

Kierownik Katedry Urologii i Andrologii
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Ocena

Rozprawy doktorskiej Małgorzaty Stachowiak

na temat: „**Rola białka SS18 i kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie nowotworów układu moczowego**”

1. Uwagi ogólne i redakcyjne

Rozprawa doktorska Małgorzaty Stachowiak pt. „Rola białka SS18 i kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie nowotworów układu moczowego” napisana jest w sposób typowy dla pracy doświadczalnej. Praca została sfinansowana w ze środków przyznanych przez: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu Diamentowy Grant nr 0229/DIA/2015/44, a także ze środków przyznanych na działalność statutową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego. Praca zawiera 105 stron wydruku komputerowego podzielonego na 6 rozdziałów z wnioskami, streszczeniami w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin, piśmiennictwo, suplement oraz

wykaz stosowanych skrótów.

Rozprawa napisana jest poprawnie po polsku, czyta się ją warto, jest ciekawa. Rozplanowanie rozdziałów typowe dla pracy eksperymentalnej jest prawidłowe a rozdziały zaplanowane w odpowiednich proporcjach objętościowych. Nie stwierdziłem poważnych błędów merytorycznych i językowych. Spis piśmiennictwa uporządkowany alfabetycznie jest czytelny i bogaty w nowe pozycje. Część pozycji starszych jest z pewnością niezbędna dla wnikliwej analizy tematu dyzertacji.

2. Merytoryczna ocena pracy

Uzasadnienie podjęcia tematu Doktorntka szeroko przedstawiła we wstępie. Opisała cywilizacyjne aspekty rozwoju chorób nowotworowych. Opisała epidemiologię, czynniki ryzyka i aspekty dotyczące dziedziczenia mutacji sprzyjających rozwojowi raka pęcherza i raka nerki. Opisała również zagadnienia dotyczące klinicznych aspektów związanych z diagnostyką i leczeniem obu nowotworów. Dokładnie opisała kompleks remodelujący chromatynę typu SWI/SNF i jego działanie a także jego potencjalne powiązania z nowotworzeniem szczególnie w przypadku powstania nowotworów o dużym potencjale przerzutowym i naciekającym wzroście co wiąże morfologicznymi wykładnikami przemiany epithelialno-mesenchymalnej i zaburzeniami metabolicznymi. Omówiła znaczenie białka SS18 dla kompleksu remodelującego SWI/SNF w patogenezie nowotworów. Wyczerpująco przedstawiła procesy energetyczne komórek nowotworowych i znaczenie ekspresji enzymów w nich pośredniczących, które mogą prowadzić do nowotworzenia. Należy z całą mocą podkreślić, iż wybór tematu pracy jest nie tylko trafny z punktu widzenia konieczności rozwiązywania istotnych zagadnień klinicznych, ale świadczy o nowoczesnym spojrzeniu na procesy biologiczne zarówno przez Doktorantkę, jak i jej Promotorów. Próba powiązania procesów komórkowych i obserwacji klinicznych, świadczy o niezwykle

wnikliwej obserwacji nowoczesnych trendów w nauce. Oczywistym jest fakt, iż próba opisanie i przygotowania czytelnika do analizy tych zagadnień jest trudna i wymaga szerokiej znajomości tematu, czym wykazała się Doktorantka.

"Wstęp" daje podstawę do zaprezentowania celów pracy, które wynika z poszukiwań odpowiedzi na istotne pytania dotyczące zmian w poziomie ekspresji wybranych białek kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF w patogenezie raka pęcherza i raka nerki. Odpowiedzi na określenie funkcji białka SS18 jako składnika kompleksu SWI/SNF i potencjalnego czynnika biorącego udział w powstawaniu raka jasnokomórkowego nerki i oddziaływań między podjednostkami kompleksu a receptorem witaminy D i zaburzenia metabolizmu witaminy D w raku nerki.

Ze względu na doniesienia sugerujące, iż kompleks SWI/SNF może kontrolować metabolizm, Doktorantka postanowiła zbadać profil metaboliczny linii komórkowych raka pęcherza, odpowiadający różnym stadiom jego zaawansowania.

W rozdziale "Materiał" Doktorantka bardzo rzetelnie opisała wszystkie elementy tj. aparaturę, materiały zużywalne, odczynniki, enzymy, przeciwciała, oligonukleotydy, plazmidy, pożywki, szczepy bakteryjne, linie komórkowe oraz źródła ich pochodzenia lub uzyskania. To czyni przedstawiony warsztat pracy niezwykle wiarygodnym i daje możliwość powtórzenia eksperymentów. Pewnie niedosyt budzi rozdział "Materiał kliniczny i etyka doświadczeń". Spodziewałbym się w tym miejscu dokładnego opisanie pacjentów i materiału biologicznego wraz z miejscem jego pochodzenia. Informacje, iż " Część materiału ccRCC stanowiły bloczki parafinowe Szpitala Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji (MSWiA) w Białymstoku" lub "Materiał do eksperymentów qRT-PCR stanowiły pobrane podczas operacji resekcyjnej wycinki tkanek ccRCC" nie powinny być przedstawione czytelnikowi w tak lakonicznej formie.

W rozdziale "Metody" Doktorantka szczegółowo opisuje swój warsztat naukowy hodowli bakteryjnych i linii komórkowych, analizy kwasów nukleinowych i ich produktów a całość kończy

informacja o analizach bioinformatycznych. Reasumując, całość laboratoryjnego warsztatu pracy przedstawia się bardzo wiarygodnie i rzetelnie. Pokazuje, że Doktorantka jest osobą wczeschstronnie wykształconą i potrafi operować szerokim arsenalem narzędzi używanych w biologii molekularnej a Promotorzy umożliwili Jej świetny warsztat pracy.

W rozdziale "Wyniki" szeroko i obrazowo przedstawiono wszystkie zależności, które Doktorantka zamierzała zweryfikować. Doktorantka wykazała, że poziom białka SS18 jest istotnie niższy w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki zdrowej, co potwierdziła na poziomie transkryptu. Otrzymane wyniki skorelowano również z dostępnymi danymi klinicznymi, zauważając, że stadium zaawansowania nowotworu w skali Fuhrman wyraźnie ma wpływ na poziom ekspresji białka SS18. Zależności te udało potwierdzić się w doświadczeniach *in vitro* z użyciem linii komórkowych raka nerki. Przy użyciu innych linii komórkowych wykazujących nadekspresję SS18 wykazano, że podjednostki kompleksu SWI/SNF obniżyły poziom swojej ekspresji, co również ma miejsce w przypadku genów metabolicznych i genu *EZH2*. Doktorantka wykazała, że białko SS18 wiąże się do promotora genu *SNAIL* i może regulować jego ekspresję. To bardzo interesujące obserwacje.

Najciekawszą dla mnie częścią rozdziału "Wyniki" jest badanie oddziaływania pomiędzy białkiem VDR i podjednostkami kompleksu SWI/SNF. Doktorantka wykazała, że jest to możliwe między wybranymi podjednostkami kompleksu SWI/SNF dzięki wykazaniu kolokalizacji tych białek. Co ciekawe, Doktorantka zaobserwowała obniżenie poziomu białka VDR we wszystkich stadiach nowotworu w porównaniu do tkanki zdrowej. Choć badania dotyczące wpływu nadekspresji VDR i różnych stężeń witaminy D nie dały jednoznacznych wyników to ten kierunek poszukiwań jest dla mnie niezwykle ciekawy.

W części pracy dotyczącej raka pęcherza Doktorantka obserwowała obniżenie poziomu białek, wchodzących w skład rdzenia kompleksu SWI/SNF. Znalezione silną zależność pomiędzy niskim poziomem ekspresji *SMARCA2* a tworzeniem przerzutów raka pęcherza. Ze względu na

udział kompleksu SWI/SNF w regulację poziomu glukozy, Doktorantka sprawdziła poziom ekspresji genów i białek wchodzących w jego skład w komórkach raka pęcherza in vitro. W linii komórkowej T24 przejściowa nadekspresja *SMARCA2* spowodowała wzrost poziomu ekspresji wszystkich genów metabolicznych poza *PRKAA1* i *FBP1*, a także wzrost poziomu genów kodujących rdzeniowe podjednostki kompleksu SWI/SNF w stosunku do linii kontrolnej bez nadekspresji. Obserwowano też zmiany dotyczące ekspresji białka VDR.

"Dyskusja" napisana jest szeroko i wielowątkowo. W dyskusji Doktorantka wyczerpująco przedstawia koncepcje i przemyślenia dotyczące przeprowadzonych badań w oparciu o własne wyniki, jak i dostępne piśmiennictwo, które jest właściwie użyte w dyskusji. Śmiało konfrontuje swoje wyniki szukając dla nich uzasadnienia. Do wszystkich otrzymanych wyników Doktorantka odnosi się krytycznie i doskonale widać, że analiza statystyczna jest dla Niej jedynie narzędziem, które pomaga w zrozumieniu a nie determinuje ostatecznych ocen i wniosków. Dyskusję kończą wnioski, które jak najbardziej odpowiadają założeniom przyjętym w celach pracy, jednak część z nich odnosi się do spekulacji, więc powinna znaleźć się jedynie w rozdziale "Dyskusja".

3. Ocena końcowa

Całą pracę oceniam jako interesującą i przesiąkniętą świeżym spojrzeniem. Podoba mi się szeroki warsztat badawczy, od modeli in vitro do analizy histologicznej przypadków klinicznych oraz swobodne użycie różnych metod badawczych. To potwierdza świetne przygotowanie techniczne i dobrą orientację Doktorantki w nowoczesnej uro-onkologii. Negatywnym aspektem według mnie jest praca nad dwoma, innymi biologicznie nowotworami, mimo, iż pochodzą one z układu moczowego. Sądzę, iż model raka nerki byłby wystarczający do napisania świetnej rozprawy. To jest oczywiście argument do polemiki nie tylko z Doktorantką ale i z Promotorami, ale absolutnie nie umniejsza wartości tej świetnie napisanej ciekawej rozprawy doktorskiej.

Podkreślam zasługi naukowe Doktorantki dla rozwoju danej dyscypliny wiedzy i składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Małgorzaty Stachowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na bardzo szeroki wchlarz technik, którymi w niezwykle świadomy sposób dysponuje Doktorantka stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tomasz Drewa', with a stylized, flowing script.

Prof. Tomasz Drewa, FEBU