymalną oraz inaktywację układu odpornościowego.

Dyskusja jest napisana ciekawie. Doktorantka konsekwentnie odnosi się w niej do otrzymanych wyników i danych literaturowych. Tak wnikliwa dyskusja świadczy o



dojrzałości naukowej Doktorantki. W rozdziale tym znalazłem wyjaśnienie i odpowiedzi na większość pytań pojawiających się podczas analizy pracy. Opis i interpretacja danych świadczą o tym, że dysponuje umiejętnościami i wiedzą potwierdzającą jej dojrzałość naukową i gotowość do dalszego samodzielnego rozwoju naukowego oraz prowadzenia prac badawczych.

Podsumowując, wyniki przedstawione są w sposób logiczny i czytelny oraz są wyczerpująco przedyskutowane. Pracę kończy piętnaście poprawnie sformułowanych wniosków, które odnoszą się do wcześniej postawionych celów badawczych oraz uzyskanych wyników.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca jest napisana z dbałością i z zachowaniem adekwatnej naukowej terminologii. Układ pracy, a zwłaszcza oprawę graficzną oceniam wysoko. Jedynie w sekcji „Wyniki” część rycin została przedstawiona w zbyt niskiej rozdzielczości (np. Ryc. V.1. F). Błędy edytorskie są nieliczne (tj. „sol” zamiast „sól”, str 11; brak odstępu pomiędzy wyrazami, np. „lekówna”, str 97).

Uwagi krytyczne/pytania

Pragnę zaznaczyć, że poniższe komentarze nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy. Prosiłbym Doktorantkę o odniesienie się do zawartych poniżej uwag:

1. Dlaczego w analizach z użyciem techniki Western blot nie mierzono stężenia białka całkowitego w lizatach komórkowych metodami klasycznymi, tj. metodą Bradforda?
2. Poproszę o krótki komentarz/podsumowanie zastosowanych testów w statystycznej analizie danych.
3. Dlaczego w badaniach z zastosowaniem serii linii komórkowych wyprowadzonych z raka pęcherza moczowego nie użyto linii nienowotworowej, wyprowadzonej z prawidłowej tkanki (np. UROtsa).
4. Czy zdaniem Doktorantki uzyskane wyniki/dane mają potencjał diagnostyczny? Czy mogą przyczynić się do zdefiniowania nowych biomarkerów, czy celów terapii ukierunkowanej?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Stachowiak pt. „Rola białka SS18 i kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie nowotworów układu moczowego” w pełni 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. z 2017 r. poz. 1789).

Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Małgorzaty Stachowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Rozprawę cechuje wysoki poziom naukowy. Uzyskane wyniki, przy użyciu zaawansowanych technik analitycznych i molekularnych stanowią istotny wkład w



badania nad szeroko pojętą patogenezą chorób nowotworowych. Doktorantkę wyróżnia znaczący dorobek naukowy w postaci publikacji oryginalnych, pozyskanego „Diamentowego Grantu” z Ministerstwa Szkolnictwa i Nauki oraz uzyskanych wyróżnień na konferencjach o zasięgu międzynarodowym. Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr Małgorzatę Stachowiak.

p.o. Kierownika
Zakładu Immunohematologii
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
Damian Gawel
dr hab. n. med. Damian Gawel, prof. CMKP