

Warszawa, 1. 04.2021

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Kierownik Zakładu Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr. Julii Paczkowskiej

„ Identification of deregulated transcription factors and miRNAs – important regulome compnents in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma ”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje cykl trzech publikacji, w których mgr Julia Paczkowska jest pierwszą autorką:

1. Julia Paczkowska, Joanna Janiszewska, Julia Bein, Markus Schneider, Kinga Bednarek, Adam Ustaszewski, Sylvia Hartmann, Martin-Leo Hansmann, Maciej Giefing. The Tumor Suppressive mir-148a Is Epigenetically Inactivated in Classical Hodgkin Lymphoma. *Cells* 2020 Oct 14;9(10):2292. doi: 10.3390/cells9102292.
2. Julia Paczkowska, Natalia Soloch, Magdalena Bodnar, Katarzyna Kiwerska, Joanna Janiszewska , Julia Vogt, Ewa Domanowska , José I Martin-Subero , Ole Ammerpohl, Wolfram Klapper, Andrzej Marszalek, Reiner Siebert, Maciej Giefing. Expression of ELF1, a lymphoid ETS domain-containing transcription

factor, is recurrently lost in classical Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 2019 Apr;185(1):79-88. doi: 10.1111/bjh.15757. Epub 2019 Jan 25.

3. Julia Paczkowska, Maciej Giefing. MicroRNA signature in classical Hodgkin lymphoma. J Appl Genet 2021 Feb 5. doi: 10.1007/s13353-021-00614-7. Online ahead of print.

Dwie pierwsze z powyżej wymienionych publikacje to prace oryginalne, trzecia stanowi systematyczny przegląd sygnatur miRNA w klasycznym chłoniaku Hodgkina. Prace te opublikowano w recenzowanych, prestiżowych czasopismach z dziedziny genetyki, hematologii i biologii komórki.

Rozprawę uzupełnia obszernie wprowadzenia do tematyki biologii chłoniaka Hodgkina, a każdą z publikacji doktorantka opatrzyła szerszym wprowadzeniem i streszczeniem jej wyników. Autorka zamieściła ponadto w treści dysertacji spis skrótów, oświadczenia współautorów prac, a rozprawę zamyka podsumowaniem uzyskanych wyników z wnioskami. Z uwagi na fakt, iż rozprawa jest podsumowaniem cyklu publikacji a nie monografią - nie zawiera elementów takich jak metodyka, piśmiennictwo itp. - znalazły się one w treści załączonych publikacji.

We wprowadzeniu do rozprawy, mgr Julia Paczkowska w pierwszym zdaniu wstępu pisze, że cHL jest jednym najczęściej występujących chłoniaków B- komórkowych – jest to informacja nieprawdziwa - chłoniak Hodgkina jest chorobą rzadką, choć istotnie, jak podkreśla autorka, charakteryzuje się bimodalnym rozkładem częstości zachorowań i dotyczy m.in młodych dorosłych. Ten niewielki błąd merytoryczny jest jednak nieistotny w kontekście treści rozprawy. Jest to też, szczęśliwie, najpoważniejszy błąd merytoryczny, jaki w treści pracy napotkałem.

W dalszej części wstępu doktorantka szczegółowo przedstawia charakterystykę biologiczną chłoniaka Hodgkina, pochodzenie komórek Reed-Sternberga (R-S) oraz mechanizmy molekularne leżące u podłoża fenotypu komórek R-S. Doktorantka omawia regulacyjne mechanizmy prowadzące do utraty fenotypu B-komórkowego limfocytów germinalnych transformujących do komórek R-S, podkreślając rolę zmian w ekspresji czynników transkrypcyjnych i mikro-RNA kluczowych dla ukierunkowania rozwoju limfocytów i ich różnicowania. Konstrukcja tej części rozprawy wskazuje na

uporządkowaną i szeroką wiedzę autorki dotyczącą cHL i mechanizmów molekularnych leżących u podstaw choroby oraz wskazuje elementy brakujące dla zrozumienia patogenezy tej choroby. Autorka podkreśla również unikalną histologię chłoniaka Hodgkina, która niesie ze sobą istotne trudności eksperymentalne. Wstęp stanowi zatem logiczne i adekwatne wprowadzenie do hipotezy leżącej u podstawy powstania rozprawy i szczegółowych celów pracy, które Autorka definiuje następująco:

1. Uzupełnienie wiedzy o genetycznych i epigenetycznych zmianach biorących udział w patogenezie choroby i identyfikacja B-komórkowych czynników transkrypcyjnych, których utrata jest istotna dla rozwoju choroby i przyczynia się do utraty fenotypu B- komórkowego komórek R-S;
2. Ustalenie przyczyn wyłączenia tych czynników transkrypcyjnych;
3. Ustalenie szlaków deregulowanych w komórkach R-S przez zmiany w ekspresji miRNA;
4. Identyfikacja genów, których ekspresja zmieni się pod wpływem deregulowanych epigenetycznie miRNA.

W kontekście przeprowadzonych badań, wydaje się że Autorka mogła inaczej sformułować cele pracy – regulacja epigenetyczna obejmuje bowiem szersze spektrum mechanizmów niż metylacja DNA, a których w pracy nie badano.

Prace stanowiące rdzeń przedstawionej mi do oceny rozprawy i które mają stanowić odpowiedź na tak sformułowane cele pracy, zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach, w związku z czym przeszły już swoje recenzje i ich lektura nie pozostawia wątpliwości, że w większości zostały wykonane poprawnie pod względem metodycznym, a wnioski przedstawione w dyskusjach odpowiadają danym eksperymentalnym. Metodyka prac jest odpowiednio dobrana do ich celów. Podkreślić należy swobodę autorki w posługiwaniu się szerokim warształem badawczym – zarówno metodami mokrego laboratorium, jak i analizami statystycznymi i obliczeniowymi.

Uwagi recenzenta:

1. Praca pt. **The Tumor Suppressive mir-148a Is Epigenetically Inactivated in Classical Hodgkin Lymphoma (cells 2020)**

- a. Metodyczne wątpliwości budzi sposób izolacji komórek RS do badań – mikrodyssekcja laserowa jest metodą obciążoną wadami i ryzykiem błędów; z uwagi na czasochłonność, użycie lasera i arbitralność w wyborze mikrodyssekowanych obszarów, uzyskany materiał może nie reprezentować komórek R-S lub być częściowo zdegradowany – co ma zwłaszcza znaczenie przy ocenie ilościowej RNA (Rycina 3B.) Dobrze byłoby, gdyby autorka zechciała pokazać skrawki przed i po mikrodyssekcji oraz opisać sposób oceny jakości i integralności wyizolowanego RNA. Z tego samego względu porównywania przedstawione na tej rycinie nie są w pełni prawidłowe – próbki pozyskane drogą mikrodyssekcji, która niesie ze sobą ryzyko degradacji materiału, są odniesione do materiału uzyskanego z sortera i/lub z linii komórkowych.
- b. Autorka w rycinie 3C wskazuje iż hipermetylacja regionów regulatorowych miR 148a-3p/5p dotyczy 2/6 przypadków. Na podstawie tego wyniku, trudno wnioskować i generalizować, iż hipermetylacja tego regionu jest głównym mechanizmem odpowiadającym za zmniejszenie ekspresji tego miRNA. Wskazanie innych mechanizmów epigenetycznych (np. modyfikacje histonów) odpowiedzialnych za wyłączenie jego ekspresji byłoby tu dużą wartością dodaną.
- c. Z jakiego powodu nadekspresja mir-148a wpływa na proliferację tylko KMH2 , a nie innych linii? Z jakiego powodu na ryc. 6 w przypadku linii L540, liczba komórek spada począwszy od 2 dnia?
- d. Stabilna nadekspresja miR148 nie jest najbardziej adekwatną metodą w kontekście zaplanowanego celu. Selekcja puromycyną powoduje, że przeżywają ją komórki zdolne przetrwać pomimo nadekspresji badanego genu supresorowego – zatem metoda eksperymentalna zmienia badany obiekt. Czy autorka może zaproponować inny sposób wykonania tego doświadczenia?

- e. W pracy brakuje udokumentowania wyników eksperymentu z Click-iT®Plus EdU Alexa Fluor®647 Flow Cytometry Assay.
- f. Który z genów regulowany przez miR-148a odpowiada za efekt zahamowania proliferacji? Czy wymuszona nadekspresja któregoś z nich odwróciłaby efekt nadekspresji tego miRNA?
- g. Najbardziej niezrozumiałą jest brak eksperymentu, który oceniłby ekspresję genów wytypowanych jako regulowane przez miR148. Czy wprowadzenie miR148a do komórek wpłynęło na ich ekspresję?

2. Praca pt. *Expression of ELF1, a lymphoid ETS domain-containing transcription factor, is recurrently lost in classical Hodgkin lymphoma (Br J Haematol 2019)*

- a. W pracy najbardziej brakuje mi wskazania roli jaką niesie hipermetylacja promotora ELF1 prowadząca do wyłączenia jego ekspresji. Czy autorka mogłaby przedstawić plan eksperymentu, który mógłby dać odpowiedź na to pytanie?

3. Praca pt. *MicroRNA signature in classical Hodgkin lymphoma (J Appl Genetics, 2021)*

Praca stanowi systematyczny przegląd badań dotyczących sygnatur miRNA w cHL, którego celem było wyłonienie tych miRNA, które wykazywały ten sam kierunek zmian i analiza ich potencjalnej roli w cHL. Praca jest rzetelnym, jasnym pod względem metodycznym przeglądem dostępnej literatury, podsumowanym poprawnymi wnioskami.

Recenzowaną rozprawę zamykają następujące wnioski:

1. Czynniki transkrypcyjne ELF1 ulega wyłączeniu w komórkach RS;
2. Za utratę ELF1 odpowiada hipermetylacja promotora i delecje heterozygotyczne;
3. Komórki R-S cHL charakteryzują się unikalnym profilem miRNA, które wpływają na patogenezę choroby poprzez regulację genów związanych z

różnicowaniem B-komórkowym, aktywacją NFκB, i ucieczką spod nadzoru immunologicznego;

4. Przynajmniej część z tych miRNA (miR-148a-3p/-5p, mir193a-5p, mir339-3p) jest wyłączona przez hipermetylację DNA
5. Deregulacja tych miRNA wpływa na ekspresję genów kodujących białka – HOMER, IL15, SUB1, SERPINH1.

Pomimo sformułowanych powyżej uwag, które powinny stanowić przyczynek do dyskusji z Doktorantką w trakcie obrony, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi ciekawe, samodzielne, oryginalne i szerokie opracowanie naukowe i niesie bardzo dużą wartość poznawczą i spełnia ustawowe wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom.

Z pełnym przekonaniem pragnę przeto przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN wniosku o dopuszczenie mgr Julii Paczkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Wnioskuje też o wyróżnienie pracy.**

Z poważaniem,

