



Warszawa, dn. 07.08.2021

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Boresowicz
pt. „ Ocena roli zaburzeń ekspresji mikroRNA oraz profilu metylacji DNA
w patogenezie gonadotropowych gruczolaków przysadki mózgowej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie. Promotorem rozprawy jest dr hab. n. med. Mateusz Bujko.

Praca napisana w języku polskim zawiera wszystkie elementy typowe dla prac doktorskich, począwszy od spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia, wprowadzenia, celu pracy oraz kopii publikacji stanowiących cykl. Pracę kończą podsumowanie wyników i wnioski. Dołączone zostało również bogate piśmiennictwo oraz zgody komisji bioetycznej na badania z wykorzystaniem tkanek ludzkich, jak również oświadczenia współautorów o ich udziale w przygotowaniu publikacji. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę, aby publikacje te stanowiły części dysertacji doktorskiej mgr inż. Joanny Boresowicz.

Rozprawa doktorska obejmuje cztery prace oryginalne, eksperymentalne, opublikowane w latach 2019 - 2021. Należy zaznaczyć, że w dwóch publikacjach mgr inż. Joanna Boresowicz jest pierwszą autorką, a w jednej jest wymieniona jako pierwszy współautor. Świadczy to o istotnym udziale Doktorantki w powstanie opublikowanych wyników. Badania były finansowane m. in. z programów „Preludium” (NCN) i „Diamantowy grant” (MNiSW), w których Doktorantka pełniła rolę kierownika projektów. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports (JCR), a na ich wysoki poziom naukowy wskazuje łączna punktacja wynosząca 420 pkt. MNiSW (według ujednoliconego wykazu z dnia 9 lutego 2021 r.) oraz 17,4 pkt. współczynnika oddziaływań Impact Factor (skorygowana wg najnowszego wykazu 2021).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy kancerogenezy i wpisuje się w zainteresowania badawcze Promotora, które skupiają się wokół zaburzeń mechanizmów epigenetycznych w patogenezie nowotworów, ze szczególnym



uwzględnieniem roli zmian w metylacji DNA. Badania te są ważne zarówno naukowo jak i społecznie, ponieważ pomimo postępu w diagnostyce i leczeniu nowotworów, wciąż nie obserwuje się przełomu, który skutkował istotnie wyższym odsetkiem wieloletnich przeżyć pacjentów.

Doktorantka w projekcie podjęła się przeprowadzenia globalnej analizy poziomu metylacji DNA oraz ekspresji mikroRNA z wykorzystaniem zaawansowanych technik wielkoskalowych w klinicznie nieczynnych gonadotropowych gruczolakach przysadki. Guzy te należą do grupy najczęściej diagnozowanych nowotworów wewnątrzczaszkowych generalnie charakteryzowanych jako zmiany łagodne. Jednak blisko połowa z nich wykazuje zdolność do naciekania sąsiednich tkanek. Istotny problem stanowi diagnostyka tych zmian. Guzy czynne hormonalnie dają szereg charakterystycznych objawów klinicznych, natomiast gruczolaki nieczynne hormonalnie, stanowiące 1/3 wszystkich gruczolaków, najczęściej nie wywołują objawów klinicznych ani zmian biochemicznych, co bardzo utrudnia ich diagnostykę. Analiza histologiczna jest standardowo używana w ocenie gruczolaków czynnych, jak i nieczynnych hormonalnie, a interwencja chirurgiczna jest najczęstszą metodą leczenia. Niestety u części pacjentów dochodzi do wznowy na skutek niepełnej resekcji, co obok inwazyjnego rozrostu guza stanowi istotny problem kliniczny. Dlatego prowadzenie badań nad zmianami epigenetycznymi w patogenezie gruczolaków przysadki może nie tylko pomóc w lepszym zrozumieniu samej biologii guza, ale również w odkryciu potencjalnych biomarkerów inwazyjnego rozrostu nieczynnych hormonalnie guzów gonadotropowych, co może umożliwić wcześniejszą ich wykrywalność i skuteczniejszą terapię.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę polegały na analizie zmian w poziomie metylacji DNA oraz ekspresji mikroRNA w klinicznie nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki, w tym w guzach o charakterze inwazyjnym. Oba mechanizmy epigenetyczne są kluczowe w regulacji ekspresji genów, a potencjalne zmiany w ich funkcjonowaniu mogą m. in. promować transformację nowotworową. Jak zaznacza Doktorantka, pomimo, że mechanizmy te są znane i badane od lat, to dopiero nowoczesne techniki pozwalają na całogenomowe profilowanie metylacji DNA i analizę ekspresji genów. Dotychczas przeprowadzonych niewiele takich badań w guzach przysadki, co świadczy o ich nowatorskim charakterze. Odwracalna metylacja DNA w obrębie regionów wzbogaconych w dwunukleotydy GpC odgrywa fundamentalną rolę w regulacji



transkrypcji. Znaczenie modulacji ekspresji genów poprzez małe, niekodujące RNA-mikroRNA w procesach kancerogenezy wielu podtypów nowotworów jest udowodnione, jednak wciąż niejasne. MikroRNA w nowotworach mogą pełnić zarówno rolę supresora, jak i onkogenu, a dodatkowo, jedno mikroRNA może regulować setki transkryptów i być zaangażowane w kontrolę ekspresji genów istotnych w wielu procesach komórkowych, w tym również innych mikroRNA.

Tematyka poszczególnych publikacji składających się na cykl obejmuje zagadnienia przedstawione w pracy jako cele szczegółowe. Badania opisane w pierwszej z załączonych prac (*The Role of Aberrant DNA Methylation in Misregulation of Gene Expression in Gonadotroph Nonfunctioning Pituitary Tumors; Cancers, 2019*) skupiają się na analizie zmian w metylacji w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki oraz identyfikacji regionów genomowych kodujących geny o nieprawidłowym poziomie metylacji oraz określeniu wpływu tych nieprawidłowości na poziom ekspresji genów. Doktorantka wskazuje, że przeprowadzone profilowanie metylacji DNA w 32 wycinkach pochodzących z nieczynnych guzów gonadotropowych oraz 5 fragmentach prawidłowej przysadki dowodzi, że tkanka nowotworowa charakteryzuje się wyższym poziomem metylacji DNA. Tutaj poproszę o pierwszy komentarz, co do liczby użytych tkanek. Czy istniał jakiś system ich doboru/wyboru do analiz? Jeśli uwzględnimy wszystkie tkanki użyte do profilowania i walidacji wyników, to zespół dysponował tkankami pobranymi łącznie od 115 pacjentów (32+83). Na jakiej zasadzie wyselekcjonowano 32 tkanki do analizy poziomu metylacji DNA? Inna uwaga dotyczy względnie niskiej liczby tkanek prawidłowych (5) włączonych do analizy. Z czego ona wynika? Czy istnieje komercyjny materiał referencyjny, który może zostać użyty jako kontrola? Dalsze analizy wskazały zależność pomiędzy metylacją DNA a ekspresją genów dla 11% nieprawidłowo metylowanych pozycji. Interesująca jest obserwacja, że w 2/3 przypadków była to korelacja negatywna, co wpisuje się w przyjęty model negatywnego wpływu metylacji DNA na transkrypcję. Czy może Doktorantka skomentować obserwowaną w 1/3 przypadków dodatnią zależność pomiędzy metylacją DNA a poziomem ekspresji, co pozostaje w opozycji do przyjętego modelu. Jak można to tłumaczyć? Czy jest to typowe i podobne zależności opisano dla innych grup nowotworów? Doktorantka wykazuje, że 2/3 genów, których ekspresja ma związek z nieprawidłową metylacją DNA, kodują białka szlaków związanych z kancerogenezą. Przeprowadzona analiza ekspresji genów w guzach przysadki i tkance



prawidłowej z użyciem wielkoskalowego sekwencjonowania RNA wykazała, że dla 4% genów istotnie zmieniona ekspresja korelowała z nieprawidłową metylacją DNA. W większości przypadków zaobserwowano obniżony poziom ekspresji i jednocześnie podwyższony poziom metylacji DNA. Wyniki otrzymane metodami wielkoskalowymi zostały zwalidowane na niezależnej grupie wycinków metodą pirosekwencjonowania oraz z zastosowaniem qRT-PCR (do oceny metylacji DNA oraz ekspresji genów, odpowiednio). Wskazano trzy hipermetylowane geny (*FAM163A*, *HIF3A* i *PRSS8*), których obniżona ekspresja nie była badana w kontekście patogenezy guzów przysadki.

W drugiej z załączonych prac (*DNA Methylation Influences miRNA Expression in Gonadotroph Pituitary Tumors, Life, 2020*) doktorantka badała wpływ różnic w poziomie metylacji genów kodujących mikroRNA na ekspresję dojrzałych cząsteczek mikroRNA w nieczynnych hormonalnie gonadotropowych guzach przysadki. Jest to rozszerzenie wcześniejszych badań z wykorzystaniem uzyskanych wcześniej danych z wysokoprzepustowego profilowania metylacji DNA w wycinkach nieczynnych hormonalnie gruczolaków i prawidłowej tkance przysadki. Jednocześnie mam uwagę dotyczącą podanej liczby analizowanych tkanek – ponieważ w poprzednich analizach wynosiła ona 32, a w tej pracy wykazuje się liczbę 34?

W blisko połowie analizowanych tkanek określono profil ekspresji mikroRNA. Uzyskane wyniki z obu analiz wskazały na korelację pomiędzy poziomem metylacji DNA a poziomem ekspresji mikroRNA w obrębie 12 genów kodujących mikroRNA. Wyniki zostały zweryfikowane dla 3 wybranych mikroRNA (*MIR145*, *MIR184*, *MIR21*) potwierdzając zależność pomiędzy metylacją a ekspresją dla trzech badanych cząsteczek mikroRNA. Wytypowanie *in silico* targetów molekularnych dla 12 cząsteczek mikroRNA wykazujących zmienioną ekspresję oraz dodatkowe analizy pozwoliły zidentyfikować 56 transkryptów mRNA kodujących peptydy, w tym białka istotne dla procesów transformacji nowotworowej. W podsumowaniu Doktorantka stwierdza, że badania te są pierwszym opisem nieprawidłowej metylacji DNA genów kodujących mikroRNA w klinicznie nieczynnych hormonalnie gonadotropowych gruczolakach przysadki.

W badaniach opisanych w trzecim z artykułów (*The search of miRNA related to invasive growth of nonfunctioning gonadotropic pituitary tumors; International Journal of Endocrinology, 2020*) Doktorantka przeprowadza analizę potencjalnej roli zmian w ekspresji mikroRNA w inwazyjnym rozroście nieczynnych hormonalnie guzów



przysadki. Badania przeprowadzono na 11 wycinkach tkankowych guzów przysadki o charakterze inwazyjnym i 9 scharakteryzowanych jako nieinwazyjne. Przeprowadzone profilowanie ekspresji mikroRNA z użyciem analizy wielkoskalowej NGS pozwoliło wytypować sześć mikroRNA jako potencjalne klasyfikatory inwazyjnego rozrostu guza. Walidacja danych na niezależnej puli próbek guzów gonadotropowych (47 - gruczolaki inwazyjne i 33 - guzy nieinwazyjne) nie potwierdziła istotnego udziału miRNA w inwazyjnym rozroście nieczynnych gonadotropowych guzów przysadki. W podsumowaniu Doktorantka stwierdza, że wyniki wskazują na brak uniwersalnego profilu ekspresji miRNA charakteryzującego guzy inwazyjne i argumentuje to faktem, że inwazyjny rozrost może być warunkowany jednocześnie wieloma różnymi czynnikami. Czy na ten (negatywny) wynik, nie ma wpływu zbyt mała (20) liczba tkanek oraz sam dobór (3 kobiety i 17 mężczyzn)? Nasuwa mi się jeszcze jedna generalna uwaga. Czy w tym i innych badaniach wykonano analizy zależności pomiędzy ekspresją genów, metylacją, a np. płcią, wiekiem pacjentów (np. podział na <45; >45 lat, czy rozmiarem guza)?

Ostatnia z prac (*Invasive and noninvasive nonfunctioning gonadotroph pituitary tumors differ in DNA methylation level of LINE-1 repetitive elements; Journal of Clinical Medicine, 2021*) opisuje przeprowadzone analizy poziomu metylacji DNA w obrębie sekwencji powtórzonych *LINE-1*. Sekwencje te stanowią blisko 1/5 ludzkiego DNA, a hipometylacja w obrębie tych elementów obserwowana jest w wielu typach nowotworów. Badanie wykonano na materiale tkankowym 80 nieczynnych gonadotropowych guzów przysadki (54 o charakterze inwazyjnym i 26 o charakterze nieinwazyjnych) oraz 5 wycinkach prawidłowej tkanki przysadki. Doktorantka wykazała, że poziom metylacji DNA w obrębie sekwencji *LINE-1* okazał się znacząco niższy w tkance nowotworowej. Dodatkowo, w próbkach guzów inwazyjnych stwierdziła istotnie niższy poziom metylacji badanych regionów niż w guzach nieinwazyjnych. Otrzymane dane wskazują, że to gorzej rokujące inwazyjne guzy przysadki charakteryzują się obniżonym poziomem metylacji DNA w obrębie sekwencji *LINE-1*. Doktorantka przeprowadziła weryfikację wyników z zastosowaniem hodowli uniesmiertelnionych komórek gonadotropowych LβT2 oraz αT3-1. Uzyskane wyniki potwierdziły negatywną korelację pomiędzy poziomem metylacji, a aktywnością retrotranspozonomową *LINE-1*.

Przedstawione do oceny prace stanowią spójny cykl oryginalnych prac, których ogólnym celem było prowadzenie badań ukierunkowanych na lepsze poznanie



molekularnych mechanizmów (de)regulujących ekspresję genów i ich roli w onkogenezie nieczynnych gonadotropowych guzów przysadki. Praca stanowi cenny wkład w prowadzone w wielu laboratoriach badania nad biologią nowotworów i poszukiwaniem markerów kancerogenezie.

Uważam, że Doktorantka poprawnie zaplanowała eksperymenty i zrealizowała badania. Z podanych informacji na końcu każdej z publikacji wynika, że Doktorantka miała wiodący wkład w opisane badania, analizy i przygotowanie manuskryptów. Doktorantka przeprowadziła analizę statystyczną uzyskanych wyników przy użyciu prawidłowo dobranych testów statystycznych. Opublikowanie oraz forma przedstawienia otrzymanych wyników i ich analiza świadczą, że Pani mgr inż. Joanna Boresowicz posiada umiejętności i wiedzę do samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią istotny wkład w badania nad zmianami epigenetycznymi w patogenezie nowotworów i mogą wesprzeć poszukiwania nowych, potencjalnych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych.

Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Boresowicz „Ocena roli zaburzeń ekspresji mikroRNA oraz profilu metylacji DNA w patogenezie gonadotropowych gruczolaków przysadki mózgowej” oraz publikacje naukowe będące jej podstawą w pełni spełniają warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Boresowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość rozprawy oraz całościowy dorobek naukowy Doktorantki w postaci publikacji naukowych i uzyskanych grantów wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

p.o. Kierownika
Zakładu Immunoematologii
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
Damian Gawel
dr hab. n. med. Damian Gawel, prof. CMKP