

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

KATEDRA FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56

www.uni.wroc.pl



dr hab. prof. Agnieszka Gizak

Wrocław, 22.08.2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Elżbiety Sokół „Różnicowe składanie rejonów 3'UTR czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 w kontekście regulacji ich ekspresji przez mikroRNA w raku nerwowokomórkowym typu jasnokomórkowego”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Elżbiety Sokół „Różnicowe składanie rejonów 3'UTR czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 w kontekście regulacji ich ekspresji przez mikroRNA w raku nerwowokomórkowym typu jasnokomórkowego” przedstawia interesujące badania, których celem była weryfikacja hipotezy mówiącej, iż jedną z przyczyn zaburzenia ekspresji czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 w raku nerwowokomórkowym typu jasnokomórkowego (ccRCC) jest nieprawidłowe wiązanie cząsteczek mikroRNA, wynikające z różnicowego składania rejonów 3'UTR tych czynników. Napisana została pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Agnieszki Piekiełko-Witkowskiej i promotora pomocniczego dr n. med. Joanny Bogusławskiej od lat zajmujących się rolą alternatywnego składania transkryptów pierwotnych w powstawaniu stanów patologicznych. Podjęty w rozprawie temat jest istotny także z punktu widzenia zdrowia publicznego, ponieważ ccRCC jest najbardziej agresywnym i nieleczalnym nowotworem nerek, a efekty istniejących terapii są mniej niż zadowalające.

Licząca 217 stron rozprawa napisana jest przejrzysto, co świadczy o znajomości badanych zagadnień, jak i problemów metodycznych, chociaż nie jest wolna od potknięć językowych i stylistycznych. Składa się z ośmiu rozdziałów. Oprócz rozdziałów typowych dla takiej rozprawy („Wstęp”, „Cele i założenia badawcze”, „Materiał i Metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Bibliografia”), znajdują się tam dodatkowo rozdziały „Podsumowanie wyników i wnioski”, „Suplement 1” zawierający dodatkowe informacje dotyczące wyników oraz „Suplement 2” – publikacja, w której Doktorantka jest pierwszym autorem, a obejmująca założenia i wyniki ocenianej rozprawy. W rozprawie umieszczony został również spis wszystkich publikacji mgr inż. Elżbiety Sokół. Rozdziały te uwalniają recenzenta od żmudnego wyluskiwania kolejnych wniosków z „Dyskusji”, ułatwiają szybkie zapoznanie się z dorobkiem naukowym Doktorantki oraz zorientowanie się, które z przedstawionych w rozprawie wyników zostały już opublikowane. Pozytywne zaopiniowanie znacznej części wyników badań przez recenzentów renomowanego czasopisma Experimental Cell Research (IF = 3,55) zwalnia autorkę niniejszej recenzji rozprawy z bardzo

szczegółowej oceny przedstawionych wyników.

Cel pracy został jasno sformułowany i skupiał się na: 1) identyfikacji wariantów rejonów 3'UTR czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1; 2) sprawdzeniu poziomu ekspresji zidentyfikowanych wariantów w próbkach tkanek z ccRCC i próbkach kontrolnych; 3) określeniu roli cząsteczek mikroRNA w regulacji ekspresji czynnika SRSF1 i hnRNP A1 w ccRCC (mikroRNA wpływające na ekspresję SRSF2 zidentyfikowała już wcześniej Promotor Pomocnicza ocenianej rozprawy).

Jednak podczas czytania rozprawy nasunęły mi się pewne uwagi, które przedstawiam poniżej.

W rozdziale „Skróty” (str. 8) nazwa angielska nadsiarczanu amonu zapisana została jako ammonium persulphate. Mimo, iż jest to forma poprawna, używana w tzw. angielskim brytyjskim, formą rekomendowaną przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) jest ammonium persulfate.

„Wstęp” jest odpowiednio obszerny, a opisywane w nim zagadnienia wprowadzają czytelnika w temat. Doceniając jego zawartość merytoryczną, zmuszona jestem wytknąć drobne potknięcia, głównie natury językowej.

Nie jestem zwolennikiem „spolszczania na siłę” naukowych terminów anglojęzycznych, które zostały zaakceptowane i są szeroko stosowane w ośrodkach naukowo-badawczych w naszym kraju: językiem nauki jest angielski, jeśli chcemy to zmienić, musimy najpierw zakasać rękawy i trwale zdominować naukę światową. Jednak pewne zwroty używane w recenzowanej rozprawie zwyczajnie razią (choć być może tylko dlatego, że są – jeszcze – stosunkowo mało rozpowszechnione). Tak więc o ile nie razi mnie „miejsce splicingowe 5' ”, to „miejsce 5'splicingowe”, sformułowanie, które pojawia się kilkakrotnie we „Wstępie” (np. str. 21 i 26) uważam za zbyt „zangielszczenie”.

Podobnie, uważam, że zdania brzmiałyby naturalniej, gdyby wyrazy „mediować” (w zwrotach: „SRSF mediuje oddziaływanie...” (str. 24), „...jest wymagane do mediowanej przez E2F1 regulacji” (str. 25)) oraz „eluować” („próbki eluowałam...” (str. 42)) zastąpiono terminami języka polskiego.

Autorka używa też pewnych zwrotów niezbyt fortunnie (moim zdaniem) przełożonych na język polski, a powtarzających się wielokrotnie w rozprawie: „PCR czasu rzeczywistego” (przecież nie chodzi o PCR czasu), zamiast „PCR w czasie rzeczywistym”; elektroforeza w denaturującym żelu poliakryloamidowym” zamiast „elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących”. Można jednak uznać że nie są to błędy stylistyczne, tylko mniej rozpowszechnione wersje znanych terminów.

Sformułowania ze „Wstępu” mówiące o: „wieloetapowym procesie” (str. 27) czy „lizosomalnej degradacji” (str. 30) brzmią trochę jak kalki z języka angielskiego, które należałoby zastąpić „procesem wieloetapowym” i „degradacją lizosomalną”.

Str. 27: w zdaniu „Dalsza obróbka zachodzi przy użyciu kompleksu enzymatycznego mikroprocesora, składającego się z rybonukleazy Drosha i białka DGCR8” wyraz „mikroprocesor” powinien być pisany dużą literą, gdyż jest to nazwa nadana kompleksowi białek i w takiej pisowni jest zwykle używana w

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH**

KATEDRA FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56

www.uni.wroc.pl

literaturze. Przez pisownię zastosowaną w rozprawie można odnieść błędne wrażenie, że chodzi o jakiś sztucznie stworzony mikroprocesor białkowy.

Kilka uwag krytycznych mam też do rozdziału „Materiał i Metody”, doceniając jednocześnie wysiłek włożony w opanowanie technik biologii molekularnej i programów bioinformatycznych.

Rozdział ten bardzo szczegółowy, co jest właściwe – jego zadaniem jest przecież umożliwienie innym badaczom dokładnego powtórzenia przeprowadzonych eksperymentów. Jednak ta szczegółowość miejscami doprowadzona jest do przesady. Przykładowo, za całkowicie zbędny uważam opis namaczania bibuły i układania warstw w aparacie do tzw. transferu półsuchego oraz dodatkowy akapit powielający opis inkubacji z przeciwciałami, gdy jedynymi różnicami (oprócz użytych przeciwciał oczywiście) jest płukanie w PBS, zamiast TBS oraz użycie 3% zamiast 5% BSA. Te drobne modyfikacje procedury eksperymentalnej wydają się nie mieć wielkiego znaczenia (zwłaszcza, że nie wspomniano o potencjalnych różnicach w pH użytych buforów), ale skoro były one warte umieszczenia w osobnym akapicie, to właściwe byłoby wyjaśnienie sensu tych zmian.

Dane dotyczące odczynników i produkujących je firm również zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy i przejrzysty i umieszczone w tabelach. Nie widzę zatem potrzeby wielokrotnego powtarzania wszystkich informacji (łącznie z nazwą producenta/dystrybutora) o odczynnikach w opisach kolejnych metod, jak robi to Autorka rozprawy. Z drugiej strony, brakuje informacji o numerach katalogowych odczynników. Nie jest to tak bardzo istotne w przypadku odczynników o zastrzeżonych nazwach handlowych, za to ma duże znaczenie w przypadku pożywek hodowlanych, np. pożywki DMEM, której to producent/dystrybutor Sigma ma w katalogu kilkanaście różnych wersji, z odmiennymi substratami energetycznymi, w różnych ich stężeniach.

Ponieważ z podrozdziału 3.2.1.2 dowiedziałam się, że podczas pasażowania komórek używano przepłukiwania trypsyną „w celu usunięcia resztek surowicy” (str. 41), chciałam zauważyć, że tańsze i równie skuteczne byłoby zastosowanie do tego celu buforu, np. HBSS.

Na str. 48 można przeczytać: „Błonę inkubowałam... i eksponowałam na kliszę”, co brzmi trochę niezręcznie i jest niepoprawne, ponieważ to klisza była eksponowana na sygnał chemiluminescencyjny związany z błoną.

Być może warto byłoby też poświęcić nieco miejsca w rozdziale „Materiał i Metody” użytym w pracy technikom analizy statystycznej, co ułatwiłoby czytelnikowi analizę przedstawionych w niej wyników.

Eksperymenty opisane w rozprawie były przeprowadzane nie tylko na liniach komórkowych wywodzących się z raka nerkowokomórkowego typu jasnokomórkowego (ccRCC), ale także na liniach wywodzących się z kostniakomięsaka i raka wątrobowokomórkowego. W rozdziale „Materiał i Metody” informacja o RNA wyizolowanym z tych dwóch ostatnich linii została błędnie umieszczona w podrozdziale 3.1.2. zatytułowanym „Bank RNA wyizolowanego z linii komórkowych ccRCC udostępniany w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej”, co – wbrew oczywistym faktom – sugeruje, że dwie wyżej wymienione



linie są przykładem raka nerkowokomórkowego.

Autorka rozprawy rehabilituje się w rozdziale „Wyniki”, w którym pisze już o liniach wyprowadzonych z ccRCC „i innych nowotworów”. Rozdział „Wyniki” jest bogato ilustrowany rycinami i tabelami i w sposób logiczny przedstawia kolejne etapy pracy Doktorantki. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki przedstawionych w tym rozdziale zaliczam:

- 1) opisanie nowych, nieznanych dotychczas wariantów rejonów 3'UTR badanych czynników splicingowych,
- 2) wykazanie, że ekspresja pewnych wariantów SRSF2 jest zaburzona w ccRCC,
- 3) identyfikację cząsteczek mikroRNA bezpośrednio regulujących ekspresję badanych czynników splicingowych w ccRCC, w tym pokazanie po raz pierwszy, że ekspresja czynnika hnRNP A1 w tym raku jest regulowana przez mikroRNA,
- 4) wskazanie na możliwość istnienia pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego między miR-10b-5p a SRSF1 w ccRCC.

Pewną niedogodnością dla czytelnika jest sposób prezentacji niektórych wyników, np. przedstawienie ryciny na jednej stronie, a podpisu (lub jego części) na stronie kolejnej.

W obszernej „Dyskusji” Autorka umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki na tle istniejącego piśmiennictwa i stawia logicznie brzmiące hipotezy odnośnie znaczenia ekspresji zidentyfikowanych przez nią wariantów czynników splicingowych dla rozwoju nowotworu nerki. Jednocześnie ma świadomość, że jednoznaczne potwierdzenie tych hipotez wymaga dalszych badań oraz potrafi wskazać jakie eksperymenty należałoby przeprowadzić w przyszłości. Można więc mieć nadzieję, że Doktorantka będzie kontynuowała swoje badania.

Niemniej jednak, przy interpretacji uzyskanych danych Autorka zapomina choćby wspomnieć, jak na tle danych uzyskanych z ccRCC oraz z tkanek i linii komórkowych zdrowych wyglądają dane z linii komórkowych kostniakomięsaka i raka wątrobowokomórkowego. Jednoznacznych informacji na ten temat nie znalazłam w rozdziale „Dyskusja”. W „Wynikach” można przeczytać, że „analiza elektroforetyczna wykazała występowanie licznych produktów PCR...” i że owe produkty są podobne w analizowanych próbkach od pacjentów i liniach komórkowych, ale „Liczne” i „podobne” to w tym kontekście zdecydowanie zbyt mało precyzyjne określenia. Doktorantka nie wspomina też o tym w „Podsumowaniu” (bo wydaje się niemożliwym, by ukrywały się one pod nazwą „próbki kontrolne” – naturalną kontrolą do komórek raka nerki są komórki zdrowe pochodzące z tego narządu). Żadnej informacji o tych liniach nie ma w „Streszczeniu”, mimo, iż znajduje się w nim zdanie informujące, co stanowiło materiał do badań opisanych w rozprawie – zdanie pomijające kostniakomięsaka i raka wątrobowokomórkowego. Wobec tego czytelnik ma prawo się zastanawiać, po co w ogóle zadano sobie trud eksperymentowania na owych liniach. Nawet jeśli różnice między nimi a ccRCC nie były ciekawe i/lub istotne, to warto chociaż jednym

zdaniem je podsumować. Choćby dlatego, że każda nowa informacja dotycząca komórek nowotworowych może ostatecznie okazać się wartościową i istotną.

Biorąc pod uwagę techniki manipulacji kwasami nukleinowymi opanowane przez Autorkę rozprawy, nie ukrywam, że rozbawiło mnie jedno ze zdań „Dyskusji” (str. 105), stwierdzające, iż przeprowadzenie eksperymentu określającego wpływ hnRNP A1 na poziom ekspresji i/lub biogenezę mikroRNA nie było możliwe „z powodu braku bezpośredniej dostępności RNA z wyciszoną ekspresją hnRNP A1”. Jest to nie tylko niepoprawne językowo (bo czymże jest „RNA z wyciszoną ekspresją?”), ale i w świetle ogromnych umiejętności laboratoryjnych Autorki w tej dziedzinie – niewiarygodne. Całkowicie zrozumiałym i wystarczającym jest podany argument finansowy. Acz byłoby interesującym móc mieć możliwość interpretacji wyników takiego eksperymentu.

Pracę zamyka syntetyczny rozdział „Podsumowanie wyników i wnioski” (o którym wspomniałam już wcześniej) i 285 pozycji literaturowych, w znacznej większości z ostatnich dziesięciu lat.

Należy mocno podkreślić, że nie mam zasadniczych uwag krytycznych do recenzowanej rozprawy. Wymienione powyżej zarzuty są w gruncie rzeczy dość błahe i zazwyczaj dotyczą strony edytorskiej rozprawy. Pracę uważam za dobrze zaplanowaną i wykonaną. Przedstawia ona cenne dane, które wyznaczają kierunek dalszych badań.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Elżbiety Sokół spełnia wymagania stawiane w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi poprawkami, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, uzasadniając tym samym dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Sokół do publicznej obrony. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Sokół do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę dorobek naukowy i niezwykle interesujące wyniki, o potencjalnym znaczeniu biomedycznym, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. prof. Agnieszka Gizak

