Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin
tel/fax 81 4486100
www.genetyka.umlub.pl

Ocena
osiągnięcia naukowego pt. „Rola mikroRNA w patogenezie nowotworów hematologicznych"
Pani doktor nauk medycznych Agnieszki Dzikiewicz-Krawczyk
w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych

Niniejsza opinia została przygotowana w oparciu o następujące dokumenty:

1. Wniosek z dnia 18 grudnia 2018 r o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna
2. Autoreferat
3. Wykaz opublikowanych prac i ich analizę bibliometryczną
4. Kopie prac stanowiących osiągnięcie naukowe
5. Oświadczenia współautorów prac, stanowiących w/w osiągnięcie
6. Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017, poz. 1789) oraz ustawę z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669)

Ocena osiągnięcia naukowego

Ocena formalna

W skład przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego wchodzą **4 publikacje oryginalne i jedna praca przeglądowa** o łącznym **IF 29,216** i punktacji **MNiSW 185**, które ukazały się w uznanych czasopismach z listy JCR: *The American Journal of Pathology* 2018, *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018, *Leukemia* 2017 oraz *Journal of Hematology & Oncology* 2014.

Pani Doktor jest pierwszą autorką trzech współautorskich prac cyklu, praca przeglądowa jest pracą autorską. Swój udział w przygotowaniu w/w artykułów określa Ona odpowiednio na 100%, 80%, 60% w przypadku dwóch manuskryptów i 15% w przypadku jednego. Do dokumentacji załączono oświadczenia Habilitantki (określające Jej indywidualny wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji) oraz oświadczenia współautorów, określające ich wkład merytoryczny i zawierające zgodę na włączenie w/w prac do cyklu stanowiącego osiągnięcie.

Ocena merytoryczna

Przedstawione publikacje tworzą ściśle powiązany ze sobą tematycznie cykl w rozumieniu Ustawy. Badania, których celem była identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna zaburzeń w odziaływaniach mikroRNA z genami docelowymi w kontekście nowotworów układu krwiotwórczego prowadzono w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu oraz University Medical Center Groningen w Holandii, gdzie Habilitantka przebywała w ramach stażu podoktorskiego. Publikacja pierwsza (**Dzikiewicz-Krawczyk A. et al, *Hematol Oncol* 2014**) przedstawia wyniki badań prowadzonych w ramach projektu MNiSW „Analiza polimorfizmów miejsc wiązania miRNA (miRSNP) w 3' UTR genów związanych z białaczkami oraz ich wpływu na ekspresję białek".

Polimorfizmy miejsc wiązania miRNA są jednym z czynników decydujących o efektywności funkcji regulatorowej tych cząsteczek. Do badań wybrano polimorfizmy genów istotnych dla patogenezy białaczek, m. in. *ABL1, ATM, ETV6, NBN, PML* i *TLX1*, oceniano je u chorych z ostrą białaczką szpikową (AML), przewlekłą białaczką szpikową (CML), dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) i w grupie osób zdrowych. Wykazano związek badanych polimorfizmów genów *TLX1* i *ETV6* ze zwiększonym ryzykiem ALL oraz polimorfizmu genu *PML* z obniżonym ryzykiem tej choroby. Ten sam polimorfizm *PML* wiązał się też z niższym ryzykiem AML u dorosłych chorych. Dalsze badania z wykorzystaniem systemu reporterowego z lucyferazą potwierdziły przewidziany w analizach *in silico* wpływ niektórych polimorfizmów na wiązanie miRNA, co implikuje ich znaczenie dla poziomu ekspresji genów. Były to nowatorskie badania, w czasie ich publikacji niewielu badaczy zajmowało się tematyką miRSNP w nowotworach hematologicznych. To skłoniło Habilitantkę do zebrania i usystematyzowania wiedzy w tym zakresie w pracy przeglądowej (**Dzikiewicz-Krawczyk A. *Hematol Oncol* 2014**), w której pokazała, że polimorfizmy miejsc wiązania miRNA mają potencjał czynników

diagnostycznych i prognostycznych, zaproponowała także algorytm postępowania służący identyfikacji nowych miRSNP istotnych dla patogenezy nowotworów układu krwiotwórczego.

Przedmiotem kolejnej publikacji cyklu (**Dzikiewicz-Krawczyk A. et al, *Leukemia* 2017**) była charakterystyka funkcjonalna miR-150 w linii komórkowej chłoniaka Burkitta (BL). Wykazano, iż ekspresja tego miRNA w BL jest hamowana w następstwie mutacji aktywującej protoonkogenu *MYC*. Wśród transkryptów docelowych dla miR-150 zidentyfikowano znany wcześniej *MYB* oraz dwa nowe: *ZDHHC11* i *ZDHHC11B*. Co ciekawe, dwa ostatnie geny poza klasycznymi transkryptami mRNA kodującymi białko, posiadają także informację dla tzw. długich niekodujacych RNA, w tym RNA kolistych – cząsteczek, które mogą mieć wpływ na poziom ekspresji miRNA na zasadzie kompetycji. Zaobserwowano, iż wyciszenie genów *ZDHHC11* i *ZDHHC11B* w komórkach BL powoduje zahamowanie ich proliferacji. Pozwoliło to na zaproponowanie nowego mechanizmu promującego proliferację komórek BL, złożonego z wzajemnej sieci interakcji pomiędzy genami *MYC, ZDHHC11* i *ZDHHC11B, MYB* oraz miR-150.

Mając świadomość odmiennej charakterystyki komórek linii nowotworowych i nowotworów pierwotnych, Pani Doktor Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk podjęła próbę charakterystyki genów docelowych w materiale pochodzącym od chorych z BL (**Dzikiewicz-Krawczyk A. et al. *Am J Pathol* 2018**). Materiałem kontrolnym były limfocyty B, izolowane z migdałków osób zdrowych, poddających się tonsilektomii. Habilitantka określiła te komórki mianem prawidłowych – ja byłabym bardziej ostrożna (tonsilektomia zazwyczaj zalecana jest z powodu chronicznych stanów zapalnych), możemy je jednakże opisać jako nienowotworowe. Analizy mikromacierzowe poprzedzone techniką immunoprecypitacji RNA przy użyciu przeciwciała przeciw-AGO2 wykazały znaczne różnice w oddziaływaniach miRNA-mRNA pomiędzy komórkami BL i limfocytami B migdałków; w tych pierwszych znaczącą rolę odgrywał onkogenny klaster miR-17-92, modulujący ekspresję genów związanych z cyklem komórkowym i apoptozą. W badaniu tym po raz pierwszy zastosowano metodę immunoprecypitacji RNA przy użyciu przeciwciała przeciw-AGO2 (AGO2-RIP) na komórkach pochodzących z materiału mrożonego. Różnice zaobserwowane na poziomie wiązania transkryptu potwierdzono dla dwóch białek – NEDD9 i KAT7 metodą immunohistochemii.

Celem ostatniej z prac cyklu (**Yuan Y. et al. *Cell Physiol Biochem* 2018**) było wyłonienie miRNA wpływających na wzrost nowotworu poprzez oddziaływanie na

mechanizmy proliferacji, apoptozy i przerzutowania. W badaniach zastosowano wysokoprzepustowe techniki przesiewowe, w których komórki chłoniaka Hodgkina (HL) transfekowano biblioteką lentiwirusowych wektorów mających hamować lub wzmacniać ekspresję RNA, a następnie stosując metodę sekwencjonowania nowej generacji określano zmiany liczby komórek zawierających określony konstrukt. W badaniu tym udało się wykazać, iż inhibicja miR-21-5p (którego ekspresja w komórkach HL jest znacznie wyższa niż w nienowotworowych limfocytach B) zwiększa odsetek komórek apoptotycznych, pozostając bez wpływu na cykl komórkowy. Metodą AGO2-RIP zidentyfikowano 26 genów docelowych dla miR-21-5p, dla dwóch z nich (*PELI1* i *BTG2*) potwierdzono tę interakcję wykorzystując system reporterowy lucyferazy.

Podsumowując publikacje włączone do cyklu stanowiącego osiągnięcie mogę stwierdzić, że badania w nich zaprezentowane wpisują się w ważny nurt analiz, których przedmiotem są molekularne mechanizmy karcynogenezy. W tym kontekście ciekawe są zwłaszcza badania niekodującej części genomu. Koncepcja badań prowadzonych przez Panią dr Dzikiewicz-Krawczyk była nowatorska, a zastosowane metody były adekwatnie dobrane i w przeważającej części najnowsze z dostępnych. Wyniki omawianych badań mają istotną wartość poznawczą, w dalszej perspektywie mogą także zostać wykorzystane w celach diagnostycznych i prognostyczno-predykcyjnych.

Podsumowanie

W oparciu o przedstawioną do oceny dokumentację stwierdzam, że publikacje wskazane przez Panią dr n. med. Agnieszkę Dzikiewicz-Krawczyk jako osiągnięcie tworzą spójny cykl nowatorskich prac powiązanych tematycznie i stanowią znaczny wkład w rozwój nauk medycznych. W pełni spełniają zatem kryteria osiągnięcia naukowego, wymaganego w procesie ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z warunkami Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789, art. 16).

Lublin,27.06.2019

KIEROWNIK
Zakładu Genetyki Nowotworów
z Pracownią Cytogenetyczną
dr hab. n. med. Agata Filip