



<http://www.nil.gov.pl>

Sekretariat (22) 851-43-69
Dyrektora: (22) 851-44-96

Kancelaria (22) 841-36-51
Fax: (22) 841-06-52

Warszawa, 20.07.2018 r.

Dr hab. n. farm. Sylwia Flis, prof. NIL

Narodowy Instytut Leków
w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Ciesielskiej
„Udział α Klotho w transformacji nowotworowej pęcherza moczowego”**

Rak pęcherza moczowego zajmuje dziewiąte miejsce pod względem częstości zachorowań na nowotwory złośliwe na świecie i jest najczęściej występującym nowotworem układu moczowego w Polsce. Najczęściej diagnozowane są nowotwory nienaciekające błonę mięśniową pęcherza moczowego (NMIBC), które charakteryzują się częstymi nawrotami. Z tego względu występuje konieczność wielokrotnego monitorowania i powtarzania zabiegów, a nowotwory pęcherza moczowego są jednymi z najbardziej kosztownych w leczeniu. W wielu przypadkach już w momencie diagnozy stwierdza się przerzuty do węzłów chłonnych, stąd wskaźnik 5-letniego przeżycia wynosi zaledwie 15%.

O ile w nowotworach innych narządów takich jak gruczoł sutkowy (piers), jelito, czy jajniki stwierdza się charakterystyczne markery pozwalające na wczesną diagnozę, o tyle w nowotworach pęcherza moczowego brak jest doniesień wskazujących na istnienie charakterystycznych markerów diagnostycznych pozwalających na wczesne wykrycie choroby lub też monitorowania jej progresji.

Na podstawie danych literaturowych dotyczących przebiegu procesu transformacji nowotworowej pęcherza moczowego Pani Agnieszka Ciesielska postawiła hipotezę badawczą wedle której białko α Klotho, zaangażowane w regulację szlaku FGF/FGFR (rozregulowanego w omawianej jednostce chorobowej) i obecne w moczu pacjentów, może przyczyniać się do rozwoju i progresji choroby. Dlatego podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest w pełni uzasadniona i nie tylko cenna pod względem naukowym, ale ważna przede wszystkim z praktycznego punktu widzenia.

Weryfikacja postawionej hipotezy badawczej poprzedzona była określeniem przez Doktorantkę jasno sprecyzowanych zadań badawczych takich jak: ocena wpływu zmian epigenetycznych na ekspresję genu *α Klotho*, ocena wpływu białka α Klotho na aktywność szlaku FGF/FGFR oraz ocena wpływu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w genie *α Klotho* na ryzyko wystąpienia raka pęcherza moczowego.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Ciesielskiej została wykonana w Katedrze Cytobiochemii Instytutu Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego i przygotowana w formie klasycznej, w której wyróżniono piętnaście rozdziałów obejmujących 158 stron estetycznie przygotowanej publikacji, zawierającej 9 tabel oraz 23 rysunki, a zakończonej spisem 237 odnośników cytowanej literatury. Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią dwie prace doświadczalne opublikowane w *Folia Medica Lodziensia* punktowanych przez MNiSW, w których doktorantka jest pierwszym autorem. Należy podkreślić, że w sumie doktorantka w swoim dorobku naukowym jest współautorką sześciu prac oryginalnych oraz trzech prac przeglądowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF ~10.535.

We wstępie Doktorantka krótko opisuje aktualne dane dotyczące częstości zachorowań na nowotwory pęcherza moczowego w Polsce i na świecie oraz etiologii choroby, po czym bardzo szczegółowo opisuje strukturę genu *α Klotho* oraz kodowanego przez niego białka jak również rolę i znaczenie tegoż białka w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Cel pracy jest sformułowany właściwie i dobrze oddaje opisywane w dalszej części badania. Bardzo starannie opisano również metodykę pracy, co pozwala czytelnikowi odtworzyć wykonane doświadczenia. Należy wspomnieć, że do badań wykorzystano „bogatą” kolekcję materiału biologicznego

pochodzącego od pacjentów (73 preparaty tkanki nowotworowej pęcherza moczowego oraz 96 preparatów krwi od pacjentów ze zdiagnozowanym przejściowokomórkowym rakiem pęcherza moczowego) jak również od zdrowych dawców (5 preparatów prawidłowej tkanki pęcherza moczowego oraz 114 preparatów krwi). Dodatkowo w badaniach wykorzystano linię komórkową ludzkiego raka pęcherza moczowego T24.

W swojej pracy doświadczalnej Doktorantka wykorzystwała metody badawcze obejmujące techniki z zakresu biologii komórki oraz biologii molekularnej. Zastosowane metody pozwoliły na ocenę poziomu cytotoxyczności inhibitorów metylotransferaz DNA i deacetylaz histonów tj. 5'-aza-2'-deoksycytidyny (AZA) oraz trichostatyny A (TSA); oznaczenie poziomu ekspresji genów *ETS1*, *PAX6*, *c-Myc*, *c-Fos*, *STAT1*, *STAT3* kodujących czynniki transkrypcyjne oraz poziomu białka ERK1/2, pośrednich „wskaźników” aktywacji szlaku FGF/FGFR; jak również na dokonanie analizy trzech wybranych polimorfizmów (rs1207568, rs564481, rs9527025) genu *αKlotho*. Dobór metod świadczy o dojrzałości naukowej i pracowitości Doktorantki oraz o wielokierunkowym podejściu do postawionego problemu badawczego.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż ekspresja genu *αKlotho* oceniana na poziomie mRNA jest niższa w przypadku nowotworów pęcherza moczowego w porównaniu z tkanką prawidłową, co więcej wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu (ocenionej na podstawie badań histopatologicznych) poziom białka *αKlotho* jest coraz niższy. Jednak obserwowany spadek ekspresji genu *αKlotho* w próbkach pacjentów nie ma związku z jego wyciszeniem wynikającym z metylacji wysp CpG w regionie promotorowym badanego genu (uzyskane różnice w profilu metylacji genu *αKlotho* między próbkami tkanki zdrowej i nowotworowej nie były istotne statystycznie). Autorka wykorzystując linię komórkową T24 wykazała również, że białko *αKlotho* wpływa na aktywację kinazy ERK1/2, czego efektem jest zmiana poziomu mRNA dla badanych czynników transkrypcyjnych. Co więcej poziom p-ERK1/2 zależny był od stężenia i rodzaju użytego do stymulacji białka FGF. Kolejnym ważnym, z klinicznego punktu widzenia, wynikiem jest wykazanie, iż dwa z trzech analizowanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) genu *αKlotho*, rs1207568 (G-395A) oraz rs952705 (C370S) mogą zwiększać ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego.

Czas wykonywania pracy doktorskiej jest dla młodego naukowca pewnego rodzaju punktem przejścia, kiedy to zaczyna bardziej samodzielnie, niezależnie, a przede wszystkim aktywnie działać w obszarze prowadzonych badań. Napisanie pracy doktorskiej jest ukoronowaniem wieloletniej pracy, pozwalającym na dojrzałe, krytyczne spojrzenie na uzyskane w toku badań wyniki. Stąd też, jakość rozprawy doktorskiej i opisanych w niej doświadczeń można ocenić w różny sposób. Pewne spostrzeżenia poczynione podczas czytania pracy sprawiają, że chciałabym, aby Doktorantka podczas obrony rozprawy doktorskiej ustosunkowała się do poniższych zagadnień.

1. Z założenia wstęp do każdej pracy naukowej jest pewnego rodzaju zapoznaniem czytelnika z aktualnym stanem wiedzy danego zagadnienia oraz wyjaśnieniem/uzasadnieniem dlaczego doktorant podjął ten a nie inny kierunek badań, a tym samym stanowi pewnego rodzaju podstawę do sformułowania celu/celów badań. We wstępie należy wykazać, w jaki sposób prowadzenie pracy badawczej stanowiącej temat rozprawy może uzupełnić obecny stan wiedzy. Wstęp w recenzowanej pracy jest niezwykle obszerny i w moim przekonaniu zawiera wiele informacji, bardzo szczegółowo opisujących zagadnienia, które nie mają swojego odzwierciedlenia w podjętym kierunku badań. Natomiast, zaskakujący jest fakt, że brak jest we wstępie jakichkolwiek informacji dotyczących mechanizmów epigenetycznej regulacji ekspresji genów i ich ewentualnego wpływu na rozwój i progresję nowotworów układu moczowego, których zbadanie było *notabene* jednym z głównych celów badań recenzowanej pracy.
2. We wszystkich pracach doświadczalnych istotnym elementem jest przeprowadzenie odpowiedniej analizy statystycznej otrzymanych wyników, której również nie zabrakło w pracy doświadczalnej autorki. Niemniej jednak informacja o tym, że taka analiza była w ogóle przeprowadzona znajduje się dopiero w części Wyniki i dotyczy tylko niektórych z zaprezentowanych rezultatów np. pkt. 10.1 oraz 10.3.1. W pozostałych częściach brak jest jakiegokolwiek informacji dotyczącej analizy statystycznej, chociaż istotności są naniesione na wykresy np. rys. 13. Informacja o przeprowadzonej analizie statystycznej, w tym zastosowanych testach statystycznych w zależności od rodzaju analizowanych próbek oraz nazwy użytego algorytmu lub programu komputerowego powinna znaleźć się w

części Metody. Co więcej, w pracy brak jest informacji dotyczących w jakiej postaci wyrażono wyniki (np. średnia arytmetyczna i średni błąd standardowy (SEM), czy odchylenie standardowe (SD)). Taka informacja wraz z zaznaczeniem liczebności grup, czy liczby powtórzeń danego eksperymentu oraz określeniem jaką wartość p oznaczają jedna lub dwie gwiazdki naniesione na wykresy powinna się znaleźć w legendzie lub opisie pod rysunkiem, co znacznie ułatwiłoby czytelnikowi interpretację wyników.

3. W pracy zabrakło mi również informacji o sposobie doboru zakresu stężeń związków wykorzystywanych w doświadczeniach. Wydaje mi się, że szczególnie dobór dawek AZA i TSA do doświadczeń mających na celu ocenę ich wpływu na odwrócenie efektu metylacji genu *α Klotho* powinien opierać się na wyznaczeniu krzywej zależności dawka-efekt i na tej podstawie wyznaczeniu wartości np. IC₅₀ (czyli stężenia hamującego żywotność/proliferaację komórek o 50%). W przypadku tej części eksperymentów wydaje się zasadne dokonanie nie tylko oceny poziomu metylacji genu *α Klotho*, ale również poziomu acetylacji histonów (np. wykorzystując metodę immunoprecypitacji CHIP) co ma również związek z uwagą zamieszczoną w kolejnym punkcie.
4. Mianowicie, w pracy wykazano, że metylacja regionu promotorowego nie ma ścisłego związku z obniżeniem ekspresji genu *α Klotho* w raku pęcherza moczowego, co w pewnym sensie poddaje w wątpliwość przeprowadzenie doświadczeń na linii komórkowej T24. Z drugiej strony dlaczego nie podjęto próby ustalenia innych czynników, które mogłyby wpływać na regulację ekspresji genu *α Klotho* np. wspomnianego poziomu acetylacji histonów, poziomu czynników transkrypcyjnych, czy miRNA.
5. Chciałabym również uzyskać od Doktorantki wyjaśnienie, czym się kierowała wybierając gen *HPRT1* jako gen referencyjny do analizy RT-qPCR. Odpowiednie dobranie genu referencyjnego i walidacja warunków reakcji RT-qPCR ma istotny wpływ na wiarygodność otrzymanych wyników.
6. Autorka wykazała również, że białko α Klotho (α KL) wpływa na sygnalizację zależną od szlaku FGF/FGFR indukując wzrost lub spadek ekspresji określonych genów – odpowiednio: *c-Myc* i *c-Fos* oraz *STAT1* i *STAT3*. Jednakże nie podjęto próby wyjaśnienia w jaki sposób zmiana w poziomie ekspresji tych genów wpływa chociażby

na proliferację badanych komórek, czy na inne procesy komórkowe tj. zdolność do migracji i inwazyjności.

7. W dyskusji zabrakło mi również krótkiego komentarza dotyczącego wykazania przez Doktorantkę, iż dwa SNP-y genu *aKlotho* rs1207568 (G-395A) oraz rs952705 (C370S) mogą zwiększać ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego. Jest to dość ważny wynik, który warto by było ocenić/przeanalizować np. pod względem korzyści klinicznych.
8. Niestety w pracy nie zabrakło tzw. literówek, drobnych niezręczności stylistycznych oraz pomyłek merytorycznych (np. zamienne stosowanie terminów hiper- i hipofosfatemia) wynikających zapewne bardziej z nieuwagi niż niewiedzy Doktorantki.

Pragnę jednak podkreślić, że moje uwagi nie umniejszają wartości poznawczej ocenianej pracy. Pani Agnieszka Ciesielska bez wątpienia wykazała się znajomością warsztatu badawczego oraz umiejętnością krytycznej analizy otrzymanych wyników. Uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Magdaleny Bryś spełnia wymagania określone w aktualnie obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Ciesielskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Sybilma Flis