

Dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN
Pracownia Sygnalizacji Komórkowej
Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Łódź, 11 lipca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr. Macieja Sobczaka

pt. Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach in vitro oraz in silico.

Nowotwór to skomplikowana molekularnie zmiana patologiczna, która obejmuje przede wszystkim deregulację wielu szlaków sygnałowych i procesów komórkowych. Ze względu na złożoność oraz nagromadzenie różnorodnych zmian komórkowych, głównym problemem w walce z chorobami nowotworowymi jest brak uniwersalnych i wiarygodnych metod identyfikacji wczesnych zmian nowotworowych oraz skutecznych terapii. Fakt ten powoduje, że nowotwory pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów zarówno w Polsce, jak i na świecie. Stąd wynika również nieustanne zainteresowanie badaczy mechanizmami, które odpowiadają za powstawanie i progresję poszczególnych typów nowotworów. Spośród nich największą uwagę naukowców poszukujących nowych terapii antynowotworowych skupiają mechanizmy promujące nadmierną proliferację oraz inwazję komórek nowotworowych w organizmie człowieka oraz te, które przeciwdziałają skutkom stosowanych terapii. Cykl prac składających się na rozprawę Pana Macieja Sobczaka niewątpliwie wpisuje się w ten nurt badawczy.

Badania Pana mgr. Macieja Sobczaka opisane w przedłożonej mi do recenzji rozprawie doktorskiej dotyczą roli jaką pełnią elementy maszynarii epigenetycznej w regulacji transkrypcji w komórkach raka piersi i płuc w kontekście procesów podziałów komórkowych i naprawy materiału genetycznego oraz nabywania oporności wielolekowej. Ze względu na to, że rak płuc i piersi wykazują jeden z najwyższych wskaźników śmiertelności wśród chorych wybór modelu eksperymentalnego uważam za słuszny a zarazem interesujący do realizacji celów badawczych w ramach pracy doktorskiej. Cele szczegółowe

pracy, które obejmowały przede wszystkim wielowątkową analizę epigenetycznej regulacji ekspresji genów przez kompleks acetylotransferazy histonowej EP300 oraz białka BRG1 (składnik kompleksu SWI/SNF) wskazują, że Doktorant w swojej pracy podjął się wykonania bardzo ambitnych zadań.

Pracę doktorską Pana mgr. Macieja Sobczaka stanowi zbiór czterech spójnych tematycznie prac, trzech eksperymentalnych i jednej przeglądowej, o sumarycznym współczynniku IF=18, 891. Kopie publikacji wraz oświadczeniami współautorów zostały włączone do rozprawy doktorskiej. Wszystkie wyniki badań zamieszczone w trzech publikacjach eksperymentalnych i wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie *Cancers*. Praca przeglądowa została napisana w języku polskim i opublikowana w *Postęпах Biochemii*. Przygotowanie tej pracy było zapewne doskonałym przygotowaniem Doktoranta do napisania rozprawy. Pan Maciej Sobczak jest pierwszym autorem we wszystkich czterech pracach. Dołączone oświadczenia współautorów potwierdzają wiodącą rolę Doktoranta w przygotowaniu koncepcji badań, ich realizacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu do publikacji. Fakt ten świadczy o tym, że Doktorant posiada ustawową umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Do cyklu prac dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim. W mojej opinii przedstawiony do oceny zbiór publikacji spełnia formalne wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami).

Omówienie poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poprzedzone jest informacją o finansowaniu badań, pozostałym dorobku Doktoranta oraz odbytych stażach zagranicznych. Na podstawie zamieszczonej informacji można stwierdzić, że Pan Maciej Sobczak w trakcie realizacji pracy doktorskiej wykazywał się dużą aktywnością naukową, tj. jest pierwszym autorem trzech innych prac, które nie wchodzą w skład rozprawy. Ponadto doskonalił swój warsztat badawczy w trakcie trzymiesięcznego stażu w German Cancer Research Center w Heidelbergu. Godnym podkreślenia jest również fakt, Doktorant swoje badania realizował w ramach projektów kierowanych przez Promotorkę, dr hab. Agnieszkę Robaszkiewicz, i finansowanych przez NCN oraz NCBiR.

W rozdziale pt. *Wstęp* Pan mgr Maciej Sobczak opisuje aktualny stan wiedzy oraz główne zagadnienia badawcze związane z funkcjonowaniem badanych białek, EP300 i BRG1. Doktorant przedstawia przedmiot swoich badań krótko i skupiając się głównie na szczegółach mechanizmu działania EP300 i BRG1. W tym rozdziale brakuje mi krótkiej charakterystyki innych elementów istotnych dla rozprawy, tj. roli białka PARP, p53 czy kompleksu COREST w procesie progresji nowotworowej oraz syntetycznego opisu kluczowych etapów nowotworzenia. Moim zdaniem umieszczenie takich informacji w sposób bardziej czytelny i jednoznaczny podkreśliłoby kontekst wykonanych badań oraz znaczenie celów szczegółowych rozprawy doktorskiej. Brak opisu szerszego kontekstu badań odzwierciedla też lista cytowanych publikacji, która zawiera tylko 27 pozycji literaturowych, co jest dość skromną liczbą w porównaniu do złożoności omawianych zagadnień. W następnym rozdziale Doktorant przedstawia cel pracy, którym była identyfikacja elementów epigenetycznych

zaangażowanych w regulację ekspresji genów istotnych dla procesów związanych z podziałem komórek oraz naprawą uszkodzeń DNA. Przedstawione w dalszej części cele szczegółowe dobrze opisują poszczególne etapy badań, które to obejmowały przede wszystkim: 1) analizę i porównanie transkryptomu pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi w celu identyfikacji genów o zmienionym profilu ekspresji, których produkty są zaangażowane w proces proliferacji i naprawę uszkodzeń DNA; 2) analizę regionów promotorowych wybranych genów; 3) wyjaśnienie roli BRG1 oraz EP300 w regulacji ekspresji wybranych genów; 4) analizę funkcji białka PARP w regulacji aktywności kompleksu EP400-BRG1; 5) analizę sekwencji promotorowych wybranych transporterów ABC pod kątem wiązania białek regulatorowych i odpowiedzi komórki na cisplatynę.

W następnym rozdziale Doktorant opisał materiały i modele badawcze. Do swoich badań wybrał linie komórkowe raka piersi, MCF-7 i MDA-MB-231 oraz płuc, A549. Oba modele komórek są standardowym modelem stosowanym w badaniach *in vitro* i zostały wybrane na podstawie analiz *in silico* wykonanych na potrzeby niniejszej rozprawy. Takie podejście, czyli wykorzystywanie ogólnie dostępnych danych do planowania eksperymentów wydaje się rozsądne i godne podkreślenia. Nieco zaskakujący jest dla mnie fragment pt. *Analizy in vitro*, str.13, w którym to Doktorant w dość niestandardowy sposób, jak na opis metod i materiałów, przedstawia opis zastosowanych metod wraz z celami pracy i uzyskanymi wynikami. Dla mnie jest to raczej opis wykonanych eksperymentów i uzyskanych wyników. Do analizy zmian aktywności badanych enzymów lub ich kompleksów Doktorant wykorzystał dwa podejścia eksperymentalne, a mianowicie farmakologiczne blokowanie aktywności za pomocą inhibitorów lub wyciszenie ekspresji enzymów za pomocą siRNA. W mojej ocenie zastosowanie dwóch różnych podejść eksperymentalnych znacznie podnosi wiarygodność otrzymanych wyników. Ponadto do realizacji wszystkich zaplanowanych celów szczegółowych zostało wykorzystane całe spektrum różnorodnych i nowoczesnych technik badawczych wśród, których chciałabym wymienić: 1) analizy transkryptomów oraz sekwencji promotorowych genów zdeponowanych w bazie NCBI GEO, z wykorzystaniem wielu narzędzi informatycznych i statystycznych, których szczegółowy opis znajduje się str.12-13 rozprawy, 2) metody do oceny ekspresji genów, takie jak: PCR w czasie rzeczywistym, immunoprecypitacja chromatyny, 3) metody do identyfikacji białek i ich kompleksów w komórce - Western Immunoblotting, immunoprecypitacja, barwienie immunofluorescencyjne, mikroskopia konfokalna, cytometria przepływowa, spektrometria mas. Taki zestaw metod umożliwił Doktorantowi wielowymiarową analizę problemu badawczego oraz dał solidną podstawę do formułowania wniosków końcowych.

Cykl prac eksperymentalnych stanowiących rozprawę doktorską doskonale uzupełnia praca przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie *Postępy Biochemii*, pt. *Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych*. Praca ta w sposób szczegółowy opisuje rolę białka BRG1 w progresji nowotworowej. Struktura i potencjalne interakcje BGR1 w komórce zostały zilustrowane na dwóch klarownych rycinach, co świadczy o doskonałej znajomości przedmiotu badań przez Doktoranta. Najważniejszą jednak część rozprawy stanowią

oryginalne wyniki przedstawione i przedyskutowane w trzech pracach eksperymentalnych. Do najbardziej wartościowych i oryginalnych wyników cyklu, zaliczyłabym:

1. Wyniki analiz *in silico* dostępnych baz danych, które pozwoliły na ukierunkowanie i zdefiniowanie prac eksperymentalnych.
2. Identyfikację powstawania kompleksu EP300-BRG1 oraz potwierdzenie jego roli w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w podziały komórkowe i naprawę DNA w komórkach nowotworowych.
3. Potwierdzenie udziału białka PARP1 w regulacji funkcji kompleksu EP300-BRG1.
4. Opisanie mechanizmu zależności pomiędzy EP300, białkiem p53 oraz kompleksem CoREST.
5. Potwierdzenie, że kompleks CoREST powoduje obniżenie poziomu ekspresji wybranych transporterów z rodziny ABC w komórkach linii raka płuc, A549 i piersi, MDA-MB-231, w odpowiedzi na podanie cisplatyny.

Na podstawie powyższego podsumowania wyników stwierdzam, że Doktorant w sposób oryginalny i nowatorski opisał epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów w komórkach raka piersi i płuc. Biorąc jednak pod uwagę ustawowe obowiązki recenzenta związane z krytycznym spojrzeniem na ocenianą rozprawę doktorską chciałabym poddać pod rozagę Doktoranta następujące uwagi i spostrzeżenia:

1. W rozdziale *Wstęp* Doktorant w opisie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój nowotworów dokonał bardzo wielu skrótów i uogólnień. Na skutek tego szereg zdań jest nieprecyzyjnych lub błędnych w swoim znaczeniu. Np. na stronie 7 Doktorant zamieścił stwierdzenie: *W dalszych etapach rozwoju guza nowotwór może przedostać się do węzłów chłonnych, naciekać tkanki otaczające guz, lub rozsiewać się daleko do położonych tkanek.* Przedostaje i rozsiewa się nowotwór czy komórki nowotworowe? Czy każdy nowotwór tworzy guz? Dlaczego Doktorant ani razu w swojej rozprawie nie używa określenia „rak” chociaż rozprawa dotyczy raka piersi i płuc.
2. Na stronie 7 Doktorant stwierdza: *Inwazyjny fenotyp komórki nowotworowej spowodowany jest szeregiem mutacji w obrębie jej genomu.* Aktywność czynników zaangażowanych w powstawanie fenotypu inwazyjnego lub bezpośrednio w migrację i inwazję komórek nowotworowych wynika raczej ze zmian min. w sygnalizacji komórkowej, a nie bezpośrednio z mutacji w ich genach. Niekontrolowane podziały komórkowe oraz nadmierna proliferacja to nie jest to samo co inwazyjność i zdolność do przerzutowania komórek nowotworowych. Co więcej bardzo często zdarza się, że komórki rakowe o fenotypie inwazyjnym ograniczają proces proliferacji.
3. Na stronie 7 znajduje się zdanie: *„Z kolei zmiany na poziomie transkrypcji uwarunkowane są zmianami w funkcjonowaniu enzymów epigenetycznych warunkujących dostępność chromatyny dla maszyneryi transkrypcyjnej.”* Zmiany poziomu transkrypcji zależą też od innych

nieepigenetycznych czynników. Proces inicjacji i poziom transkrypcji genu nie zależy tylko od aktywności czynników epigenetycznych.

4. Na stronie 8 w opisie przedmiotu badań Doktorant stwierdza, że „*Co więcej, dobrze udokumentowana jest rola tych enzymów w procesie onkogenezy w przypadku wielu nowotworów*” Po tym zdaniu nasuwa się czytelnikowi pytanie to po co je badać? Dalszy opis białka BRG1 pogłębia wątpliwości, bo w ogóle nie precyzuje w jakich typach nowotworów białko to było badane, ref. 4-8 czy 11. Dlaczego konsekwentnie Doktorant nie umieszcza informacji o typach nowotworów, w których obserwowano dany efekt?
5. Czy szlaki sygnalizacyjne WNT i PI3K/AKT można nazwać procesami komórkowymi (str.8)? Jeśli w rozprawie procesy komórkowe to podział i naprawa DNA to konkretne, pojedyncze szlaki sygnalizacyjne nie powinny być określane w ten sam sposób.
6. Zakończenie rozdziału *Wstęp* jest w zasadzie podsumowaniem uzyskanych wyników. W mojej opinii dla całej rozprawy lepiej byłoby gdyby zawierało informacje o przesłankach do przeprowadzenia badań.
7. *Cel pracy*. Stwierdzenie, że procesy proliferacji i naprawy DNA są kluczowe dla inwazji komórek nowotworowych jest sporym i dość nieprecyzyjnym uogólnieniem. Wymienione procesy są kluczowe dla ogólnej progresji nowotworowej a nie tylko dla jednego z jej etapów. Podobne nieścisłości zawiera stwierdzenie: „*odpowieź sekwencji promotorowych wybranych genów ABC na działanie cisplatyny*”. Pojawienie się cisplatyny w środowisku powoduje ogólną odpowiedź komórki, na którą to składa się szereg zmian, a zmiany obejmujące sekwencje promotorowe są jednymi z wielu elementów.
8. *Materiały i metody*. Doktorant napisał, że linie MCF7 i A549 pochodzą z ATCC (American Type Culture Collection), brak informacji z jakiej kolekcji pochodzi linia MDA-MB-231 Sigma-Aldrich to nazwa firmy, a nie kolekcji referencyjnej..
9. *Analizy in silico*. Dane RNA-seq dla guza pierwotnego piersi pochodziły od jednej pacjentki? Użycie liczby pojedynczej wskazuje, że tak, chociaż opis metod w publikacji wskazuje na coś innego. Dlaczego zastosowanie tych danych nie znalazło odzwierciedlenia w celach szczegółowych pracy a tylko w opisie materiałów i metod? Brak jednoznacznego wyjaśnienia lub komentarza w dalszej części rozprawy.
10. W rozprawie pojawiają się błędy językowe i edytorskie, np. *linia nowotworu płuca* (str.11), jednego płuca czy raczej ogólnie linia raka płuc, *analiza ilościowa Real Time PCR- całościowy polski odpowiednik to analiza ilościowa PCR w czasie rzeczywistym, geny zaangażowane w kontrole przebiegu cyklu komórkowego* (str.20) geny czy ich produkty? *osłabienie transkrypcji genów* (str.20) czy raczej obniżenie poziomu transkrypcji, *bez zmian pozostawały geny* (str.23) czy raczej ich poziom ekspresji, *pobudzić ekspresję ABCC10* (str.25) czy raczej zwiększyć poziom ekspresji. Literówki: np. *analiza reszt ADP-rybozy na białka BRG1 i EP300, powinno*

być : analiza reszt ADP-rybozy na białkach BRG1 i EP300. Nieprawidłowa edycja tekstu na str.21 podobnie pkt.1 w rozdziale *Wnioski*, str.27

11. Doktorant nie uniknął też w tekście rozprawy stosowania kolokwializmów lub fraz, które są dosłownym tłumaczeniem z języka angielskiego, np. obróbka surowych danych (str.7), obróbka statystyczna (oświadczenie Doktoranta), komórki przyzwyczajano do pożywki (str.11), odporność na uszkodzenia DNA (str.19), podążając za myślą (str.22)

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej mi rozprawy. Mam nadzieję, że Doktorant potraktuje je jako uzasadnione i cenne wskazówki, a nie nadmierną krytykę. Po lekturze rozprawy mam również kilka pytań, które odnoszą się głównie do części wstępnej prezentującej ogólną wiedzę Doktoranta na temat przedmiotu rozprawy:

1. Czy zdaniem Doktoranta inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych jest tylko wynikiem nagromadzenia mutacji w genomie i zmianami w transkryptomie ? Czy może jeszcze inne mechanizmy maszynerii komórkowej odpowiadają za inwazyjność komórek, np. zmiany i modyfikacje potranskrypcyjne lub potranslacyjne. Jak Doktorant definiuje fenotyp inwazyjny komórek rakowych?
2. Czy zmiany na poziomie transkrypcji genów uwarunkowane są tylko zmianami w funkcjonowaniu enzymów epigenetycznych ? Czy sekwencje promotorowe genów, a tym samym profil ekspresji genów może być modyfikowany przez inne nieepigenetyczne czynniki ? Jeśli tak to jakie?

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana Macieja Sobczaka spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Przedmiotem cyklu prac składających się na rozprawę jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W poszczególnych rozdziałach rozprawy Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań. Dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów badań potwierdzają, że Doktorant posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. A zatem zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr. Macieja Sobczaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

