



Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Joanny Szarkowskiej
pt. „Wpływ O-GlcNAcylation na procesy komórkowe na przykładzie
jasnokomórkowego raka nerki”

wykonanej w Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –Państwowym Instytucie
Badawczym w Warszawie
pod kierunkiem dr hab. n. med. Elżbiety Sarnowskiej, prof. NIO-PIB

Rak nerki stanowi około 3% wszystkich typów nowotworów. Z kolei jeden z podtypów - rak jasnokomórkowy nerki (ccRCC) charakteryzuje się największym stopniem złośliwości i stanowi prawie 80% wszystkich przypadków raka nerki. Pomimo znaczącego postępu w diagnozowaniu oraz wyższej świadomości społeczeństwa notuje się wysoki stopień umieralności, co jest związane z późnym wykrywaniem nowotworu oraz brakiem skutecznych metod leczenia. Dlatego też, tematyka podjęta w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej jest bardzo istotna w świetle obecnego stanu wiedzy oraz możliwości terapeutycznych.

Wydział Biochemii, Biofizyki i
Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Zakład Biochemii Ogólnej

Prof. dr hab. Jolanta Jura

Ocena rozprawy doktorskiej

Tematem przedstawionej do recenzji pracy jest poznanie roli O-GlcNAcylation na procesy zachodzące w komórkach wywodzących się z raka jasnokomórkowego nerki. O-GlcNAcylation to potranslacyjna modyfikacja białek, polegająca na dołączeniu pojedynczej reszty β -N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) wiązaniem O-glikozydowym do seryny lub treoniny. Jest to proces dynamiczny, odwracalny, w którym biorą udział dwa enzymy: O-GlcNAc transferaza (OGT), która katalizuje reakcję przyłączania reszt N-acetyloglukozaminy oraz β -N-acetyloglukozaminidaza (OGA), która odpowiada za usunięcie reszt GlcNAc.

Rozprawa doktorska posiada tradycyjny układ poszczególnych części i jest ilustrowana 34 rycinami, z czego większość (30) znajduje się w rozdziale *Wyniki*. Ponadto, w pracy znajduje się 13 tabel, przedstawiających głównie informacje metodyczne i spisy stosowanych reagentów. Na końcu pracy znajduje się bardzo bogaty spis literatury.

We *Wstępie* Autorka przedstawiła informacje dotyczące etiologii ccRCC, wraz z dokładną analizą podłoża molekularnego. Następnie opisała mechanizm działania OGT, miejsce występowania w strukturach komórkowych, procesy, w których bierze udział ze szczególnym uzasadnieniem roli tego białka w nowotworzeniu. Wstęp jest napisany w sposób bardzo logiczny i poparty jest rycinami, które dodatkowo wpływają na bardzo efektywne przedstawienie problemu badawczego. Pomimo różnych wątków tematycznych Autorce udało się w sposób bardzo ciekawy stworzyć historię, która ułatwia zrozumienie podejmowanych etapów badań.

Adres:

Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 63 59

fax +48(12) 664 69 02

email: jolanta.jura@uj.edu.pl

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Doktorantka podjęła się zadania sprawdzenia jak aktywność O-GlcNAc transferazy (OGT) wpływa na procesy komórkowe, takie jak: metabolizm glukozy, naprawa DNA, kontrola ekspresji genów oraz replikacja. W swoich badaniach skupiła się na roli OGT w aktywności kompleksu SWI/SNF, szlaku kinazy mTOR oraz wpływie na ekspresję reduktazy rybonukleotydów (RNR) i białka BRCA1. Dodatkowo, Doktorantka sprawdziła jak inhibitory szlaku mTOR oraz olaparib – inhibitor PARP1 stosowany w leczeniu nowotworów jajnika i piersi z mutacją BRCA1 i 2 wpływają na biologię komórek nowotworowych.

Kolejnym rozdziałem są *Materiały i Metody*. Doktorantka bardzo skrupulatnie opisała wszystkie odczynniki zastosowane w eksperymentach oraz warunki przeprowadzanych reakcji. Protokoły poszczególnych eksperymentów są również opisane ze szczegółami i w tej formie mogą służyć jako materiały pomocnicze dla młodszych kolegów.

Swoje eksperymenty Doktorantka rozpoczęła od sprawdzenia poziomu OGT i stopnia O-GlcNAcyacji w materiale klinicznym oraz analizy danych mikromacierzowych dostępnych w bazie NCBI *Gene Omnibus Database*. Wyniki z analizy guzów ccRCC nie dały jednoznacznych odpowiedzi. Przede wszystkim nie było spójności w poziomie OTG w tkance prawidłowej i w guzie oraz poziom ten nie korelował ze złośliwością guza. Wyniki nie potwierdziły analiz z bazy NCBI *Gene Omnibus Database*. Zdecydowanie w tym badaniu wykorzystano zbyt małą grupę pacjentów. Dalsze badania wykonane na grupie 55 pacjentów wykazały spadek białka wraz ze wzrostem złośliwości guza. Doktorantka stwierdza również, że w guzach obniża się poziom O-GlcNAcyacji, jednak moim zdaniem ten wynik nie jest jednoznaczny dla guzów pokazanych na Rycinie 10. Ponieważ aktywność OGT zależy od metabolizmu Doktorantka sprawdziła jak poziom tego białka zmienia się w liniach komórkowych ccRCC A498, 786-O oraz Caki-1 hodowanych w pożywce zawierającej dwukrotnie wyższe stężenie glukozy. Doktorantka podkreśla, że różnica w poziomie OGT, a następnie O-GlcNAcyacji widoczna jest dla komórek Caki-1, które pochodzą z przerzutu ccRCC, jednak moim zdaniem obniżony jest poziom OGT również w komórkach 786-O (Rycina 12). Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła tych wyników na wykresie oraz nie zaznaczyła ile powtórzeń zostało wykonanych.

Ciekawe wyniki dotyczą oddziaływania OGT z kompleksem remodelującym chromatynę typu SWI/SNF. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można przypuszczać, że nie tylko wcześniej opisana ATPaza BRG1, będąca jedną z podjednostek kompleksu typu SWI/SNF, ale również ATPaza BRM (druga podjednostka tego kompleksu) uczestniczy w regulacji ekspresji OGT. W opisie wyników z tej części eksperymentów brakuje bardziej szczegółowego przedstawienia wektorów ekspresyjnych wykorzystanych w opisanych eksperymentach. Brakuje też wyjaśnienia, dlaczego ta analiza została wykonana tylko dla komórek A498.

Zmianom nowotworowym towarzyszą zmiany metabolizmu komórek. Doktorantka zastosowała bardzo nowoczesne podejście kompleksowej oceny metabolitów w 3-ch liniach komórkowych ccRCC, w tym w przypadku komórek linii A498 po potraktowaniu wcześniej inhibitorem mTOR – ewerolimusem. Badania wykazały, że linie różnią się między sobą składem metabolitów. Szczególne zmiany dotyczyły linii Caki-1, będącej przerzutem ccRCC do skóry. Dodanie inhibitora mTOR również znacząco zmieniło profil metabolitów. Ponadto, Doktorantka wykazała, inhibitory mTOR mają wpływ na przeżywalność komórek trzech zastosowanych linii komórkowych ccRCC, chociaż najbardziej oporna wydaje się linia Caki-1. Mam pewne uwagi do przedstawienia wyników tego eksperymentu. Trudno zrozumieć jak były wykonane analizy statystyczne. Czy wyniki przedstawione na Rycinie 18c są istotne statystycznie w eksperymencie prowadzonym przez 24 i 48h? Ile powtórzeń zostało wykonanych?

Inhibitory mTOR mają również wpływ na ekspresję wielu genów, w tym zaangażowanych w regulację proliferacji, metabolizmu, m.in. ekspresję OGT. Odnosząc się do tego eksperymentu w Dyskusji Doktorantka napisała, cytując: „poziom aktywności tego białka nie zmienił się, natomiast profil O-GlcNAcyacji wielu białek uległ zmianie”, ale czy Doktorantka badała poziom aktywności? Czy te dane nie zostały w pracy zamieszczone?

Bardzo praktycznym podejściem jest wykorzystanie środków farmaceutycznych stosowanych w innych schorzeniach czy typach nowotworów w leczeniu innych nowotworów. W ramach tej pracy Doktorantka zastosowała olaparib – inhibitor polimerazy poli-ADP-rybozy 1 (PARP1) stosowany w leczeniu nowotworów jajnika i piersi z mutacją w BRCA1 lub BRCA2. Badania były poprzedzone analizami poziomu BRCA1 w liniach komórkowych. Również w tym przypadku linia będąca wynikiem

przerzutu ccRCC, Caki-1 była najbardziej oporna na działanie tego inhibitora, natomiast pozostałe linie dawały obiecujące wyniki. Komórki tych linii utraciły potencjał tworzenia kolonii. Skojarzone traktowanie komórek nowotworowych olaparibem, olaparabem i ewerolimusem obniża potencjał proliferacyjny badanych komórek oraz wpływa na obniżenie poziomu BRCA1, chociaż dla linii Caki-1 zaobserwowano wzrost ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego. Czy Doktorantka ma jakąś hipotezę dlaczego tak się dzieje? Dlaczego potencjał proliferacyjny jest obniżony pomimo wzrostu ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego?

W Dyskusji Doktorantka podsumowała otrzymane wyniki wyjaśniając pewne zależności procesów zachodzących w komórce. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania nowatorskich i ciekawych wyników. Należy również podkreślić, że Doktorantka bardzo łatwo analizuje swoje wyniki i porównuje je z bazami danych. Jest to bardzo nowoczesne i praktyczne podejście badawcze, które nie jest powszechnie stosowane. Obecnie istnieją bogate bazy danych, które mogą służyć jako źródła ogromnych zasobów informacji, które bezpośrednio można użyć do prowadzonych analiz.

Praca doktorska napisana jest w sposób bardzo zwięzły. Osobiście, bardzo odpowiada mi takie podejście, ponieważ przy dużej ilości, czasami zbędnych informacji, traci się główny wątek i właściwe znaczenie osiągniętych wyników ale mogę sobie wyobrazić, że dla osób nie zajmujących się tą tematyką niektóre opisy i uzasadnienia mogą być zbyt skrótowe. Doktorantka przeanalizowała wiele zmian w procesach komórkowych i ekspresji genów będących konsekwencją zmian w poziomie białka OGT i O-GlcNAcytacji. Chociaż każdy wątek poruszony w pracy mógłby być dalej rozwijany i szczegółowo analizowany, to na podstawie zastosowanej w pracy strategii badawczej rysuje się jeden wiosek - stosowanie inhibitorów działających na pojedyncze białko czy jeden szlak przekazu sygnału nie jest właściwym podejściem w leczeniu nowotworów. Doktorantka wykonała szereg bardzo złożonych analiz na pograniczu biologii komórkowej, molekularnej i biochemii, które jednoznacznie pokazują, jak zmiana poziomu jednego białka wpływa w sposób złożony na właściwości komórek nowotworowych.

Mam kilka uwag dotyczących strony edytorskiej. Pisząc pracę w języku polskim nie powinniśmy naprzemiennie stosować polskich i angielskich określeń, jak np. startery/primery. Podobnie w tekście polskim opisując wyłączenie genu nie stosujemy słowa „knockdown”. Nie ma próbek eppendorf, natomiast są próbki typu Eppendorf. Nazwę firmy należy pisać dużą literą. Tytuł podrozdziału na str 40: „Test klonogenności w agarze” powinien brzmieć test klonogenności. Niektóre cytowania odbiegają od schematu cytowań zamieszczonych w pozostałej części tekstu, np. pojawia się imię autora przed nazwiskiem (np. str 24). Na stronie 59 Doktorantka odwołuje się do wcześniejszych doniesień naukowych ale nie podaje żadnych cytowań.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej.

Wniosek Końcowy:

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Szarkowskiej spełnia wymogi prawne zapisane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim i Kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora.

W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Szarkowskiej do dalszych etapów postępowania.