



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. n. med. Jan Lubiński

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Zakład Genetyki i Patomorfologii

Szczecin, dnia 27.02.2024 r.

Recenzja

pracy w przewodzie doktorskim ***mgr Anny Jasiak***

Do recenzji otrzymałem rozprawę na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne Pani mgr Anny Jasiak zatytułowaną „***Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych nowotworów człowieka***”. Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Ratajska. Promotor pomocniczy: dr n. med. Alina Kuźniacka.

Celem głównym pracy była analiza alternatywnego składania mRNA w podstawowych genach naprawy DNA, takich jak: *BARD1*, *BRCA1* i *BRCA2*.
Celem szczegółowym były:

- ocena poziomu ekspresji izoformy *BARD1β* w wybranych nowotworach wieku dziecięcego;
- ocena spektrum i częstości występowania nieprawidłowych transkryptów genów *BRCA1* i *BRCA2* u pacjentek z rakiem jajnika;
- próba identyfikacji mechanizmów prowadzących do nadekspresji *BRCA1ΔE11* oraz *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Jasiak Anna, Krawczyńska Natalia, Iliszko Mariola, Czarnota Katarzyna, Buczkowski Kamil, Stefanowicz Joanna, Adamkiewicz-Drożyńska Elżbieta, Cichosz Grzegorz, Iżycka-Świeszewska Ewa. *Expression of BARD1 β isoform in selectes pedriatric tumors*. Genes; 2021: vol. 12, nr 2, art. ID 168, s. 1-14. Celem publikacji była ocena ekspresji *BARD1-FL* i *BARD1 β* w wybranych guzach pediatrycznych. W pracy oceniono nerwiaki zarodkowe, wybrane guzy germinalne oraz pilotażową serię przypadków mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego.

Na podstawie parametrów jakościowych do badania zakwalifikowano:

- 90 przypadków nerwiaka zarodkowego, w tym dla trzech przypadków dostępny był materiał przed i po leczeniu;
- 24 nowotwory z komórek germinalnych; 19 przypadków tkanki guza sparowanej z prawidłową tkanką okalającą (obrzeże guza);
- siedem guzów mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego; dla wszystkich przypadków dostępny był także materiał z obrzeża guza.

Poziom izoformy *BARD1 β* oceniano w stosunku do poziomu ekspresji transkrypty podstawowego (*BARD1-FL*). Ponadto, dla przypadków, gdzie dostępna była tkanka nowotworowa wraz z materiałem z obrzeża guza, wykonane zostało porównanie pomiędzy ekspresją *BARD1 β* i *BARD1-FL* w obu tkankach.

2. Jasiak Anna, Koczkowska Magdalena, Stukan Maciej, Wydra Dariusz, Biernat Wojciech, Iżycka-Świeszewska Ewa, Buczkowski Kamil, Eccles Michael, Walker Logan, Wasąg Bartosz, Ratajska Magdalena. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 alternative splicing in predisposition to ovarian cancer*. Exp. Mol. Pathol.; 2023: vol. 130, art. ID 104856, s. 1-7.

Publikacja Jasiak A. et al., 2023 jest pracą oryginalną, w której opisano wyniki analizy alternatywnego składania mRNA w materiale wyizolowanym z krwi obwodowej 101 pacjentek z rakiem jajnika.

U wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania, w ramach wcześniejszej diagnostyki, wykluczono występowanie zmian germinalnych w wybranych 23 genach związanych z predyspozycją do wystąpienia choroby.

Głównym celem pracy 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*.

NIEOPUBLIKOWANA CZĘŚĆ BADAŃ

Adaptacyjna homeostaza jako możliwy niegenetyczny regulator splicingu *BRCA1/2* w raku jajnika.

Niepublikowana część badań, miała na celu wyjaśnienie podłoża obserwowanej nadekspresji *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika.

Hipoteza badawcza: Nadekspresja *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika ma podłoże niegenetyczne i jest związana z ogólnoustrojowymi zmianami w odpowiedzi na obecność nowotworu.

W celu weryfikacji powyżej postawionej hipotezy, prawidłowe komórki jądrzaste krwi hodowano *in vitro* w przygotowanym wcześniej medium kondycyjnym (medium, w którym wcześniej była hodowana linia komórkowa ludzkiego raka jajnika OVCAR-4) oraz medium kontrolnym (standardowa pożywka do hodowli komórek). Komórki zbierano w określonych punktach

czasowych, a następnie sprawdzano poziom ekspresji badanych isoform oraz wybranych enzymów regulujących zmiany epigenetyczne.

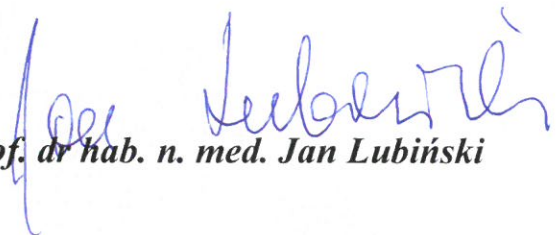
Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących obserwacji/wniosków:

1. *BARD1* β ulegał wyższej ekspresji w tkance nowotworowej w porównaniu ze zdrową tkanką, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi i może potwierdzać onkogenny charakter te izoformy.
2. W neuroblastoma, poziom ekspresji *BARD1* β nie korelował z danymi patoklinicznymi, a zatem *BARD1* β nie jest dobrym markerem progresji i/lub zaawansowania choroby.
3. Poziom *BARD1* β spadał w odpowiedzi na leczenie w dwóch przypadkach RMS, jednakże w uwagi na bardzo małą liczebność próby, należy potwierdzić tę obserwację w większej grupie pacjentów. Z uwagi na rzadkość RMS zgromadzenie reprezentatywnej grupy badanej, wymagałoby badania wieloośrodkowego.
4. Brak obecności nieprawidłowych transkryptów *BRCA1* i *BRCA2* w badanej grupie 101 pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika, wskazuje na fakt, że obecnie stosowane protokoły diagnostyczne są wystarczające dla identyfikacji większości wariantów patogennych.
5. Obecność wyższej ekspresji naturalnie występujących izoform *BRCA1* Δ *E11q*, *BRCA1* Δ *E11* i *BRCA2* Δ *E3* u pacjentek z rakiem jajnika może wskazywać na znaczenie tych izoform w procesie onkogenezy lub ich wpływu na przebieg choroby.
6. Nie wykazano wpływu czynników genetycznych promujących splicing oraz środowiska nowotworowego na wzrost ekspresji izoform *BRCA1* Δ *E11q*, *BRCA1* Δ *E11* i *BRCA2* Δ *E3*.

7. Pośrednio wykluczono wpływ wybranych czynników epigenetycznych na ekspresję izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*. Doświadczenie mające na celu sprawdzenie wpływu środowiska tworzonego przez nowotwór na ekspresję badanych izoform nie potwierdziło tego założenia.

Praca jest bardzo nowoczesna, atrakcyjna metodycznie i bardzo dobrze zrealizowana oraz opublikowana, dlatego wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Rozprawa spełnia warunki rozprawy doktorskiej określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021 r. poz. 478 ze zm.).


Prof. dr hab. n. med. Jan Lubiński