



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Ocena rozprawy doktorskiej magistra Macieja Sobczaka zatytułowanej: „Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach *in vitro* oraz *in silico*”.

W ocenianej rozprawie doktorant podejmuje próbę identyfikacji białek kluczowych dla inwazyjności i ochrony przed uszkodzeniami materiału genetycznego komórek nowotworowych i wyjaśnienia znaczenia modyfikacji histonowych w regulacji tych genów kodujących te białka. Następnie doktorant skupia się na znaczeniu białka BRG1 i acetylotransferazy EP300 w regulacji części zidentyfikowanych genów i białka PARP1 w regulacji aktywności kompleksu BRG1-EP300 oraz transkrypcji BRG1-EP300-zależnych genów. Na koniec autor koncentruje się na mechanizmach regulacji białek ABC i roli CoREST oraz białka p53 w regulacji niektórych genów z tej rodziny, w odpowiedzi na działanie cisplatin.

Bez wątpienia jest to bardzo ambitny projekt a rezultaty przeprowadzonych przez doktoranta eksperymentów mogą mieć duże znaczenie dla rozwoju dziedziny.

Ogólna ocena formalna:

Przekazana do recenzji rozprawa liczy 111 stron i składa się z następujących części: spisu treści, opisu źródeł finansowania projektu, opisu dorobku naukowego doktoranta, włączając cztery publikacje stanowiące cykl publikacji w pracy doktorskiej, o łącznej wartości: IF=18,891 oraz 440 punktów MNiSW, których doktorant jest pierwszym autorem, opisu pozostałego dorobku naukowego doktoranta, włączając prezentacje na konferencjach i staży zagranicznych, a następnie wstępu do pracy, opisie celów pracy, opisu materiałów i metod, omówienia wyników oraz wniosków i spisu cytowanej literatury. Dysertacja zakończona jest streszczeniami w języku polskim i angielskim, załącznikami oraz listą oświadczeń współautorów. Układ dysertacji jest standardowy dla tego typu prac i zawiera wszystkie wymagane części.

Ocena kluczowych części rozprawy:

Dorobek naukowy i staże zagraniczne doktoranta.

Doktorant jest pierwszym autorem siedmiu publikacji, w większości w *peer reviewed journals*. Dodatkowo aktywnie uczestniczy w popularyzacji wyników swoich badań naukowych i odbył już staż zagraniczny. To pokazuje ogromny potencjał kandydata by stał się w przyszłości liderem badań naukowych w swojej dziedzinie.

Wstęp teoretyczny:

Wstęp teoretyczny do dysertacji jest ogólny i wielu aspektach niewystarczający. Skutkuje to tym, że niektóre zdania są niezrozumiałe np.: „Z kolei zmiany na poziomie transkrypcji uwarunkowane są zmianami w funkcjonowaniu enzymów epigenetycznych warunkujących dostępność chromatyny dla maszyneryi transkrypcyjnej” wymaga doprecyzowania, gdyż jest w mojej opinii za dużą generalizacją. Opisywany pokrótce przez autora związek pomiędzy mutacjami, zmianami transkrypcji „enzymów epigenetycznych” i maszyneryi dostępu chromatyny nie jest zrozumiały i wymaga wyjaśnień.

Definicja „enzymów epigenetycznych” powinna też być precyzyjnie przedstawiona w tej części, gdyż nie jest jasne jakie dokładnie enzymy według autora to enzymy epigenetyczne.

We wstępie brakuje także referencji (choć nie są to referencje kluczowe) jak np. w zdaniu: „Z danych literaturowych wiadomo, że między tymi enzymami dochodzi do ścisłej współpracy na przykład w regulowaniu ekspresji genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA”, czy „Co więcej, dobrze udokumentowana jest rola tych enzymów w procesie onkogenezy w przypadku wielu typów nowotworów, czy „BRG1 wpływa na proliferację komórek bezpośrednio regulując przebieg cyklu komórkowego oraz reguluje ekspresję genów zależnych od czynników E2 (E2F) m.in. cykliny A czy cykliny E.”, czy „Ponadto, doniesienia literaturowe ukazują rolę EP300 w powstawaniu oporności wielolekowej (MDR) w odpowiedzi na leczenie chemioterapeutykami.” Fakt braku odpowiednich referencji znacząco obniża jakość tekstu.

Autor także wprowadza w tekście nowe pojęcia, ale nie przedstawia ich definicji, jak na przykład pojęcie „wyspa CpG”.

Dodatkowo, wstęp powinien zostać podzielony na odpowiednie sekcje, odnoszące się do jednego problemu, np. sekcja omawiająca każde z badanych białek, czy sekcja omawiająca mechanizmy powstawania oporności. Podsumowując, autor w relatywnie krótkiej sekcji odnosi się do ogromnej ilości zagadnień biologicznych, jednak nie opisuje w sposób należyty ich kontekstu, a brak podziału na sekcje czyni go trudnym do zrozumienia dla czytelnika.

Cel pracy:

Autor w tej sekcji w odpowiedni i logiczny sposób definiuje cele pracy doktoranckiej, którymi są: identyfikacja genów odpowiedzialnych za proliferację i naprawę uszkodzeń DNA w komórkach specyficznych linii komórkowych, analiza mechanizmów regulacji ekspresji genów ze szczególnym uwzględnieniem kilku kluczowych genów zaangażowanych w te procesy, a także badaniem zależności molekularnych między tymi genami i ich odpowiedzi na leczenie cisplatyną.

W dalszej części dysertacji doktorant uzasadnia wyżej wymienione cele w kontekście przeprowadzonych eksperymentów, co jest logicznym następstwem stawianych celów badawczych. Niemniej jednak niektóre pojęcia używane przez autora, podobnie jak we wstępie do pracy, wymagają doprecyzowania jak np. stwierdzenie, iż identyfikowane procesy biorą udział „determinowaniu odpowiedzi sekwencji promotorowych”, nie jest jasne tu co autor rozumie przez odpowiedź sekwencji promotorów.

Materiały i Metody:

Sekcja ta zawiera wystarczający na potrzeby dysertacji opis materiałów i metod, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż szczegółowy opis znaleźć można w publikacjach naukowych Doktoranta, które są częścią dysertacji. Sekcja to jednocześnie pokazuje bardzo dobrze rozwinięty warsztat metodologiczny Doktoranta.

Omówienie wyników:

Ponad 9 stron omówienia wyników zawiera tylko jedną Rycinę i jest jednolitym tekstem bez podziału na sekcje, co nie jest standardem dla tego typu prac. Sekcja ta powinna być podzielona na podsekcje opisujące poszczególne rezultaty. Niestety skonstruowanie tekstu w ten sposób czyni go nieprzejrzystym i bardzo trudnym do czytania, co ujemnie wpływa na jakość dysertacji. W mojej opinii podstawowym zadaniem autora w tego typu pracach jest zreferowanie w zrozumiały dla czytelnika sposób rezultatów swoich badań. Po zapoznaniu się z dysertacją, nie mam najmniejszej wątpliwości, że autor po przeprowadzeniu imponującej ilości złożonych eksperymentów (opublikowanych w *peer reviewed* artykułach) jest ekspertem w opisywanej dziedzinie. Niemniej jednak komunikowanie wyników swoich badań naukowych, jest kluczowe dla pracy naukowej.

Ta część dysertacji jest też w wielu miejscach nieprecyzyjna np. autor nie podaje, ile konkretnie genów zidentyfikował w pierwszej analizie, czy też ile genów przeanalizował pod kątem modyfikacji reszt histonowych (ta informacja znajduje się w tekstach publikacji załączonych do dysertacji, ale powinna być także uwzględniona w tekście rozprawy). Nie rozumiem także, co autor ma na myśli pisząc: „Niestety, z uwagi na duży odsetek powtórzeń par G-C wskazanie konkretnych czynników oddziałujących z tymi sekwencjami było niemożliwe”. Myśl ta wymaga dalszych wyjaśnień dlaczego bo duża liczba powtórzeń CG, która jest cechą ponad 60% promotorów kodujących białka, uniemożliwia przeprowadzenie takiej analizy.

Dodatkowo, brak precyzyjnych danych w wielu miejscach tekstu uniemożliwia czytelnikowi ocenę zasadności postulowanych konkluzji, np. zdanie: „....zastosowanie inhibitorów - C646 (EP300) oraz PFI-3 (SWI/SNF) obniżyło ekspresję....” – o ile zmieniła się ekspresja? Dalej: „Po zainhibowaniu BRG1, EP300 oraz CDK4/6, na promotorach CDK4, NEIL3, LIG1 zaobserwowano zwiększoną obecność białek RB1, HDAC1, oraz metylotransferazy EZH2, przy jednoczesnym oddysocjowaniu od promotora EP300 i redukcji poziomu acetylacji”- o ile zwiększyła się obecność opisywanych białek?

Jako recenzent muszę jeszcze zwrócić uwagę na fakt, że niektóre wnioski postulowane w tekście wydają się kontrowersyjne. Przykładowo, konkluzja: „....to zahamowanie ekspresji tych genów pod wpływem obniżenia aktywności enzymatycznej badanych białek bezpośrednio wskazuje na zaangażowanie BRG1-EP300 w stymulację wzrostu guza, oraz odpowiedzi nowotworu na potencjalne czynniki uszkadzające DNA” nie powinna być sformułowana bez przedstawienia wyniku eksperymentu pokazującego zmianę potencjału proliferacyjnego hodowli komórkowej w specyficznych warunkach eksperymentalnych (analizy markerów proliferacji nie są wystarczające). Tak samo, w przypadku analizy odpowiedzi naczynnikami uszkadzające DNA, należy sprawdzić zmianę liczba uszkodzeń DNA przed postawieniem konkluzji.

Podobnie w przypadku wniosku: „Biorąc pod uwagę funkcje pełnione przez powyższe geny, gdzie CDK2/4, PCNA, CCNB, CHEK2 zaangażowane są w kontrolę przebiegu cyklu komórkowego, natomiast produkty genów BRCA1/2, XRCC1/2, LIG1, EXO1, NEIL3 są składowymi szlaków naprawy uszkodzeń DNA takich jak BER, NER, SSBR, MMR, i HR [22,23], to zahamowanie ekspresji tych genów pod wpływem obniżenia aktywności enzymatycznej badanych białek bezpośrednio wskazuje na zaangażowanie BRG1-EP300 w stymulację wzrostu guza, oraz odpowiedzi nowotworu na potencjalne czynniki uszkadzające DNA” - bez pokazania w odpowiednim eksperymencie efektu specyficznych eksperymentalnych warunków na wzrost guza czy zmianę częstotliwości uszkodzeń DNA, stwierdzenie to jest zbyt daleko idące (cytowanie wyników innego eksperymentu nie jest tu wystarczające).

W kilku fragmentach, Autor postuluje także, iż niektóre charakteryzowane białka i kompleksy białkowe mogą remodelować chromatynę (usuwanie/przesuwanie nukleosomów). Taka teza powinna być oparta wynikami eksperymentów „nucleosome positioning”, jednakże wyniki te nie zostały przedstawione zarówno w dysertacji, jak i dołączonych publikacjach. Przykładowo, na stronie 25, autor pisze: „Do analizy wykorzystano gen ABCC4 o analogicznym do ABCC3 w komórkach A549 poziomie ekspresji...”. Wydaje mi się nie do końca uprawnione użycie specyficznego systemu eksperymentalnego do walidacji wyników badań, jedynie ze względu na podobny poziom ekspresji.

Podsumowując, znaczna część powyższego krytycyzmu ma charakter techniczny, jest tylko kwestią przeredagowania tekstu i nie wpływa moim zdaniem na ocenę ekspertyzy naukowej zdobytej przez Doktoranta podczas studiów doktoranckich. Dlatego też mimo powyższych niedociągnięć, na które jako recenzent muszę zwrócić uwagę, ta część rozprawy doktorskiej pokazuje bardzo wysoki poziomu metodologicznego przygotowania Doktoranta do pracy naukowej, a zaprezentowana logika i sposób wyciągania wniosków z eksperymentów jest adekwatny do poziomu doktora nauk.

Wnioski:

Wnioski są prawidłowo sformułowane, ale brakuje ich dyskusji w aspekcie limitacji zastosowanych eksperymentów.

Spis literatury:

Cytowana literatura jest adekwatna do opisywanego zagadnienia, choć jak już wspomniałem, w kilku miejscach tekstu brakuje referencji, co może wynikać jedynie z przeoczenia.

Streszczenia w języku polskim i angielskim:

Każde ze streszczeń obejmuje trzy strony, co jest stanowczo wykracza poza standardową długość streszczenia. Niemniej jednak oba teksty są odpowiednim streszczeniem wyników prezentowanych w dysertacji.

Publikacje składające się na dysertację:

Strony 38 do 101 to część dysertacji zawierająca cztery publikacje na których opiera się dysertacja. Trzy z tych prac przeszły proces *peer review*, zatem moje uwagi co do tej części dysertacji wynikają jedynie z obowiązku recenzenta.

Pierwsza publikacja opisuje interakcje PARP1 i EP300-BRG1 jak i genów regulowanych przez ten kompleks. Niektóre wnioski stawiane w tej publikacji w mojej opinii są zbyt daleko idące w kontekście przeprowadzonych eksperymentów, jednakże publikacja niewątpliwie pokazuje wysoki poziom warsztatu metodologicznego Doktoranta.

Druga publikacja skupia się na roli BGI w linii komórkowej raka piersi jako regulatora genów biorących udział w proliferacji i cyklu komórkowym. Publikacja ta niewątpliwie przyczynia się do wzrostu stanu wiedzy co do regulacji powyższych procesów w komórkach badanej linii komórkowej. Niemniej jednak konkluzja mówiąca, że BRG1 usuwa acetylowane nukleosomy powinna być traktowana z rezerwą, gdyż w mojej opinii taka teza wymaga dodatkowych eksperymentów. Podsumowując, publikacja ta znowu prezentuje wysoki warsztat przygotowania metodologicznego Doktoranta.

Trzecia praca to praca przeglądowa w języku polskim, której zasadniczą częścią jest podsumowanie rezultatów zaprezentowanych w pierwszych dwóch publikacjach. Praca pokazuje, że doktorant jest przygotowany do pisania tego typu publikacji, które są nieodzowną i ważną częścią pracy naukowej. Nie jest jednak dla mnie jasne, czy publikacja ta przeszła proces *peer review*, a informacja ta powinna być zawarta w rozprawie.

Ostatnia praca składająca się na rozprawę skupia się na molekularnych podstawach mechanizmu działania genów *ABCC* i roli białka CoREST w mechanizmie działania tych genów jak i mechanizmie działania alkylating cząsteczek na te geny. Hipotezy stawiane w tej publikacji pokazują aplikacyjny sposób myślenia Doktoranta, co niewątpliwie jest atutem w przyszłej pracy naukowej, a część metodologiczna tej pracy po raz kolejny jest dowodem na bardzo dobre przygotowanie metodologiczne Autora do przyszłej pracy naukowej.

Pozostała część dysertacji to wymagane oświadczenia współautorów.

Ogólne uwagi i komentarze:

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam poziom metodologicznego i merytorycznego przygotowania Doktoranta do przyszłej pracy naukowej, czego dowodem jest warsztat eksperymentalny zaprezentowany w tej rozprawie. Co ważne eksperymenty przeprowadzone przez Doktoranta to nie

tylko eksperymenty laboratoryjne, ale także analizy bioinformatyczne, co jest dużym atutem i niewątpliwie pokazuje wszechstronne przygotowanie Doktoranta do przyszłej pracy. Ponadto, logika wyciągania wniosków z eksperymentów i dyskusji rezultatów zaprezentowana przez Doktoranta w rozprawie jest adekwatna do poziomu doktora nauk.

Uwagi końcowe

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr. Macieja Sobczaka zatytułowanej: „Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach in vitro oraz in silico”. spełnia wymagania ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce i może być skierowane do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem

Tomasz K. Wojdacz 22-07-2022

Dr hab. med. Tomasz K. Wojdacz

Kierownik Samodzielnej Pracowni Epigenetyki Klinicznej

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin 14-02-2022

KIEROWNIK
Samodzielna Pracownia
Epigenetyki Klinicznej
dr hab.n.med. Tomasz K.Wojdacz