

Warszawa 24.05.2017

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej,
Centrum Onkologii-Instytut,
ul. Roentgena 5, 02-784 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„Wpływ czynnika slicingowego SRSF2 na regulację apoptozy w raku
nerkowokomórkowym typu jasnokomórkowego u człowieka”**

Autor: *mgr Hanna Kędzierska*

Apoptoza jest genetycznie zaprogramowanym procesem, którego celem jest usunięcie uszkodzonych i/lub starych lub niepotrzebnych komórek bez wywołania w organizmie stanu zapalnego. Tą drogą codziennie znika z naszego organizmu około 10^8 komórek. Proces ten jest ściśle regulowany przez cały szereg białek o aktywnościach inicjujących lub hamujących przebieg tego procesu. Jego inicjacja jest wynikiem odczytywania sygnałów dochodzących do komórki. Dostarczają one informacji o otoczeniu, stopniu uszkodzenia materiału genetycznego i zaburzeniach w przebiegu podstawowych procesów życiowych przebiegających w każdej komórce. Sygnały te są integrowane i przekładane na decyzje o uruchomieniu jednego z dwóch podstawowych szlaków egzekucyjnych. Ze szlakiem zewnętrznym związana jest aktywacja receptorów błonowych, zwanych receptorami śmierci, przez odpowiednie ligandy. Z uruchomieniem szlaku wewnętrznego związana jest informacja o nieodwracalnym uszkodzeniu materiału genetycznego, o stresie oksydacyjnym, braku aktywacji systemów naprawczych, systemów odpowiedzi na promieniowanie jonizujące czy integralności błony mitochondrialnej. Końcowym efektem obu szlaków jest uruchomienie odpowiedniej kaskady enzymów proteolitycznych i nukleolitycznych, które degradują jądro komórkowe i zawarty w nim materiał genetyczny i zamykają go wraz z częścią cytoplazmy i

fragmentami błony komórkowej w tzw. ciałkach apoptycznych. Ten proces jest poważnie zaburzony w komórkach nowotworowych. Przyczyną zaburzeń mogą być zarówno uszkodzenia w materiale genetycznym kodującym elementy systemu regulującego proces apoptozy jak i niedostatek i/lub uszkodzenia elementów wykonawczych. Ten ostatni rodzaj zaburzeń jest wynikiem zmian w poziomie ekspresji kanonicznych, pełnowartościowych transkryptów jak i nieprawidłowości w alternatywnym składaniu transkryptów, co prowadzi do braku lub tworzenia niepełnowartościowych elementów wykonawczych.

Nie jest łatwo odpowiedzieć na pytanie o przyczyny tworzenia nieprawidłowych produktów. Tworzenie alternatywnych form produktu jest bowiem fizjologicznym procesem występującym w prawidłowych komórkach. W komórkach nowotworowych proces alternatywnego składania często ulega zaburzeniu. Prowadzi to albo do zmian w poziomie alternatywnych, prawidłowych form transkryptów, albo do tworzenia jego nieprawidłowych form. Często też obserwuje się zmiany w proporcjach alternatywnych transkryptów, co może mieć odbicie w tkankowo- lub procesowo-specyficznych zmianach w poziomie ekspresji różnych genów. Mechanizmy rządzące tego typu zdarzeniami, ze względu na ogromny stopień złożoności rzadko kiedy są dobrze poznane. Często też prowadzą to do zaburzenia delikatnego systemu równowag i braku homeostazy komórkowej sprzyjającej nowotworzeniu. Podjęcie się oceny roli jaką w procesie alternatywnego składania odgrywa czynnik uczestniczący w tworzeniu alternatywnych form białek wykonawczych w procesie apoptozy uważam za zadanie bardzo ambitne, ale jednocześnie niezwykle skomplikowane.

Praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. Liczy aż 141 stron. Lista pozycji literatury obejmuje 286 pozycji. Pod względem językowym i edytorskim praca jest przygotowana z dużą starannością. Ryciny i schematy ideowe są przejrzyste. Do pracy dołączony jest siedmiostronicowy suplement z wynikami badań wielkoskalowych i bioinformatycznych oraz dwie publikacje: jedna praca oryginalna wieloautorska, której

doktorantka jest pierwszym autorem i w której zawarta jest część pracy doktorskiej i druga przeglądowa, też z pierwszym autorstwem doktorantki.

Ponieważ wiadomo było, że w jasnokomórkowym raku nerki obserwuje się zmiany w poziomie ekspresji czynnika SRSF2 uczestniczącego w składaniu (splicingu) transkryptów doktorantka postanowiła zbadać czy obserwowane zmiany wywierają wpływ na wzorzec składania, w tym szczególnie transkryptów kodujących białka związane z procesem apoptozy.

Materiałem w tej pracy były cztery komercyjne linie komórkowe jasnokomórkowego raka nerki wyprowadzone z materiału z guza o różnym stopniu zaawansowania i jedna linia komórkowa wyprowadzona z kanalików proksymalnych prawidłowej nerki oraz 32 próbki guzów ccRCC pobrane od pacjentów i 32 próbki kontrolne nie zawierające tkanki nowotworowej pobrane z przeciwległego krańca nerki. Na pobranie materiału ludzkiego lokalna Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę. Próbki pobrane z guza i próbki kontrolne były poddane ocenie histopatologicznej. Oceniano wielkość guza, stopień złośliwości wg Fuhrmana i stopień zaawansowania nowotworu w skali TNM. Wszystkie metody stosowane w tej pracy opisano w sposób wyczerpujący, a nawet można by powiedzieć wzorowy pozwalający na ich bezproblemowe odtworzenie.

Doktorantka zbadała zmiany w poziomie ekspresji SRSF2 w czterech liniach komórkowych jasnokomórkowego raka nerki, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. W dwóch liniach poziom mRNA był obniżony w stosunku do kontroli, a w dwóch nieznacznie podwyższony. Na poziomie białka obniżenie ilości białka obserwowano w trzech liniach, a w czwartej linii ilość białka była na poziomie kontroli. Podobne badanie przeprowadzono na próbkach nowotworowych pobranych od pacjentów chorych na ccRCC. Otrzymane wyniki wskazały nieznaczny, choć statystycznie znamieny spadek ekspresji SRSF2 w stosunku do

kontroli, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Opierając się na danych literaturowych wskazujących, że czynnik SRSF2 może brać udział w regulacji składania transkryptów genów apoptycznych doktorantka postanowiła sprawdzić czy zaobserwuje różnice w obrazie składania alternatywnych transkryptów wynikającą ze zmian ekspresji tego czynnika. Do eksperymentów wybrana została linia Caki-2. Ekspresja SRSF2 została wyciszona za pomocą siRNA. Następnie proces wyciszania powtórzono z dobrą skutecznością na pozostałych liniach ccRCC. Po zaprojektowaniu odpowiednich starterów pozwalających na obserwacje potencjalnych transkryptów autorka przeprowadziła analizę na kilku genach związanych z procesem apoptozy. Uzyskane wyniki potwierdziły zmiany w obrazie składania transkryptów pewnej liczby genów związanych z apoptozą. Zaobserwowano spadek ekspresji wariantów splicingowych o właściwościach proapoptycznych i wzrost ekspresji wariantów o właściwościach antyapoptycznych. Pojawiły się też warianty splicingowe kodujące nieaktywne formy białka. Dodatkowo doktorantka wykryła liczący 400 nt. wariant splicingowy genu CFLAR uprzednio nie obserwowany. Za pomocą klonowania doktorantka ustaliła sekwencję nowego wariantu. Sekwencja ta została zdeponowana w banku danych GenBank NCBI. Nowy transkrypt był również obserwowany w tkankach guzów pobranych od pacjentów z ccRCC. Jednak nie wszystkie analizowane geny wykazywały zmiany w składaniu transkryptów. Przynajmniej w części z nich nie obserwowano żadnych zmian.

Kolejnym celem doktorantki było ustalenie wpływu wyciszenia SRSF2 na przeżywalność komórek. Jak się łatwo domyślić obserwowano mniej więcej dwukrotny spadek ilości komórek we wczesnym etapie apoptozy. Logicznym więc było ustalenie, czy obserwowany spadek jest wynikiem zaburzenia w ekspresji genów, których produkty związane są z procesem apoptozy. Doktorantka wykorzystwała w tym celu mikromacierz ekspresyjną pozwalającą na pomiar ekspresji 84 wybranych genów, których produkty są związane z procesem apoptozy. W 15 z analizowanych genów zaobserwowano takie zmiany.

Większość z nich uczestniczyła bezpośrednio w indukcji i regulacji apoptozy. Znajdowały się wśród nich zarówno kaspazy jak i receptory śmierci, ale także białko TP53. Za pomocą ilościowego PCR zmiany w ekspresji potwierdzono jednak jedynie w sześciu przypadkach. Analiza bioinformatyczna dla pięciu z nich potwierdziła przewidywaną obecność miejsca wiązania dla SRSF2. Doktorantka postanowiła więc dodatkowo sprawdzić, czy obserwowane w liniach komórkowych zmiany będą również do wykrycia w próbkach ccRCC pobranych od pacjentów. Istotne statystycznie zmiany obserwowano w pięciu z sześciu badanych genów, w szóstym przypadku zmiany też były widoczne ale nie miały statystycznie istotnego charakteru.

Mimo przeprowadzenia jeszcze wielu analiz autorce nie udało się do końca wyjaśnić, czy obserwowane efekty zmian w ekspresji są wynikiem pośrednich czy bezpośrednich oddziaływań. Warto jednak podkreślić, że nie jest to w żadnym wypadku brak umiejętności doktorantki. Przyczyny leżą w stopniu skomplikowania mechanizmów rządzących procesami regulatorowymi decydującymi o tkankowo specyficznej ekspresji genów.

Dyskusja w tej pracy jest poprowadzona w sposób wzorcowy. Autorka wykazała się w niej ogromną wiedzą i znajomością tematu. Wyniki własne doktorantki są dogłębnie omówione na tle innych prac, a końcowe wnioski są bardzo wyważone. Uważam, że stanowi ona bardzo wartościowy fragment tej pracy i jest świadectwem dojrzałości i rzetelności naukowej autorki. Praca kończy się podsumowaniem, w którym autorka po raz kolejny wypunktowuje otrzymane wyniki. Wniosek końcowy podkreśla rolę czynnika spicingowego SRSF2 w regulacji procesu apoptozy. Zdaniem autorki ten wpływ realizowany jest zarówno w sposób bezpośredni za pomocą zmian w procesie składania transkryptów genów, których produkty uczestniczą w procesie regulacji apoptozy, jak i pośredni poprzez wpływanie na zmiany w poziomie ekspresji elementów wykonawczych wczesnych etapów tego procesu.

Mam właściwie tylko jedno pytanie do doktorantki. Ma ono czysto akademicki charakter i w żaden sposób nie wpływa na moją wysoką ocenę tego doktoratu.. Chodzi o wyjaśnienie dlaczego wiedząc, że podobne czynniki splicingowe odgrywają bardziej ogólną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych, zarówno pośrednio jak i bezpośrednio uczestnicząc w składaniu wielu różnych transkryptów, skoncentrowała się w przypadku czynnika SRSF2 jedynie na procesie apoptozy. Czy autorka uważa, że SRSF2 uczestniczy jedynie w regulacji procesu apoptozy czy też jest to wynik koncentracji jedynie na tym procesie ze względu na skomplikowaną materię tego zagadnienia.

Podsumowując, uważam, że mgr Hanna Kędzierska osiągnęła stawiane sobie cele. Choć nie udało jej się do końca precyzyjnie wyjaśnić mechanizmu działania SRSF2 w procesie apoptozy, to jednak zwrócenie uwagi na rolę, jaką SRSF2 odgrywa w indukcji i regulacji tego procesu apoptozy w komórkach ccRCC, jest istotne i może mieć znaczenie dla prób podejmowania nowej terapii celowanej. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie muszę przyznać, że na tle innych recenzowanych przeze mnie ostatnio doktoratów przedstawiona mi do recenzji praca wyróżnia się zawartością merytoryczną i sposobem interpretacji. Ze względu na wartości poznawcze tej pracy oraz potencjalne możliwości wykorzystania jej wyników w klinice wnioskuję o wyróżnienie doktorantki.


p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki