

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Jasiak pt. „Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych nowotworów człowieka”.

Badania nad zjawiskiem alternatywnego splajsinu są ważną częścią badań podstawowych dotyczących kancerogenezy. Przedstawiona do oceny praca omawia złożony proces składania mRNA, który podlega ścisłej kontroli w celu utrzymania równowagi ekspresji białek i ich izoform w komórkach. Doktorantka zwraca uwagę na znaczenie tej równowagi dla utrzymania homeostazy i prawidłowego funkcjonowania komórek. Wskazuje również na potencjalne ryzyko związane z obecnością głęboko intronowych wariantów genetycznych, które mogą predysponować do zachorowania na nowotwory. Doktorantka skupiła się na roli alternatywnego składania genów *BARD1*, *BRCA1* i *BRCA2* w wybranych nowotworach człowieka. Doktorantka przeprowadziła badania nad zmianami poziomu ekspresji *BARD1β* w różnych rodzajach nowotworów, a także oceniła częstość występowania patogennych transkryptów *BRCA1/2* związanych z zmianami głęboko intronowymi.

Również pytaniem, które stawia Doktorantka, jest czy obecne procedury diagnostyczne są wystarczające, zwłaszcza jeśli chodzi o zakres analizy intronowych sekwencji flankujących. Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia roli nadekspresji izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* oraz *BRCA2ΔE3* w RNA pacjentek z rakiem jajnika. Zauważa, że te zmiany nie występują w próbkach kontrolnych od zdrowych kobiet, co sugeruje potencjalnie istotne zjawisko ogólnoustrojowe, ale wymaga dodatkowych szczegółowych badań dla pełnego zrozumienia przyczyn.

Praca stanowi ważny wkład w badania nad alternatywnym składaniem genów i jego związkami z rozwojem nowotworów, które należy kontynuować.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 34 strony. Ma budowę typową dla tego typu prac. Tekst uzupełniają oraz wzbogacają 1 tabela i 10 rycin. Pracę zamyka dodatek obejmujący siedem stron, który zajmują dwie oryginalne opublikowane prace wchodzące w skład pracy doktorskiej Doktorantki.

Prace otwiera informacja bibliograficzna Doktorantki opisująca dwie prace oryginalne oraz inne osiągnięcia naukowe. Sumarycznie dwie prace oryginalne to IF: 8.542 i punktacja MEiN:170.

WYKAZ SKRÓTÓW

Wykaz skrótów jest opisany poprawnie. Jedyne wymienienie z nazwy białek i genów bez wytłumaczenia znaczenia daje pewien niedosyt, zwłaszcza, że niektóre z nich nie są często wymieniane w literaturze.

WSTĘP

Wstęp rozpoczyna dobry i zwięzły opis epidemiologii nowotworów. Doktorantka także opisuje negatywny wpływ śmiertelności z powodu choroby nowotworowej w aspekcie ekonomicznym z perspektywy państwa oraz w aspekcie psychologicznym dotyczącym chorego jak i jego rodzinę. Następnie Doktorantka opisuje etapy jakie możemy wyróżnić w procesie kancerogenezy. Jest tutaj na rycinie nr 2 błąd ortograficzny, jest napisane „przeżutujący” a powinno być napisane „przerzutujący”. Zgrabnie i przejrzyście opisuje kolejne fazy rozwoju nowotworu począwszy od preinicjacji, inicjacji, poprzez nowotwór *in situ* a skończywszy na nowotworze przerzutującym. Doktorantka zwraca uwagę na znaczenie mutacji napędzających oraz mutacji pasażerskich w kancerogenezie. Po tym wstępnie Doktorantka płynnie przechodzi do opisu procesu splicingu oraz jego znaczenia dla procesu kancerogenezy. Wymienia sekwencje kluczowe dla procesu splicingu tj. sekwencje zlokalizowane na granicy intron/egzon, punkt rozgałęzienia oraz elementy wzmacniające oraz wyciszające. Potem Doktorantka opisuje mutacje, zmiany epigenetyczne powodujące zaburzenie prawidłowego procesu splicingu co ilustruje kompleksową ryciną. Następnie Doktorantka sygnalizuje istotną rolę zaburzenia splicingu w zespołach predysponujących do rozwoju chorób nowotworowych. Dalej Doktorantka zwraca uwagę na ograniczenie analizy mutacji w genach supresorowych tylko do sekwencji kodujących a pomijając miejsca pozaegzonowe związane ze splicingiem. Wskazuje, że wiele ocenianych wariantów zlokalizowanych w regionach związanych ze splicingiem było ocenianych tylko z wykorzystaniem metod bioinformatycznych (*in silico*). Dalej Doktorantka podkreśla, że około 10% rzadkich patogennych wariantów intronowych w genach *BRCA1* i *BRCA2* nie jest wykrywana z wykorzystaniem aktualnych protokołów diagnostycznych. Może to budzić uzasadnione obawy związane z wydajnością oraz czułością obecnych metod diagnostycznych. W dalszym opisie Doktorantka przedstawia znaczenie mechanizmów naprawy DNA w których kluczowy udział biorą białka BRCA1, BRCA2 i BARD1. Pokrótce opisuje proces naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA co dodatkowo wzbogaca bardzo informatywną ryciną. Rozdział

Wstępu kończy opis znaczenia mutacji dla terapii celowanych opartych o inhibitory PARP. Doktorantka zwraca również w tym miejscu uwagę na izoformy białek (BRCA1 i BARD1), które mogą promować rozwój nowotworu (BARD1 β i BARD1 δ lub BRCA1 Δ E11q, BRCA1 Δ E11) i mogą być związane z wystąpieniem oporności wtórnej na PARPi.

Sumarycznie rzecz ujmując Wstęp jest napisany dobrze i przejrzyste oraz logicznie wprowadza czytelnika w zagadnienie i świadczy o wyczerpaniu tematu przez Doktorantkę oraz o jej szerokiej wiedzy w przedstawianym zakresie.

HIPOTEZA I CELE PRACY

Hipoteza pracy jest jasno przedstawiona w pierwszym akapicie tego rozdziału. Natomiast cele pracy doktorskiej są logicznie ustrukturyzowane na cel główny oraz trzy cele szczegółowe. Pierwszy dotyczy nowotworów wieku dziecięcego a kolejne dwa dotyczą nowotworów jajnika u dorosłych.

Rozdział ten kończy informacja o dwóch pełnotekstowych artykułach opublikowanych w międzynarodowych indeksowanych czasopismach. Dodatkowo prezentowana Rozprawa zawiera niepublikowane wyniki, dotyczące określenia ewentualnego wpływu nowotworu jajnika na występowanie ogólnoustrojowych zmian ekspresji wybranych izoform genów *BRCA1* i *BRCA2*. Badania zrealizowano na modelu komórkowym (limfocyty poddano działaniu czynników produkowanych przez komórki nowotworowe). Wyniki ww. badań są obecnie przedmiotem przygotowywanej publikacji.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

W rozdziale tym Doktorantka omawia opublikowane prace. Rozdział rozpoczyna omówienie Publikacji 1 tj. Jasiak Anna, i in. *Expression of BARD1 β isoform in selected pediatric tumors*. Genes; 2021: vol. 12, nr 2, art ID 168, s. 1-14. Publikacja opisuje badania, które miały na celu ocenę ekspresji dwóch izoform genu *BARD1*, *BARD1-FL* i *BARD1 β* , w wybranych guzach pediatrycznych. Doktorantka analizowała 89 przypadków nerwiaka zarodkowego, 24 nowotwory z komórek germinalnych oraz siedem przypadków mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego. Ocena poziomu izoformy *BARD1 β* była

dokonywana w relacji do poziomu ekspresji transkryptu podstawowego (*BARD1-FL*). Zaobserwowano podwyższoną ekspresję *BARD1β* w tkance nowotworowej, zwłaszcza w przypadku neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, guzów pęcherzyka żółtkowego (typ GCT) oraz mięśniakomięsa prążkowanokomórkowego (RMS). W tych dwóch ostatnich podtypach nowotworów Doktorantka wykazała dodatkowo podwyższony poziom ekspresji genu TERT (kodującego telomerazę). Doktorantka również wykryła, że u dwóch pacjentów z RMS po chemioterapii obniżył się poziom izoformy *BARD1β*.

Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę z wykonanych badań wskazują na potencjalnie onkogenny charakter izoformy *BARD1β* w neuroblastoma, a także przedstawiają nowe zależności między poziomem ekspresji a typem histologicznym. Dodatkowo, po raz pierwszy przeprowadzono analizę poziomu ekspresji *BARD1β* w grupie guzów pęcherzyka żółtkowego (GCT) i mięśniakomięsa prążkowanokomórkowego (RMS).

W Publikacji 2 „Jasiak Anna, i in. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 alternative splicing in predisposition to ovarian cancer*. Exp. Mol. Pathol.; 2023: vol. 130, art. ID 104856, s. 1-7 Doktorantka przedstawia wyniki badań alternatywnego składowania mRNA w materiale wyizolowanym z krwi obwodowej 101 pacjentek z rakiem jajnika. We wszystkich przypadkach wykluczono wcześniej występowanie mutacji germinalnych w 25 genach w tym w *BRCA1*, *BRCA2* i *BARD1*. Głównym celem tej pracy jaki postawiła sobie Doktorantka była ocena częstości występowania nieprawidłowych transkryptów mRNA, powstałych na skutek obecności wariantów głęboko intronowych (fragmenty genu nieobjęte rutynową analizą) lub nieprawidłowo sklasyfikowanych wariantów sekwencyjnych zlokalizowanych w eksonach genów *BRCA1* i *BRCA2*. Doktorantka nie zidentyfikowała nowych nieprawidłowych transkryptów, jednak wykazała znaczną nadekspresję *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* u pacjentek z rakiem jajnika, która nie występowała u zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. Co interesujące Doktorantka nie wykryła innych zmian genetycznych mogących mieć wpływ na nadekspresję ww. wariantów *BRCA1* i *BRCA2*. Dodatkowo Doktorantka zbadała ekspresję ww. wariantów w 10 próbkach guzów pochodzących od tych samych pacjentek i nie wykazała zmian w ekspresji co Doktorantka tłumaczy globalnym charakterem zmian ekspresji oraz stawia hipotezę o udziale czynników niegenetycznych w regulacji splicingu ww. wariantów (*BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*)

NIEOPUBLIKOWANA CZĘŚĆ BADAŃ

Prace opisane w tej części zainspirowały wyniki badań opisanych w Publikacji 2. Badania na celu wyjaśnienie podłoża obserwowanej nadekspresji wariantów *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika. Doktorantka postawiła śmiałą hipotezę o niegenetycznych czynnikach regulujących ekspresję ww. wariantów związanych w ogólnoustrojowymi zmianami na rozwijający się nowotwór. Hipotezę Doktorantka weryfikowała stosując zgrabny model hodowli limfocytów w medium uzyskanym z hodowli linii komórkowej raka jajnika (OVCAR-4).

Następnie Doktorantka opisuje metodykę w tym: przygotowanie medium kondycyjnego, izolacje i hodowlę komórek jednojądrzastych. Opisowi towarzyszy czytelny schemat wykonanych etapów. Potem Doktorantka opisuje izolacje RNA oraz analizę ekspresji czynników metylacyjnych (metylotransferaz: *DNMT3A* i *METTL3* oraz acetylotransferazy *HDAC1*) z wykorzystaniem metody RT-qPCR. Do oceny ekspresji wariantów *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* wykorzystano celowane sekwencjonowanie amplikonów metodą NGS. Doktorantka do analizy uzyskanych wyników zastosowała kilka testów statystycznych wykorzystując oprogramowanie Statistica (Statsoft Software) oraz język programowania Python.

Wyniki są przedstawione w sposób jasny i klarowny. Towarzyszą im kolorowe ryciny oraz tabele. Analiza poziomu ekspresji genów *DNMT3A*, *METTL3* i *HDAC1* przy użyciu RT-qPCR w komórkach hodowanych w medium kondycyjnym i kontrolnym w różnych punktach czasowych (0, 4 godz., 8 godz., 24 godz., 48 godz. i 72 godz.) wykazała dynamiczne zmiany w ich ekspresji. W obu warunkach hodowli zaobserwowano początkowy spadek ekspresji, po którym następował stopniowy wzrost. Pomimo braku istotnych różnic statystycznych między komórkami hodowanymi w różnych warunkach (medium kondycyjnym i medium kontrolnym), Doktorantka zaobserwowała stopniowy spadek ekspresji *METTL3*, *DNMT3A* i *HDAC1* około 48 godziny hodowli w medium kondycyjnym. Doktorantka krytycznie podkreśla, że wynik ten wymaga dalszego potwierdzenia. W tkance guza oraz w zdrowej tkance otaczającej Doktorantka nie stwierdziła istotnych różnic w poziomie ekspresji *METTL3*, *DNMT3A* i *HDAC1*. W ostatnim eksperymencie Doktorantka przeprowadziła analizę poziomu ekspresji izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*, która nie wykazała różnic znamiennej statystycznie.

Dyskurs naukowy jest prowadzony poprawnie. Jedyne na początku Dyskusji jest niefortunne stwierdzenie „Część z tych substancji oddziałuje lokalnie (w miejscu guza) i nosi nazwę mikrośrodowiska (...)”. (Dodatkowo jest drobna literówka ‘lokalne’ a powinno być ‘lokalnie’). Mikrośrodowisko guza składa się przecież z komórek oraz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz obecnych w nim różnego rodzaju cytokin. Raczej zdanie to powinno brzmieć „Część z tych substancji oddziałuje lokalnie (w miejscu guza) w mikrośrodowisku guza (...)”

Doktorantka sprawnie i płynnie dyskutuje swoje wyniki z cytowanym piśmiennictwem. Doktorantka umiejętnie łączy wiedzę na temat systemowego oddziaływania guza oraz regulacji ekspresji różnych izoform genów i ich wpływu na kancerogenezę. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki nie potwierdziły zakładanej hipotezy badawczej o różnicach w ekspresji izoform *BRCAl/2* oraz nie znalazła potwierdzenia wpływu czynników produkowanych przez komórki raka na enzymy związane z regulacją stanu epigenetycznego. Jednakże badania przeprowadzone przez Doktorantkę i oparte na modelu eksperymentalnym potwierdzają zgodność obserwacji z wynikami uzyskanymi przy porównaniu tkanki nowotworowej i zdrowej tkanki pochodzącej od tej samej pacjentki. Brak różnic w poziomie ekspresji izoform i czynników epigenetycznych Doktorantka tłumaczy tym, że zmiany zachodzą na poziomie całego organizmu, a nie tylko lokalnie w guzie nowotworowym. Następnie krytycznie odnosi się do swoich badań, że jednak, brak różnic w wynikach uzyskanych z komórek hodowanych w medium kondycyjnym i kontrolnym w modelu *in vitro* może wynikać z niedoskonałości samego modelu, szczególnie związanych z utratą frakcji granulocytów podczas separacji komórek jądrzastych krwi. Słusznie wskazuje, że granulocyty, obecne we krwi obwodowej pacjentów nowotworowych, mogą wpływać na wyniki eksperymentu. Dodatkowo, krótki czas hodowli (72 godz.) był wybierany ze względu na uniknięcie efektów zafałszowania wyników związanych z długotrwałym hodowaniem komórek. Krytycznie podsumowuje swoje wyniki wskazując, że zastosowany model badawczy ma swoje ograniczenia i nie odzwierciedla pełni złożoności procesów zachodzących *in vivo* w komórkach pacjentek z rakiem jajnika, podkreślając jednocześnie trudności w modelowaniu tych procesów w warunkach *in vitro*. Samokrytyka świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

PODSUMOWANIE

Podsumowanie w sposób wyczerpujący odpowiada na założone cele co świadczy o dobrej konstrukcji całej pracy.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań w ramach pracy doktorskiej podkreślają złożoność alternatywnego składania mRNA i jego roli w patobiologii nowotworów. Główne obserwacje obejmują wyższą ekspresję *BARD1β* w tkankach nowotworowych, co potwierdza jego potencjalny onkogenny charakter. Dodatkowo, brak nieprawidłowych transkryptów *BRCA1* i *BRCA2* w sporadycznym raku jajnika sugeruje skuteczność obecnych protokołów diagnostycznych, co jest istotnym odkryciem Doktorantki dla diagnostyki molekularnej zwłaszcza w erze terapii celowanych nowotworów BRCA - zależnych z wykorzystaniem inhibitorów PARP. Kolejne odkrycie Doktorantki to wyższa ekspresja izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* u pacjentek z rakiem jajnika co wskazuje na ich potencjalne znaczenie w onkogenezie. Niemniej jednak jak słusznie konkluduje Doktorantka, że badania nie wykazały wpływu czynników genetycznych, środowiskowych ani epigenetycznych na ekspresję tych izoform, co podkreśla znaczenie badań nad alternatywnym składaniem mRNA w kontekście nowotworów i wskazuje na potrzebę dalszych poszukiwań w tym obszarze.

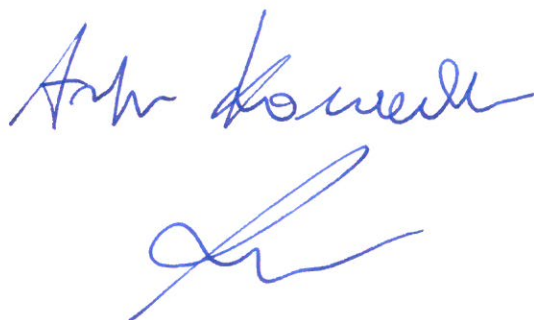
Prace uzupełnia poprawnie zredagowane i zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim oraz rozdział Piśmiennictwa liczący 29 pozycji. Pracę Doktorską wieńczy *Rozdział 12* zawierający dwie opublikowane prace pełnotekstowe wchodzące w skład dysertacji.

Resumując należy podkreślić, że całość badań została bardzo dobrze zaplanowana i profesjonalnie przeprowadzona. Świadczy to o dobrej organizacji pracy oraz dobrym "warsztacie naukowym" Doktorantki. Dla realizacji zamierzonych celów Doktorantka wykorzystwała różne techniki biologii molekularnej w tym hodowle komórkowe, model komórkowy, sekwencjonowanie następnej generacji, ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją oraz zaawansowaną analizę bioinformatyczną. Wyniki zostały przedstawione za pomocą licznych ilustracji, tabel i wykresów.

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Anny Jasiak spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Naukowej Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pan mgr Anny Jasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2021r., poz.478 ze zm).

Za powstałą pracą stoi ogrom wykonanej pracy (dwie opublikowane oryginalne prace), techniki biologii molekularnej oraz rzetelność pracy, dojrzały sposób prezentacji i wysoki poziom merytoryczny, duża wartość poznawcza wyników proponuję rozważenie przez Radę Naukową możliwości wyróżnienia pracy.

A handwritten signature in blue ink, consisting of two lines. The top line is a cursive name, and the bottom line is a stylized flourish or second part of the signature.