



Prof. dr hab. Elżbieta Grzesiuk

Warszawa, 27lipiec 2022

Pracownia Modyfikacji i Uszkodzeń DNA i RNA

IBB PAN

e-mail: elag@ibb.waw.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Joanny Szarkowskiej pt. „Wpływ O-GlcNAcylation na procesy komórkowe na przykładzie jasnokomórkowego raka nerki” wykonanej pod kierunkiem dr hab.n.med. Elżbiety Sarnowskiej, prof. NIO-PIB

1. Ocena formalna:

Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Ma typowy układ pracy doktorskiej, liczy 96 str., z czego Wstęp stanowi 9 stron, rozdział Materiały i Metody 18 stron, Wyniki – 26, a Dyskusja wraz z Wnioskami 9 stron. Wstęp zawiera 3 ryciny. W części Wyniki znajdują się 33 ryciny. Piśmiennictwo jest aktualne, obejmuje 76 pozycji z ostatnich kilku lat.

2. Ocena merytoryczna:

Celem przedstawionej do oceny pracy jest charakterystyka ekspresji O-GlcNAc (OGT) transferazy w jasnokomórkowym raku nerki. Doktorantka podjęła też próbę określenia funkcji OGT oraz O-GlcNAcylation w określonych procesach metabolicznych w komórce nowotworowej vs prawidłowej. Rak nerki (RCC) plasuje się w pierwszej dziesiątce najczęściej występujących nowotworów, co stanowi 2-3% wszystkich typów raków na świecie. Wśród podtypów raka nerki w prawie 80% diagnozuje się jasnokomórkowy rak nerki, który dodatkowo charakteryzuje się dużym stopniem złośliwości, złym lub niepewnym rokowaniem i jest oporny na radio i chemioterapię.

Doktorantka poszukiwała molekularnej podstawy powstawania RCC, a w dalszej kolejności możliwości zahamowania rozwoju RCC poprzez po pierwsze, dokładną charakterystykę procesu acylacji w komórkach RCC pozyskanych z guza nerki lub odpowiednich liniach komórkowych i udziału OGT w procesie nowotworzenia, a po drugie identyfikację udziału OGT w szlakach metabolicznych, co pozwoli na zastosowanie określonych leków blokujących szlaki metaboliczne z udziałem OGT.



Zgodnie z przyjętymi zasadami, **Wstęp** jest przygotowanym na podstawie najnowszej literatury opisem stanu wiedzy w podjętym temacie badawczym. Moje zastrzeżenia budzi natomiast podział na podrozdziały np. niepotrzebny tytuł 1.1 Rak nerki, a zaproponowałabym np. 1.2 Molekularne podstawy raka nerki, 1.3 Kompleks SWI/SNIFW, czy 1.6 Udział O-GlcNAce transferazy w naprawie DNA. Rozdział zawiera trzy rysunki, z których Rys.1 nie budzi zastrzeżeń, Rys.2 powinien mieć adnotację „opis w tekście” a Rys.3 jest generalnie słabo opisany.

Rozdział **Materiały** oraz **Metody** zawiera bardzo szczegółowy opis użytych materiałów i zastosowanych metod i nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział **Wyniki** jest zdecydowanie najlepszą częścią przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Przedstawia on wyniki eksperymentów w większości wykonanych na próbkach klinicznych pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym jasnokomórkowym rakiem nerki oraz dwóch liniach komórkowych wyprowadzonych z raka nerki oraz linii będącej przerzutem RCC do skóry. W pierwszej kolejności Doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji genu *OGT*, i poziomu O-GlcNAcytacji w RCC i tkance zdrowej. Poziom transkryptu *OGT* określony w oparciu o dane mikromacierzowe nie różnił się w raku i zdrowej tkance. Jednakże poziom ten wzrastał wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu i gorszym rokowaniem. Materiał pochodzący z guza i tkanki zdrowej poddano analizie RT-qPCR, gdzie nie zaobserwowano aby wyższy stopień złośliwości nowotworu miał wpływ na zmianę ekspresji *OGT*. Niestety, analiza Western Blot nie dała jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy poziom białka *OGT* spada w guzie w porównaniu do zdrowej tkanki. Z uzyskanych danych wynika, że poziom ekspresji *OGT* w RCC nie koreluje z poziomem białka *OGT*. Doktorantka przeprowadziła analizę TMA (Tissue microarray), którą ilustruje Rys.9. Rys. 8, w założeniu poglądowy nie jest wystarczająco jasny.

Analiza materiału od 55 pacjentów wykazała, że poziom białka *OGT* spada zarówno w jądrze jak i cytoplazmie wraz ze wzrostem złośliwości guza. Obniżał się również poziom O-GlcNAcytacji w nowotworze. Doktorantka argumentuje, że nie wyklucza to zwiększenia O-GlcNAcytacji na poziomie pojedynczych białek z czym w pełni się zgadzam. Żeby to udowodnić można by zastosować inny rodzaj detekcji, np. elektroforezę 2D.

W związku z tym, że transferaza *OGT* związana jest z metabolizmem glukozy Doktorantka przeanalizowała wpływ podwójnego stężenia glukozy w pożywce na O-GlcNAcytację, *OGT* i poziom ekspresji genów związanych z glikolizą. Okazało się, że w tych warunkach poziom



ekspresji genów związanych z glikolizą, szlakiem mTOR, OGT i genu kodującego BAF155 (podjednostka rdzeniowa SWI/SNF) spada (najbardziej w linii A498). Natomiast poziom OGT i BAF155 w liniach komórkowych CAKI-1 i 786-0 wzrasta. Świadczy to o różnej odpowiedzi komórek raka nerki na wysokie stężenie glukozy na poziomie ekspresji genów, co może zależeć od stopnia zaawansowania raka i/lub jego rodzaju.

Doktorantka zaobserwowała również zmianę poziomu O-GlcNAcytacji białek w liniach komórkowych po dodaniu inhibitorów kinazy mTOR: ewerolimusa, rapamycyny i AZD2014. Zmiana w poziomie O-GlcNAcytacji białek w obecności inhibitorów kinazy mTOR sugeruje zaangażowanie w funkcjonowaniu OGT. Istotnym podejściem eksperymentalnym było określenie oddziaływania OGT z kompleksem remodelującym chromatynę SWI/SNF. Takie oddziaływanie jest zachowane ewolucyjnie i znane jako wiązanie ATPazy BRG1 do promotora OGT. Powstało pytanie czy druga ATPaza z tego kompleksu reguluje ekspresję OGT. Przygotowano konstrukty zawierające odpowiednie wstawki kodujące białko OGT i stwierdzono, że komórki A498 transfekowane takimi plazmidami wchodzą w apoptozę, co oznaczałoby, że nadprodukcja OGT działa przeciwnie do transformacji nowotworowej. Ilustracją tego wyniku miał być Rys.14 lecz zdjęcia spod mikroskopu są mało przekonujące. Zastosowanie metody cytometrii przepływowej precyzyjnie pokazało by w jakiej fazie znajdują się komórki. Analiza Western Blot przynosi znacznie więcej informacji (Rys.15). Wykazuje wzrost poziomu OGT w linii A498 z nadekspresją podjednostki ATPazowej BRM kompleksu SWI/SNF, a także wzrost O-GlcNAcytacji białek w liniach transfekowanych konstruktami niosącymi OGT. Otrzymane wyniki sugerują, że BRM może kontrolować ekspresję OGT i mieć wpływ na ekspresję substratów dla OGT.

W dalszej części pracy Doktorantka analizuje szlaki metaboliczne zależne od OGT i O-GlcNAcytacji w jasnokomórkowym raku nerki, gdyż RCC charakteryzuje się silnie zmienionym metabolizmem z nadaktywnością regulowanego przez OGT szlaku mTOR. Określono jak zmienia się przeżywalność, poziom ekspresji genów związanych z metabolizmem, naprawą DNA, kompleksem SWI/SNF i OGT w liniach komórkowych ccRCC w obecności inhibitorów kinazy mTOR: rapamycyny, ewerolimusa i AZD2014. Stopień zahamowania ekspresji genów zależy od zastosowanego inhibitora i linii komórkowej. Inhibitory kinazy mTOR powodowały obniżenie ekspresji genów związanych ze szlakiem tejże kinazy, metabolizmem glukozy, naprawą DNA i genami kodującymi podjednostki rdzeniowe kompleksu SWI/SNF w liniach A498 i CAKI-1. Okazało się też, że pomimo iż wszystkie inhibitory hamowały ekspresję OGT to poziom białka



OGT był obniżony tylko w linii A498 po traktowaniu AZD2014. W liniach 786-0 i CAK-1 poziom mRNA dla mTOR korelował z poziomem białka OGT. Traktowanie różnych linii komórkowych inhibitorem mTOR prowadził do późnej odpowiedzi ze strony kinazy AMPK – w linii A498 inhibitory obniżały ekspresję AMPK, a w linii 786-0 forma aktywna p-AMPK pojawiała się w znacznej ilości w obecności inhibitorów.

W związku z udziałem OGT w GlcNAcytacji białka BRCA1 biorącego udział w naprawie DNA przez homologiczną rekombinację określono poziom tego białka w RCC i zaobserwowano spadek poziomu BRCA1 w guzie w porównaniu ze zdrową tkanką. Idąc tym tropem zastosowano olaparib, inhibitor PARP1, stosowany w leczeniu nowotworów jajnika i piersi z mutacją *BRCA1* lub *BRCA2*. Stwierdzono, że zastosowanie olaparibu i dodatkowo ewerolismusa w różnych kombinacjach i na różnych liniach komórkowych w różnym stopniu hamowało proliferację komórek nowotworowych.

Dyskusja jest podsumowaniem rozprawy doktorskiej. Punktem wyjścia podjętych badań była obserwacja obniżonego poziomu białka OGT w guzach RCC oraz kierowanie komórek na drogę apoptozy po wprowadzeniu cDNA kodującego OGT. Analiza materiału z guzów RCC metodą qRT-PCR, która miała potwierdzić analizę mikromacierzy, wykazała spadek ekspresji OGT w guzie w 5 na 8 przypadków. Stosowane linie komórkowe raka nerki, A498, 786-0 i CAKI-1, charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością metaboliczną, co przekładało się na zróżnicowane wyniki ekspresji OGT i poziomu białka OGT. Okazało się, że wzrost poziomu OGT następował po wprowadzeniu do komórek konstruktu z genem *BRM* kodującym podjednostkę ATPazy kompleksu SWI/SNF.

Stwierdzono również, że linie komórkowe RCC reagowały na działanie inhibitorów kinazy mTOR, a oprócz tego miały wpływ na ekspresję genów związanych z glikolizą, naprawą DNA czy SWI/SNF. Przebadano trzy inhibitory: ewerolimus, rapamycynę i AZD2014 i stwierdzono, że działają one różnie w badanych liniach komórkowych, drastycznie obniżając ekspresję genów, jak w przypadku linii CAKI-1 + AZD2014, lub ją podnosząc jak w przypadku linii 786-0 + AZD2014.

W związku z GlcNAcylacją podjednostki RRM1 reduktazy rybonukleotydów RNR odpowiedzialnej za syntezę nukleotydów i obniżającej poziom OGT w ccRCC Doktorantka określiła poziom ekspresji głównych podjednostek RNR w RCC. Analiza mikromacierzowa poziomu transkryptów genów kodujących podjednostki RNR wzrasta w guzie, a więc podjednostki te mogą być dobrym celem w terapii przeciw nowotworowej. Mgr Szarkowska jasno stawia cel badań – wykorzystanie inhibitorów SWI/SNF, mTOR, RNP, które są interaktorami OGT, jako leki przeciw RCC. Problem jednak jest taki, że GlcNAcyłacja jest wszechobecną posttranslacyjną modyfikacją a więc stopień



komplikacji tej całej pajęczyny powiązań jest ogromny i wymaga dalszych badań krok po kroku, z czego Doktorantka zdaje sobie sprawę.

Jako podsumowanie Doktorantka zamieściła rozdział Wnioski. Moim zdaniem jest to raczej rozdział Wnioski/Obserwacje gdyż na 10 punktów 5 to obserwacje. Rola podwyższonego poziomu glukozy w ekspresji OGT i poziomie OGT w ogóle nie została uwzględniona.

W związku z niestarannym edytorskim przygotowaniem pracy doktorskiej czuję się w obowiązku wypunktować przynajmniej niektóre, rażące błędy:

1. Referencje są pisane w różnym stylu a w całym tekście cytacje zamiast „i wsp” mają „et al.” oraz and.

2. Właściwie wszystkie rysunki są źle podpisane. Np. zaczynają się od słów: wykres, zmiany, poziom, zdjęcie itp., które są niepotrzebne bo czytelnik widzi co jest wykresem a co zdjęciem. Szczytem złego opisu jest rysunek 8 „Wybarwienie tkanek” i rys 15, gdzie wręcz przeciwnie, w podpisie znalazł się dość obszerny komentarz. Nie widzę uzasadnienia dla rys.30 aby był zamieszczony w drugą stronę.

3. W Rys.13 strzałki do GlcNAcytacji nie są na odpowiednim poziomie.

4. Brak Rozdziału 5.4

5. W tekście wielokrotnie powtarza się „ekspresje” zamiast „ekspresję”.

3. Wnioski końcowe

Mgr Joanna Szarkowska przedstawiła Pracę Dokorską, która pod względem merytorycznym stanowi niezaprzeczalną wartość poznawczą, w pełni nowatorską. Jako że większość przedstawionych w rozprawie wyników zostało już opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach, jak Am J Canc Res (dwie prace) i Cancers, a więc pozytywnie zrecenzowanych, to nie ma wątpliwości, że Praca w pełni wypełnia warunki rozprawy doktorskiej. Uważam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska 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.nr 65, poz. 595 z późn.zm). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Joanny Szarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.