

Bydgoszcz, 8.03.2024r.

Prof dr hab. n. med. i n.o zdr Marzena Anna Lewandowska, MBA
Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik Zakładu Genetyki i Onkologii Molekularnej
Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy
lewandowskam@co.bydgoszcz.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Jasiak

pt. „Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych nowotworów człowieka”

Rozprawa pt. „Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych nowotworów człowieka” została zrealizowana pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Magdaleny Ratajskiej, oraz promotora pomocniczego dr n med. Aliny Kuźniackiej w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca była wykonana w ramach finansowania grantów z Narodowego Centrum Nauki, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Nowozelandzkiego Instytutu Badań nad Nowotworami, a wyniki badawcze były prezentowane zarówno na krajowych jak i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo WLN.5000.2023 Przewodniczącej Rady Nauk Medycznych prof. dr hab. M. Alicji Dębskiej-Ślizień z posiedzenia Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Główny nurt badań medycyny translacyjnej to min poszukiwanie nowych markerów molekularnych, pogłębiona analiza znanych markerów o głęboko intronowe warianty genetyczne oraz badania nad epigenetycznymi mechanizmami regulującymi ekspresję genów. Celem dysertacji było pogłębienie wiedzy na temat roli alternatywnego składania genów *BARD1*, *BRCA1* i *BRAC2* w wybranych nowotworach człowieka.

Prawidłowe składanie genów w dużym stopniu zależy od prawidłowego rozpoznania eksonów. Wśród elementów umożliwiających ten proces znajdują się elementy „cis” (sekwencje konserwatywne) i „trans” (snRNP, czynniki splicingu). Warianty splicingowe są powiązane z wieloma zaburzeniami genetycznymi i zwykle skutkują pominięciem eksonów, tworzą nowe alternatywne miejsca łączenia 5'i lub aktywują nowe miejsca łączenia, czego wynikiem może być zachowanie części sekwencji intronowej w wyniku zmian w miejscach dawcy/akceptora. Rola wariantów patogennych i prawdopodobnie patogennych w regulacji

składania mRNA jest jeszcze mocno niedoszacowana, gdyż wiele potencjalnych wariantów zlokalizowanych w elementach „cis” należy potwierdzić eksperymentalnie. Najczęściej wykrywane warianty splicingowe zlokalizowane są w miejscach dawcy (5') i akceptora (3'). Dużo rzadziej są identyfikowane warianty w punkcie rozgałęzienia (ang. branch point) - te są wyszukiwane i wykrywane, gdy nie wykryto żadnych zmian w sekwencjonowanych eksonach i sekwencjach UTR. Równie rzadko są identyfikowane warianty w szlaku polipirymidynowym. Technologie wysokoprzepustowe, a także tradycyjne sekwencjonowanie Sangera, pozwalają na wykrycie wielu zmian w sekwencjach intronowych i granicach intron/ekson. Jednakże ocenę, czy wariant wpływa na prawidłowe rozpoznawanie eksonu i odgrywa znaczącą rolę w procesie wycinania i składania eksonów – najczęściej przeprowadza się przy użyciu metod biologii molekularnej: transkrypcji *in vitro* lub analizy wariantu przy pomocy hybrydowego systemu minigenowego. Metody sekwencjonowania nowej generacji stworzyły nowe możliwości do rozszerzenia panelu wykrywania wariantów również w intronach, szczególnie w celach diagnostycznych.

Rozprawa doktorska Pani Anny Jasiak wpisuje się w nurt nauk podstawowych i medycyny translacyjnej, wykorzystuje w większości techniki oparte na PCR w czasie rzeczywistym. Oceniając trafność wyboru tematu rozprawy doktorskiej należy zauważyć, że temat jest unikalnym tematem badawczym łączącym zarówno wpływ czynników epigenetycznych na ekspresję izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* jak i poszukiwanie nowych czynników genetycznych promujących alternatywne składanie genów. Ponadto, praca wykonywana była na unikalnym materiale 89 przypadków nerwiaka zarodkowego, 24 nowotworów z komórek germinalnych, 7 guzów mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego oraz 101 pacjentek z rakiem jajnika.

Rozprawa doktorska jest przygotowana w nowatorskiej formie, gdzie podstawę merytoryczną stanowią niepublikowane badania własne na linii komórkowej wyprowadzanej od pacjentki z rakiem jajnika oraz dwie publikacje, wydane w uznanych międzynarodowych czasopismach o łącznym Impact Factor = 8.542 indeksowanych w bazie SCOPUS; osiągnięcie badawcze jest omówione na tle aktualnego stanu wiedzy. W związku z taką formą, przygotowana do recenzji, rozprawa wydaje się być krótsza od klasycznych rozpraw, gdyż 11 rozdziałów jest zawartych na 33 stronach wydruku komputerowego, a od strony 34 - w ostatnim 12 rozdziale - dołączone są zrecenzowane kopie manuskryptów o bogatej treści, z dobrze przygotowanymi rycinami i tabelami w zwartej formie kolumn, opublikowane przez wydawnictwo MDPI (pierwsza publikacja) i Elsevier (druga publikacja).

Prezentowana praca doktorska nie ma „klasycznych rozdziałów” jak wstęp, metodologia, wyniki czy dyskusja; niemniej jednak jej układ jest logiczny, podzielony na 12 rozdziałów, gdzie doktorantka wykazuje się wiedzą teoretyczną jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Praca doktorska rozpoczyna się spisem treści z wydzielonymi rozdziałami i podrozdziałami, z których najważniejszymi, moim zdaniem są, rozdział 7, 8 i 9: hipoteza i cele badań, omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, nieopublikowana część badań i ostatni rozdział 10 – podsumowanie.

W pierwszej części rozprawy doktorantka w bardzo zwięzły sposób (5.5 strony) przedstawia rolę alternatywnego składania genów *BARD1*, *BRCA1* i *BRCA2*. Niestety brak klasycznego wstępu literaturowego daje wrażenie, że tematyka jest dość pobieżnie opisana i brakuje lepszej aktualizacji danych literaturowych (np. rycina 1 – przedstawia szacunkową liczbę zgonów na świecie z powodu najczęstszych nowotworów – publikacja z 2018 roku; tylko 8 cytowanych artykułów naukowych - nie liczę cytowań stron internetowych jest napisanych od 2020 roku). Nie widać jasnej spójności tematu między 2 publikacjami i niepublikowanymi wynikami badań, może to być związane z faktem, że całościowa rozprawa doktorska wynika pośrednio z różnych projektów badawczych o różnych celach i różnym finansowaniu. Nie wpływa to jednak na ważność przedstawianego tematu i jego aktualność.

Dalej, doktorantka opisuje hipotezę, cel główny i doszczegóławia cele: (1) ocena poziomu ekspresji isoformy *BARD1B* w wybranych nowotworach wieku dziecięcego; (2) ocena spektrum i czystości występowania nieprawidłowych transkryptów genów *BRCA1* i *BRCA2* u pacjentek z rakiem jajnika; 3) próba identyfikacji mechanizmów prowadzących do nadekspresji *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* oraz *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek zdiagnozowanych ze sporadycznym rakiem jajnika.

O ile w dysertacji metodologia i wyniki prac są opisane bardzo pobieżnie, opis w publikacjach jest staranny i nie zostawia wątpliwości. Następnie Doktorantka konfrontuje swoje wyniki z doniesieniami literaturowymi, zdaje sobie sprawę, że niepublikowane wyniki negatywne czy zastosowany model badawczy ma ograniczenia. Nie mniej jednak głębsza analiza i szczegółowa dyskusja wyników w kontekście znaczenia alternatywnego składania mRNA w patogenezie nowotworów wieku dziecięcego czy pacjentek z rakiem jajnika człowieka – ubogaciłaby znacząco dysertację i sprawiłaby, że wyniki opublikowane i te niepublikowane stanowiłyby większą spójność.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- I. Identyfikację i potwierdzenie onkogennego charakteru izoformy *BARD1B*
- II. Obserwacja spadku poziomu ekspresji *BARD1B* w odpowiedzi na leczenie miesniakomiesaka prążkowanokomórkowego
- III. Obecność wyższej ekspresji naturalnie występujących izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* oraz *BRCA2ΔE3* u pacjentek z rakiem jajnika.

Lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Jasiak była interesująca i skłoniła mnie do zadania pytań o charakterze dyskusyjnym, z prośbą o odpowiedzi w trakcie publicznej obrony:

- 1) W jaki sposób - mając nieograniczone możliwości finansowe i sprzętowe – dziś analizowałaby Pani ocenę ekspresji *BARD1B* w komórkach nowotworowych; Proszę wyjaśnić w kontekście swoich wyników i pracy Cimmino et al „Dualistic role of *BARD1* in cancer”; Genes 2017.
- 2) Proszę Doktorantkę o skomentowanie wyników oceny ekspresji *BARD1B* (jego spadku) u pacjentów po chemioterapii. Czy od momentu publikacji „Expression of *BARD1B* isoform in selected pediatric tumors” Genes 2021 Doktorantka miała

dalszą możliwość zebrania tak ciekawego i cennego materiału przed i po chemioterapii, jaki opisała we wspomnianej publikacji i rozszerzenia badań ?

Powyższe punkty dyskusyjne wynikają jedynie z ciekawego, unikalnego tematu pracy badawczej.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do oceny rozprawa Pani Anny Jasiak pt. „Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych nowotworów człowieka” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2021r. poz.478 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani Anny Jasiak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

12388

Kierownik IFM - Zakładu Genetyki
i Onkologii Molekularnej
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Marzena A. Lewandowska
diagnosta laboratoryjny
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej

