

Poznań, 05.08.2022

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN

Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Janiszewskiej
zatytułowanej
„Identyfikacja potencjalnie onkogennych mikroRNA zaangażowanych
w patogenezę raka krtani”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, natomiast promotorem pomocniczym Pan dr hab. Maciej Giefling.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Janiszewskiej została przygotowana w formie cyklu powiązanych tematycznie artykułów, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych w latach 2013-2021. Cykl prac obejmuje dwie publikacje eksperymentalne i jedną przeglądową. We wszystkich pracach Pani mgr inż. Joanna Janiszewska jest pierwszą autorką (w dwóch wspólnie z innym autorem, gdzie stwierdzono równorzędny wkład). Ponadto, Doktorantka jest autorem do korespondencji w dwóch pracach eksperymentalnych. Świadczy to o Jej kluczowej roli w powstaniu tych prac, co zostało potwierdzone oświadczeniami współautorów publikacji. Poza tym, Pani mgr inż. Joanna Janiszewska jest współautorką 14 publikacji, co jest ponadprzeciętnym osiągnięciem na tym etapie drogi naukowej.

Rozprawa doktorska rozpoczyna się spisem publikacji, następnie przedstawione są wskaźniki naukometryczne, źródła finansowania badań, wykaz skrótów, spis treści, wstęp, cel pracy, streszczenia trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz kopie tych publikacji. Wyniki badań są następnie omówione w krótkim, 1,5 stronicowym rozdziale

Podsumowanie i wnioski. Kolejne części rozprawy to Streszczenie w języku polskim i angielskim, literatura oraz oświadczenia współautorów o ich udziale w przygotowaniu publikacji. Praca jest napisana w sposób przejrzysty, wstęp jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki badań, a cele są jasno sformułowane. Opis każdej z omawianych publikacji jest podsumowany w formie wniosków.

Tematyka badawcza przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wpisuje się w zagadnienia realizowane w Zakładzie Genetyki Nowotworów IGCz, dotyczące szeroko rozumianej patogenezy nowotworów. Głównym celem badań Doktorantki było poznanie roli mikroRNA w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani. Cele szczegółowe obejmowały analizę profili ekspresji mikroRNA w nowotworach krtani, identyfikację mikroRNA o podwyższonej ekspresji oraz określenie ich roli w patogenezie nowotworów krtani. Jest to temat niezwykle ważny, ponieważ choroby nowotworowe wciąż stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny a poznanie mechanizmów warunkujących rozwój choroby oraz identyfikacja regulatorów tego procesu jest niezbędnym etapem na drodze do opracowania skutecznej terapii.

mikroRNA to małe cząsteczki RNA które regulują wiele procesów komórkowych poprzez wiązanie się do docelowych transkryptów, inhibicję translacji i/lub degradację mRNA. Epigenetyczne modyfikacje lub mutacje genów mikroRNA mogą prowadzić do ich inaktywacji lub podwyższonej ekspresji a w konsekwencji do deregulacji procesów związanych z nowotworzeniem, takich jak naprawa DNA, apoptoza czy proliferacja. Znanych jest wiele przykładów onkogennych i supresorowych mikroRNA; niektóre z nich są już wykorzystywane jako cele terapeutyczne w badaniach klinicznych. Badanie procesów regulowanych przez mikroRNA jest bardzo trudne ze względu na to, że jeden gen docelowy może być regulowany przez wiele mikroRNA a dany mikroRNA może regulować wiele transkryptów. W rzeczywistości problem jest jeszcze bardziej złożony, bo miejsca docelowe dla mikroRNA znajdują się zwykle w regionach 3'UTR, a wiadomo, że te regiony są zmienne i w niektórych tkankach ekspresji ulegają tylko specyficzne warianty transkryptów np. z dłuższymi sekwencjami 3'UTR. Z tego może wynikać tkankowo-specyficzny wzór regulacji mikroRNA-gen docelowy. Ekspresja niektórych mikroRNA też może być/jest często tkankowo-specyficzna. Poza tym, wciąż trwają dyskusje na temat funkcjonalności niektórych mikroRNA i ich dokładnej liczby, wg. bazy MiRBase istnieje ponad 2000 ludzkich mikroRNA natomiast baza MirGeneDB 2.1 zawiera jedynie 567 sekwencji genów mikroRNA. W świetle tej wiedzy Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania.

W ramach publikacji przeglądowej nr 1 zatytułowanej „*microRNAs are important players in head and neck carcinoma: A review*” opublikowanej w czasopiśmie *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (5 letni IF 6,227) Doktorantka zebrała i przeanalizowała doniesienia literaturowe na temat zmian w poziomach ekspresji mikroRNA w nowotworach głowy i szyi (HNSCC). Analiza ta potwierdziła, że mikroRNA są zaangażowane we wszystkie etapy kancerogenezy i mogą być wykorzystane jako potencjalne cele terapii i markery diagnostyczno-prognostyczne. Każdy z podtypów nowotworów głowy i szyi charakteryzuje się unikalnym profilem ekspresji mikroRNA, choć istnieją deregulowane mikroRNA (np. hsa-miR-21 i hsa-miR-205) wspólne dla różnych podtypów HNSCC. W pracy zwrócono uwagę na problemy związane z heterogennością badanego materiału, stosowaniem przez autorów metod różniących się czułością i specyficznością oraz faktem, iż wyniki badań często nie zostały potwierdzone alternatywnymi metodami. Utrudnia to identyfikację istotnych i specyficznych zmian, które mogą świadczyć o potencjale diagnostycznym, prognostycznym i terapeutycznym określonych mikroRNA. Autorzy pracy zwrócili również uwagę na ciekawe i słabo poznane aspekty wpływu metylacji DNA oraz infekcji HPV na poziom ekspresji mikroRNA i patogenezę HNSCC.

Podsumowując, jest to ciekawe i wartościowe opracowanie, świadczące o szerokiej wiedzy Doktorantki w tej dziedzinie badań. W tabeli 2 przedstawiona jest lista potencjalnych biomarkerów, mających biologiczne funkcje w HNSCC. Czy są one obecnie stosowane rutynowo w diagnostyce? Z perspektywy czasu, jak ocenia Doktorantka postęp badań nad rolą mikroRNA w HNSCC.

Celem badań opisanych w pracy nr 2 pt. „*Global miRNA Expression Profiling Identifies hsa-miR-1290 as Novel Potential oncomiR in Laryngeal Carcinoma*” i opublikowanych w czasopiśmie *PLOS One* (5 letni IF 3,788) była identyfikacja mikroRNA deregulowanych w nowotworze krtani oraz charakterystyka ich genów docelowych. Wykorzystując macierze ekspresyjne autorzy porównali profile ekspresji mikroRNA w liniach komórkowych i guzach płaskonabłonkowego raka krtani ze zdrowymi kontrolami i wytypowali 5 mikroRNA o podwyższonej ekspresji i 2 o obniżonej ekspresji, wspólne dla linii komórkowych i guzów. Należy podkreślić, że po raz pierwszy wykazano podwyższoną ekspresję trzech mikroRNA, w tym miR-1290, który stał się celem dalszych badań Doktorantki. Pod wieloma względami jest to bardzo interesujący przykład mikroRNA. miR-1290 to tzw. mirtron, zlokalizowany w pierwszym intronie genu dehydrogenazy aldehydowej *ALDH4A1* i powstający w wyniku składania pre-mRNA. Jego ekspresja jest podwyższona w

wielu nowotworach i dlatego jest on uznawany za potencjalny cel diagnostyczny i terapeutyczny. Poza tym miR-1290 reguluje ekspresję wielu genów zaangażowanych w patogenezę różnego typu nowotworów jak również odporność na chemio- i radioterapię. Analiza baz danych i wyników eksperymentów doprowadziła do wytypowania potencjalnych genów docelowych dla miR-1290, a analiza funkcjonalna potwierdziła jego rolę w regulacji genów *MAF* oraz *ITPR2*.

Podsumowując, największym osiągnięciem tej części rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Janiszewskiej jest wykazanie potencjalnie onkogennego znaczenia miR-1290 w nowotworze krtani i zaproponowanie mechanizmu jego działania poprzez obniżenie ekspresji genów *MAF* oraz *ITPR2*. Moje pytania dotyczące tej części pracy są związane z wątkiem nie poruszonym przez Doktorantkę, jednak bardzo intrygującym. Dlaczego dochodzi do podwyższonej ekspresji miR-1290? Czy wiadomo z literatury jaki jest mechanizm i czy jest to być może skorelowane z poziomem ekspresji genu *ALDH4A1*?

Choć praca jest już opublikowana i podlegała recenzjom mam kilka drobnych uwag dotyczących Ryciny 2, przedstawiającej wyniki analizy funkcjonalnej miR-1290 i jego potencjalnych genów docelowych. Brakuje tu danych z analizy statystycznej oraz zdjęcia membrany po analizie WB. Nie wiadomo też jaka była efektywność inhibicji miR-1290.

Ostatnia praca z cyklu publikacji (pt. „*Loss of the MAF Transcription factor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*”. *Biomolecules*, 5 letni IF 6,191) jest logiczną kontynuacją badań nad funkcją miR-1290 w patogenezie raka krtani. Celem badań było poznanie roli czynnika transkrypcyjnego MAF w tym procesie poprzez analizę oddziaływania z miR-1290, określenie poziomu białka MAF, jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej oraz genów docelowych. Doktorantka potwierdziła funkcjonalne oddziaływanie miR-1290 z jednym z 4 przewidywanych bioinformatycznie miejsc wiązania dla tego mikroRNA w regionie 3'UTR transkryptu MAF. Co ciekawe, analizy immunohistochemiczne materiału pobranego ze 128 guzów LSCC wykazały zmienioną (cytoplazmatyczną) lokalizację białka MAF lub jego brak. Ponieważ trudno to było wytłumaczyć jedynie oddziaływaniem z miR-1290, autorzy szczegółowo przeanalizowali inne potencjalne przyczyny tego zjawiska tj. zmienność sekwencji, w tym liczbę kopii genu *MAF* oraz poziom metylacji regionu promotorowego. Badania te nie wyjaśniły powyższych obserwacji. Spośród genów potencjalnie regulowanych przez czynnik transkrypcyjny MAF autorzy wytypowali gen

PRODH i potwierdzili, iż może on być zaangażowany w regulację apoptozy w raku krtani w wyniku nadekspresji miR-1290 i inhibicji MAF.

Choć złożoność badanych procesów nie pozwoliła na jednoznaczne określenie roli mikroRNA w patogenezie raka krtani i wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi, badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Janiszewskiej zdecydowanie poszerzyły naszą wiedzę na ten temat, a co za tym idzie cel badań został w pełni zrealizowany. Badania były przeprowadzone z wykorzystaniem właściwych metod, dobrze scharakteryzowanych i odpowiednio licznych grup próbek, w tym kontroli. Wyniki były odpowiednio zweryfikowane przy pomocy innych metod, co pozwoliło wytypować mikroRNA o istotnym znaczeniu dla patogenezy. Doktorantka doskonale połączyła badania eksperymentalne z analizami bioinformatycznymi i korzystała z wielu baz danych i narzędzi bioinformatycznych. Badania stanowią logiczny i dobrze przemyślany ciąg eksperymentów zmierzających do wyjaśnienia roli mikroRNA, głównie miRNA-1290 w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantka miała istotny udział w projektowaniu eksperymentów, analizie wyników i przygotowaniu manuskryptów. Wyniki badań zostały opublikowane w rozpoznawalnych międzynarodowych czasopismach naukowych i są dobrze cytowane.

Podsumowując, stwierdzam że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Janiszewskiej pt. **„Identyfikacja potencjalnie onkogennych mikroRNA zaangażowanych w patogenezę raka krtani”** oraz publikacje naukowe będące jej podstawą stanowią istotny wkład w rozwój badań nad udziałem mikroRNA w patogenezie raka krtani. Doktorantka spełniła wszystkie wymagania ustawowe dotyczące warunków stawianych kandydatom do stopnia doktora, a dotyczące przygotowania rozprawy doktorskiej. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Janiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę nowatorski charakter przedstawionych badań jak również ich aplikacyjny charakter, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Marta Olejniczak