



OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej

pt. „Identyfikacja interakcji miRNA-mRNA w patogenezie dziecięcej T-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej (T-ALL)”

wykonanej

w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

pod kierunkiem dr hab. n.med. Małgorzaty Dawidowskiej, prof. IGC PAN (promotor)

oraz

dr n.med. Bronisławy Szarzyńskiej (promotor pomocniczy)

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN z dnia 20 października 2022 roku.

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej pt. „*Identyfikacja interakcji miRNA-mRNA w patogenezie dziecięcej T-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej (T-ALL)*” oparta jest na zestawie pięciu prac opublikowanych w latach 2018- 2022. Doktorantka jest pierwszą autorką czterech z nich- jednej o charakterze przeglądowym i trzech prac eksperymentalnych. Udział doktorantki w przedstawionych pracach, wprowadzie nie został wyceniony procentowo, jednak zakres prac wykonanych przez Doktorantkę i opisanych w Oświadczeniach autorów, jednoznacznie wskazują na Jej wiodącą rolę w prowadzonych badaniach. Docenić należy jakość opublikowanych prac, co w pełni

odzwierciedla sumaryczny współczynnik oddziaływania wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynoszący IF= 26,87.

Rozprawa doktorska skonstruowana jest w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej prace i ich omówienie stanowią jej trzon. W rozprawę włączono typowe rozdziały, takie jak Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie do przedstawionych prac oraz spis cytowanej literatury. Uważam, że ta część pracy została przygotowana przez mgr Drobna-Śledzińską niezwykle starannie z wykorzystaniem bardzo dobrych źródeł literaturowych. Rozdział ten został napisany bardzo dobrym i czytelnym językiem, który doskonale wprowadza w prezentowane prace.

W składzie rozprawy znajdują się także wymagane publikacje oraz odpowiadające im Oświadczenie współautorów określające procentowy udział każdego z nich w przedstawionych pracach. Doktorantka zawarła w opisie informacje na temat źródeł finansowania badań przedstawionych w rozprawie. Zapoznanie się z Oświadczeniami Promotorki pracy, która szczegółowo określiła zarówno rolę i udział doktorantki, jak i własny w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji, a także precyzyjne stwierdzenia, co do zakresu zaangażowania w dane publikacje wszystkich pozostałych współautorów pozwalają uznać, że wkład doktorantki w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie i jej zaprojektowanie – jako kompleksowego podejścia do zagadnienia zrozumienia roli miRNA w regulacji ekspresji genów w patogenezie T-ALL – jest zasadniczy i znacznie przekraczający wkład pozostałych badaczy. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło doktorantki.

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej finansowane były ze środków przewidzianych na realizację trzech grantów NCN, z czego doktorantka była kierownikiem jednego z nich (MINIATURA) oraz w ramach programu Horyzont 2020.

2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badanie roli miRNA w procesie regulacji ekspresji genów w patogenezie T-ALL. Ta grupa RNA to niezwykle zróżnicowana klasa transkryptów, które pomimo braku zdolności do kodowania białek, pełnią funkcje regulatorowe w szeregu procesów komórkowych. Co szczególnie ważne, z punktu widzenia prezentowanej pracy, miRNA mogą pełnić znaczące role w przebiegu wielu chorób człowieka, w tym chorób nowotworowych. Znaczenie funkcjonalne oraz kliniczne miRNA

jak również techniki badawcze, w tym szczególnie techniki wysokoprzepustowe wykorzystywane do badania miRNA zostały bardzo dobrze opisane w pracy przeglądowej pt. „*T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA-perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers*”.

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy była funkcjonalna charakterystyka miRNA zaangażowanych w patogenezę T-ALL. Doktorantka zrealizowała go w następujących etapach:

1. identyfikacja miRNA ulegających różnicowej ekspresji w T-ALL;
2. opracowanie strategii identyfikacji miRNA służących jako optymalne endogenne normalizatory do profilowania ekspresji miRNA w T-ALL;
3. analizy funkcjonalne wybranych miRNA.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik, które moim zdaniem były w pełni odpowiednie do ich realizacji. Zostały one bardzo szczegółowo opisane w odpowiednich rozdziałach „Materials and methods” prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia rezultaty wielu obszernych, bardzo dobrze zaplanowanych prac, zarówno *in silico*, jak i *in vitro*.

Najistotniejsze wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to:

1. uzyskanie globalnego profilu ekspresji miRNA w białaczce T-ALL oraz wskazanie potencjalnych transkryptów i szlaków komórkowych, w których zidentyfikowane miRNA mogą pełnić rolę regulatorowych RNA. Analiza ta jest bardzo dobrą podstawą do szczegółowych badań funkcjonalnych określonych miRNA, a także do dalszych poszukiwań cząsteczek o bezpośrednim znaczeniu klinicznym;
2. opracowanie strategii identyfikacji optymalnych endogennych normalizatorów opartej na kompleksowej analizie stabilności ekspresji miRNA zarówno na poziomie miRNA-seq jak i RT-qPCR. Doktorantka wyselekcjonowała trzy miRNA (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-25-3p oraz hsa-let-7a-5p), a następnie zweryfikowała użyteczność kombinacji tych miRNA jako endogennych normalizatorów do walidacji poziomu ekspresji miRNA w komórkach linii T. Autorka wskazuje, iż opisana strategia ma charakter uniwersalny i może być zastosowana do projektowania badań profilowania miRNA w innych typach nowotworów;

3. eksperymentalne weryfikacja poziomu wybranych miRNA w próbkach pochodzących od pacjentów oraz odpowiednich liniach komórkowych;
4. wskazanie funkcji biologicznej dla hsa-miR-20b-5p oraz hsa-miR-106a-363 wpływających na poziom ekspresji ich genów docelowych *PTEN* oraz *BIM*. Wykazano zaangażowania miRNA w procesy antyapoptotyczne oraz wspierające proliferację komórek. Częsteczki te zostały wcześniej zidentyfikowane jako te ulegające podwyższonej ekspresji w próbkach od pacjentów, co w połączeniu z uzyskanymi wynikami *in vitro* może wskazywać na ich potencjał onkogenny;
5. wykazanie roli hsa-miR-363-3p oraz zaproponowanie mechanizmu jego działania. Doktorantka wykazała, że miR-362-3p może wpływać na represję transkrypcji *PTPRC* i *SOCS2* i brać tym samym udział w regulacji ścieżki sygnałowej zależnej do kinaz JAK. Funkcjonalną konsekwencją powyższych oddziaływań jest znaczący wzrost tempa proliferacji komórek. Dodatkowo, wskazano na potencjalną rolę metylacji regionu promotorowego genu *SOCS2* w obniżeniu jego ekspresji u pacjentów z T-ALL.

4. Znaczenie uzyskanych wyników

Literatura naukowa obejmuje w tej chwili wiele prac wskazujących na rolę i znaczenie funkcjonalne miRNA w różnych typach nowotworów. Prace zaprezentowane w ramach rozprawy doktorskiej i badania wykonane przez Doktorantkę oraz zespół badawczy są bardzo cennym wkładem identyfikującym znaczenie funkcjonalne i kliniczne miRNA w T-ALL. Praca mgr Moniki Drobnej-Śledzinskiej łączy w sobie zarówno bardzo dogłębną analizę bioinformatyczną dostępnych danych, jak i bardzo dobrą analizę eksperymentalną wybranych miRNA, wskazując nie tylko bezpośrednio na mechanizm ich działania, ale co wydaje mi się, bardzo cenne, również na drogę i możliwości poszukiwania funkcji innych cząsteczek tego typu. Z punktu widzenia potencjalnego zastosowania klinicznego na uwagę zasługuje również korelacja uzyskanych wyników z potencjalnymi podtypami T-ALL, wskazując tym samym na znaczenie diagnostyczne czy prognostyczne zidentyfikowanych miRNA. Dodatkowo, identyfikacja mechanizmów oddziaływania miRNA z cząsteczkami docelowymi może mieć znaczenie dla poszerzonej kwalifikacji pacjentów do leczenia ukierunkowanego, a w dalszej perspektywie- może przyczynić się także do rozwoju terapii personalizowanej w T-ALL.

5. Komentarze

Ze względu na fakt, iż rozprawa doktorska stanowi zbiór opublikowanych i zrecenzowanych już badań, pozwolę sobie jedynie na drobne pytania i komentarze.

1. Do przewidywania cząsteczek docelowych dla miRNA, zespół badawczy wykorzystywał 5 algorytmów. Czy Doktoranta mogłaby uściślić, co to były za algorytmy i na jakiej podstawie selekcjonowano potencjalnych partnerów oddziaływania?
2. Bardzo doceniam koncepcję precyzyjnego pomiaru poziomu miRNA w oparciu o specyficzne endogenne normalizatory. Chciałabym jednak zapytać- jak bardzo powszechnie stosowane w badaniach miRNA normalizatory są nieadekwatne lub/i/czy ich poziom znacząco wpływa na wynik analizy? Domyślam się, że uniwersalność podejścia obejmuje koncept, a nie zestaw 3 konkretnych miRNA wyselekcjonowanych w tych badaniach?
3. W kontekście zidentyfikowanych i scharakteryzowanych miRNA, nasuwa się pytanie o ich potencjał terapeutyczny. Czy Doktorantka mogłaby wskazać potencjalne rozwiązania pozwalające na wykorzystanie miRNA w terapii T-ALL?
4. Czy istnieją obecnie możliwości zwiększania specyficzności działania środków terapeutycznych celujących w czynniki epigenetyczne (np. blokery deacetylaz histonowych, środki hipometylujące) w T-ALL?
5. Wspomniana wyżej korelacja wyników poziomu miRNA z podtypami T-ALL może mieć ogromne znaczenie diagnostyczne. Czy Doktorantka mogłaby bardziej przybliżyć ten aspekt badań? Dodatkowo, czy istnieją (ewentualnie jakie) narzędzia obliczające wartość prognostyczną miRNA w T-ALL?
6. Czy w kontekście przyszłych badań, planowane są może testy *in vivo*?

6. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej na uwagę zasługuje wysoka jakość przeprowadzonych badań, co znalazło odzwierciedlenie w poziomie opublikowanych prac. Bardzo podoba mi się połączenie zaawansowanych metod bioinformatycznych i podejścia eksperymentalnego, co skutkuje kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona na każdym możliwym poziomie dostępności i mam przekonanie, że dane, którymi posługiwał się zespół zostały wykorzystane absolutnie do końca. Dodatkowo, uzyskane wyniki, zostały potwierdzone dobrze dobranymi pracami eksperymentalnymi. Doceniam także fakt, iż

doktorantka wraz ze współautorami w swoich pracach w pełni czerpała z publicznie dostępnych danych, bardzo umiejętnie je wykorzystując, jak również w bardzo elegancki sposób uzupełniając je odpowiednimi pracami własnymi. Dlatego też uważam, iż rozprawa doktorska i składające się na nią prace są bardzo cennym i rzetelnym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późniejszymi zmianami). Zwracam zatem się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość prac stanowiących jej trzon, wnoszę do Rady Naukowej o jej wyróżnienie.

Poznań, 25.05.23


dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN