Narodowy
Instytut
Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

Warszawa 14 września 2022 r.

dr hab. n .med. Magdalena Chechlińska, prof. NIO
Zakład Biologii Nowotworów

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Joanny Janiszewskiej pt.: *„Identyfikacja potencjalnie onkogennych mikroRNA zaangażowanych w patogenezę raka krtani”*.

Praca doktorska mgr. inż. Joanny Janiszewskiej pt.: „Identyfikacja potencjalnie onkogennych mikroRNA zaangażowanych w patogenezę raka krtani”, przygotowana pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Jarmuż-Szymczak, prof. IGCz oraz promotora pomocniczego – dr hab. Macieja Giefinga, prof. IGCz, wpisuje się w aktualny i istotny nurt badań poświęconych molekularnym mechanizmom patogenezy nowotworów.

Przedmiotem badań jest płaskonabłonkowy rak krtani (LSCC), najczęstszy wśród płaskonabłonkowych raków szyi i głowy, często diagnozowany w stadium zaawansowanym i związany z niskimi współczynnikami przeżycia pacjentów. Doktorantka postanowiła zidentyfikować mikroRNA o istotnym udziale w patogenezie tego nowotworu.

Praca doktorska ma formę opatrzonego autoreferatem zbioru 3 prac opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, niezgodnie z zapisami ustawowymi zwanego przez doktorantkę „cyklem”. Rozprawa liczy 115 stron, w tym, poza autoreferatem, spisem treści, wykazem skrótów, piśmiennictwem oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim, zawiera kopie publikacji, wymaganych oświadczeń współautorów oraz informację o źródłach finansowania badań.

We **wstępie** (**rozdz. I**) Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła aktualną wiedzę z zakresu epidemiologii i etiologii płaskonabłonkowego raka krtani, zmiany genetyczne związane z patogenezą tego nowotworu oraz metody leczenia chorych na LSCC. Następnie skrótowo opisała mikroRNA, ich funkcje w komórkach i mechanizm regulacji ekspresji genów przez te cząsteczki oraz ich rolę w nowotworach, ze szczególnym uwzględnieniem LSCC, dla którego podsumowała aktualnie dostępne dane na temat blisko 40 mikroRNA, które wykazują zaburzoną ekspresję w LSCC. Opisując w podrozdziale 2.2 rolę mikroRNA Napisała: „*Konsekwencją nadmiernej aktywacji mikroRNA może być wyciszenie genów supresji nowotworowej odpowiedzialnych za aktywację apoptozy lub kontrolę cyklu komórkowego.*”, ograniczając tym samym rolę regulacyjną mikroRNA do genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy apoptozy i cyklu komórkowego. Wiemy przecież, że większość, a może nawet wszystkie geny podlegają regulacji przez mikroRNA. Ponadto najlepiej poznane wyciszenie ekspresji genów nie jest jedynym kierunkiem regulacji ekspresji genów, mikroRNA mogą bowiem również pobudzać ekspresję genów, oddziałując na poziomie transkrypcji i/lub translacji. Doktorantka powinna była szerzej opisać rolę mikroRNA w nowotworach, aby wykazać się wiedzą na ten temat, a jednocześnie lepiej przedstawić solidne przesłanki podjętych badań.

W **rozdziale II** Doktorantka opisała **cel pracy**. Tutaj również niektóre sformułowania budzą pewne zastrzeżenia. W części wprowadzającej tego rozdziału Doktorantka pisze „Szczegółowe opisanie roli genów deregulowanych w LSCC, jak również mechanizmów je regulujących jest kluczowe dla pełnego zrozumienia biologii tego nowotworu." Obawiam się, że pełne zrozumienie biologii nowotworów nie jest możliwe.

Sformułowanie celu, który brzmi: „*głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy na temat roli mikroRNA w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani.*" jest zbyt ogólnikowe. Każde badanie naukowe służy „poszerzaniu wiedzy". *De facto* celem pracy była identyfikacja mikroRNA o istotnym znaczeniu w patogenezie LSCC i wykazanie mechanizmów ich działania. Możliwym, nieco bardziej ogólnym sformułowaniem celu jest sam tytuł rozprawy.

Cele szczegółowe zostały poprawnie sformułowane, z drobną uwagą, dotyczącą użycia w p. 3. sformułowania „*Wskazanie roli wybranych mikroRNA...*", zamiast pojęcia „rola", które w takim kontekście jest bardzo ogólne, bardziej adekwatne byłoby odniesienie do „mechanizmów działania". Zastanawia mnie dlaczego Doktorantka ograniczyła cele badania do „mikroRNA charakteryzujących się nadekspresją w LSCC"? Wiemy, że częstszym kierunkiem zmian ekspresji mikroRNA w nowotworach jest wyciszenie. I takie cząsteczki doktorantka przecież również zidentyfikowała w swojej drugiej pracy zbioru.

Na kolejnych stronach trzech podrozdziałów **rozdziału III** Doktorantka streściła **prace wchodzące w skład zbioru**. Doktorantka zrobiła to dość sprawnie, w sposób klarowny, ładnym naukowym językiem przedstawiając poszczególne publikacje i przeprowadzone badania. Nie mam w zasadzie żadnych merytorycznych uwag do zbioru prac. Zbiór został skonstruowany logicznie.

Pierwsza praca to przegląd wiedzy nt. mikroRNA w nowotworach głowy i szyi. Co prawda praca została opublikowana w 2013 roku, a więc szczegółowa wiedza na ten temat wzbogaciła się od tego czasu, niemniej kategorie problemów omówione w pracy są bardzo aktualne, a dane były aktualizowane we wstępie i dyskusji drugiej pracy zbioru, opublikowanej w 2015 roku. Oryginalne prace wchodzące w skład zbioru, stanowią świetnie zaplanowaną i zrealizowaną całość.

W pierwszej pracy oryginalnej (druga praca zbioru) wytypowano 7 cząsteczek mikroRNA o istotnie zmienionej ekspresji w LSCC. Należy podkreślić, że z użyciem mikromacierzy zawierających 1418 mikroRNA, profilowaniu mikroRNA poddano precyzyjnie dobrane grupy próbek w postaci: 5 guzów LSCC, komórek 16 linii wyprowadzonych z LSCC oraz trzy kontrole nienowotworowe: komercyjnie dostępne komórki prawidłowej krtani, tchawicy i oskrzeli. W treści publikacji autorzy również wymieniają dwie próbki wolnego od komórek nowotworowych marginesu operacyjnego, użyte jako kontrole w walidacji wyników za pomocą ilościowego PCR. [W tym kontekście zwracam uwagę na konieczność analizowania wyników w tym ostatnim materiale z dużą ostrożnością, gdyż coraz więcej doniesień wskazuje na to, że tkanki otaczające guz, nawet bez nacieków komórek nowotworowych nie są molekularnie prawidłowe, a wręcz często wykazują np. nadekspresję onkogenów, i nie powinny być uznawane za reprezentatywne dla tkanki prawidłowej. To właśnie badania nad nowotworami głowy i szyi były punktem wyjścia ogłoszonej już w latach 50-tych ub. wieku przez Slaughtera i wsp. teorii „field cancerization", rozwijanej obecnie w badaniach molekularnych.] Spośród 7 wytypowanych mikroRNA, walidacji na 50 klinicznych próbkach LSCC poddano trzy

ulegające nadekspresji cząsteczki, w tym opisaną wcześniej (2013 r.) w LSCC cząsteczkę miR-1290. W kolejnym etapie tych badań, z użyciem baz danych, w kontekście zbadanych genów o obniżonej ekspresji w liniach wyprowadzonych z LSCC wytypowano geny docelowe dla miR-1290, których ekspresję zbadano następnie w 22 guzach LSCC. Ostatecznie, po badaniach funkcjonalnych i potwierdzeniu zmian ekspresji na poziomie białka stwierdzono, że zahamowanie ekspresji miR-1290 w LSCC powoduje wzrost ekspresji białek MAF i ITPR2. W opisie tej publikacji Doktorantka nieprecyzyjnie określiła przedmiot badań w sformułowaniu celu tej pracy, pomimo że w pracy oryginalnej był on sformułowany poprawnie, mianowicie napisała: „*Głównym celem badań było wskazanie mikroRNA, których ekspresja jest zmieniona w nowotworze krtani w odniesieniu do...*", tu powinna była napisać, że chodzi o płaskonabłonkowego raka krtani, bowiem nie każdy nowotwór jest rakiem, a nie każdy rak jest płaskonabłonkowy. Na niejednorodność tej grupy nowotworów Doktorantka sama zwracała uwagę we wstępie.

W drugiej pracy oryginalnej (trzecia praca zbioru) kontynuowano badania nad mechanizmem onkogennego działania hsa-miR-1290 w LSCC poprzez regulację ekspresji MAF i określono geny i procesy regulowane przez ten czynnik transkrypcyjny. W tym złożonym badaniu, najpierw zidentyfikowano miejsce wiązania hsa-miR-1290 w sekwencji 3'UTR w drugim wariancie genu *MAF*, po czym immunohistochemicznie potwierdzono, że obniżona ekspresja genu MAF na poziomie mRNA przekłada się na zmiany poziomu białka i określono, że jego komórkowa lokalizacja jest różna w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Na podstawie analizy danych bazy TCGA wykluczono zmiany sekwencji, poziomu metylacji regionu okołopromotorowego oraz zmienność liczby kopii genu *MAF* jako przyczyny obniżonej ekspresji tego genu oraz całkowitego braku białka u części pacjentów z LSCC. Z kolei na podstawie wyników badania ekspresji (pierwsza w zbiorze praca oryginalna) i bioinformatycznych analiz sekwencji motywów wiążących białko MAF, a następnie analiz ontologii genów zidentyfikowano 9 genów z miejscem wiązania MAF w sekwencji promotorowej, o obniżonej ekspresji w komórkach LSCC i zaangażowanych w procesy wyłonione w analizie ontologii. Na podstawie danych literaturowych wytypowano gen *PRODH*, który koduje białko opisywane jako czynnik proapoptotyczny zależny od TP53. Ostatecznie – na podstawie analiz *in silico* i badań funkcjonalnych na jednej z dwóch badanych linii – wykazano, że nadekspresja hsa-miR-1290 skutkowała obniżeniem ekspresji *MAF* na drodze bezpośredniego oddziaływania i spadkiem ekspresji *PRODH*.

Doktorantka podsumowała zbiór prac w **rozdziale IV** (str. 78) i przedstawiła wnioski, które sformułowała prawidłowo, jednak w dziwny sposób uporządkowała je z użyciem liczb i liter, które to zróżnicowanie wprowadza bałagan. Nie wiadomo też dlaczego wniosek nr 3 brzmi: „Wyniki uzyskane w toku niniejszej pracy wskazują, iż:". Można odnieść wrażenie, że w pracy umieszczono roboczą wersję wniosków. W tym miejscu zwrócę też uwagę na sformułowanie rozdziałów „Wnioski" w opisach oryginalnych prac zbioru, w których to rozdziałach, poza wnioskami zawarto elementy dyskusji wyników. Można było wydzielić w tych opisach typowe dla prac naukowych podrozdziały „dyskusja".

W **rozdziałach V i VI** Doktorantka przedstawiła **streszczenia** w języku polskim i angielskim, w których skrótowo ujęła przedmiot rozprawy. W streszczeniach zbrakło opisu i wielkości grup badanych próbek. Streszczenie w języku angielskim odzwierciedla treści zawarte w streszczeniu polskim, jest poprawne językowo.

Autoreferat kończy spis 108 prawidłowo dobranych publikacji przywoływanych w treści opisu publikacji, w tym 27 opublikowanych w latach 2020-2022.

Oceniając poprawność redakcyjną rozprawy należy stwierdzić, że Doktorantka nie ustrzegła się błędów edytorskich, językowych, ortograficznych i bardzo licznych interpunkcyjnych, występują też wyrażenia potoczne i terminy niepoprawne, anglicyzmy oraz kilka nieco bizantyjskich sformułowań. Poniżej kilka przykładów:

s. 1 „boleści" powinno być „ból"
s. 2:"zdrowe komórki" powinno być „prawidłowe komórki"
s. 4 „leczenie nowotworów", powinno być np.: „leczenie chorych na nowotwory"
s. 4 „leczenie radio- i chemioterapią" powinno być np.: „leczenie promieniowaniem i chemiczne"
s. 4: „Do głównych szlaków celowanych w HNSCC należą...", powinno być np. „do głównych szlaków, które stanowią cel terapeutyczny"
s. 12 „w procesie patogenezy" powinno być „w patogenezie"
s. 16 „Koncepcja badań" – taką swoją rolę Doktorantka przedstawiła w pracy przeglądowej, adekwatnym określeniem byłoby tutaj „koncepcja pracy"
s. 30 „zdrowa krtań" powinno być „prawidłowa krtań"
s. 50 „rodzajach nowotworów" powinno być „typach nowotworów"
s. 52 „W celu wyłonienia, które spośród" powinno być np.: „W celu sprawdzenia, które spośród"
s. 52 „TP53 zależny" powinno być „zależny od TP53"
s. 79 „Wartym podkreślenia jest fakt, że..." zamiast „Warto podkreślić, że..."
s. 80 „terapii antynowotworowych" powinno być „terapii przeciwnowotworowych"

Podsumowując, przedłożony do oceny zbiór prac przedstawia badanie ekspresji i funkcji mikroRNA w płaskonabłonkowym raku krtani. Badania zostały zaplanowane, przeprowadzone i zinterpretowane prawidłowo. Doktorantka zrealizowała cel rozprawy i uzyskała w pełni oryginalne dane, mianowicie wyłoniła miR-1290 jako istotną w tym nowotworze cząsteczkę regulacyjną oraz udowodniła mechanizm działania tego mikroRNA poprzez czynnik transkrypcyjny MAF, który z kolei reguluje ekspresję *PRODH*, co może mieć znaczenie w regulacji apoptozy w płaskonabłonkowym raku krtani. Wykazała się przy tym wiedzą teoretyczną, znajomością wielu nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej i hodowli komórkowych oraz biostatystyki i umiejętnością prowadzenia badań naukowych, bowiem wg oświadczeń Doktorantki i współautorów wkład doktorantki był wiodący zarówno w koncepcję jak i wykonanie badań, a ponadto w przygotowywanie publikacji.

Uwagi krytyczne przedstawione w recenzji dotyczą głównie treści autoreferatu, są w tym zakresie również adresowane do promotora i promotora pomocniczego i nie wpływają na całościową pozytywną ocenę rozprawy.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU. nr 65, poz.595 z późn. zm.) i zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN z wnioskiem

o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Janiszewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, uwzględniając całościowe i wielowątkowe ujęcie problemu, interesujące, poddane całościowej analizie i poprawnie zinterpretowane wyniki uzyskane w bardzo dobrze zdefiniowanej grupie nowotworów oraz niewątpliwą oryginalność osiągnięcia Doktorantki wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
ZAKŁADU BIOLOGII NOWOTWORÓW
dr hab. n. med. Magdalena Chechlińska
Prof. Instytutu