

Bydgoszcz, 5.10.2023 r.

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 Joanny Parady

pt. „Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem

długich niekodujących RNA (lncRNA) –

w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych”

Rozprawa pt. „Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem długich niekodujących RNA (lncRNA) – w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych” została zrealizowana w wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Magdaleny Chechlińskiej, prof. Inst. oraz promotora pomocniczego dr n. med. Łukasza Szafrona w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym oraz Studium Medycyny Molekularnej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Praca była sfinansowana ze grantu Fundacji im. Jakuba hr. Potockiego nr 103/18; grantu wewnętrzny NIO-PIB nr 05/2020 oraz grantu Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Opus nr UMO-2020/37/B/NZ5/04215, którego beneficjentem była promotor pomocniczy pracy - Pan dr Łukasz Szafron.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego – Profesora dr hab. n med. Zbigniewa Noweckiego z dnia 25.09.2023 roku, zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Instytutu w Warszawie.

Główny nurt badań medycyny translacyjnej to m. in. poszukiwanie nowych markerów molekularnych oraz epigenetycznych mechanizmów regulujących ekspresję genów związanych z karcinogenezą.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Parady wpisuje się w nurt nauk podstawowych i medycyny translacyjnej, wykorzystuje innowacyjne technologie NGS RNA—seq. Oceniając trafność wyboru tematu rozprawy doktorskiej należy zauważyć, że temat jest unikalnym tematem badawczym łączącym zarówno epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów

związanych z kancerogenezą raka jajnika, jak i poszukiwanie nowych biomarkerów genetycznych - wykonywanych na unikalnym materiale (z głęboko zamrożonymi próbkami z lat 1995 – 2008) materiału pooperacyjnego zarówno z raków nisko zróżnicowanych ($n=78$), surowiczych ($n=82$) a przede wszystkim słabo scharakteryzowanych guzów granicznych jajnika, jednocześnie bardzo dobrze scharakteryzowanej grupie badawczej pacjentek poddanych wieloletnim obserwacjom. Podjęta problematyka badawcza jest ambitna i bezprecedensowa a metoda badawcza z zastosowaniem RNA-seq na tak unikalnym materiale przyniosła pionierskie wyniki.

Prezentowana praca doktorska ma układ logiczny, podzielony na 9 rozdziałów i piśmiennictwo, gdzie konsekwentnie doktorantka wykazuje się wiedzą teoretyczną, jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Praca doktorska rozpoczyna się spisem treści, spisem rycin, spisem tabel i wykazem używanych skrótów. Umieszczone przez Autorkę streszczenie anglojęzyczne podnosi wartość recenzowanej pracy.

We wstępie pracy Doktorantka na 32 stronach bardzo szeroko opisuje zarówno biologię nowotworów i rolę mikrośrodowiska nowotworu w kancerogenezie. Niewątpliwie na ogromną uwagę zasługują podrozdziały wstępu, które wraz z ryciną 4 przedstawiają znane mechanizmy zaangażowane w patogenezę raka jajnika, jak i hipotezy badawcze (rycina 5). Dalej Doktorantka opisuje zastosowanie markerów nowotworowych, leczenie chorych na raka jajnika, aby w ostatniej części skupić się szczegółowo na najważniejszych ścieżkach sygnalizacyjnych i roli onkogennej, jak również supresorowej długiego niekodującego RNA w onkogenezie. Podsumowując wstęp – jest bardzo rzetelnym opracowaniem znakomicie wprowadzającym czytelnika do dalszej części dysertacji.

Doktorantka mgr Joanna Parada przedstawiła jasne cele pracy: zaplanowała 5 zadań badawczych, które można poszeregować jako: (I) identyfikację transkryptów, w tym lncRNA, (II) funkcjonalną klasyfikację genów o ekspresji zróżnicowanej w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych, (III) analizę ontologiczną, (IV) określenie różnic i podobieństw na poziomie mRNA pomiędzy rakiem jajnika a guzami granicznymi jajnika, (V) wykrycie wariantów genetycznych w rakach i guzach granicznych jajnika.

Materiały i metody zostały potraktowane rzetelnie. Jest to szczególnie istotne, gdyż niektóre narzędzia bioinformatyczne, zostały opracowane względnie niedawno przez promotora pomocniczego – dr Łukasza Szafrona i Doktorantka wraz z autorem oprogramowania dzieli się wynikami i umożliwia pobranie na stronie GitHub.

Wyniki: pragnę podkreślić, że jestem pod ogromnym wrażeniem tak dobrego warsztatu badawczego doktorantki i długofalowego planowania pracy badawczej przez promotorów doktorantki: od materiału klinicznego po analizę profilu ekspresji genów, analizę ontologiczną w kontekście całkowitej remisji, w kontekście czasu wolnego od choroby, kontekście całkowitego przeżycia (OS); analizy ontologii genów w kontekście wrażliwości na leczenie czy analizy ontologii genów guzów granicznych. W dalszej części analizy wyników - Doktorantka zidentyfikowała potencjalne czynniki prognostyczne i predykcyjne dla raka jajnika. Przykładem może być podwyższona ekspresja LINC00937, która zmniejsza ryzyko zgonu pacjentek z rakiem jajnika bez mutacji TP53, leczonych w schemacie taksany

i cisplatyna. Innym biomarkerem - negatywnym czynnikiem prognostycznym jest nadekspresja FZD4. Pani mgr Joannie Paradzie - gratuluje! Ilość uzyskanych danych, w tym identyfikacja ok. 18 tys. zmian o silnym lub pośrednim wpływie na funkcje kodowanych białek w raku jajnika, i ponad 3 tys. zmian genetycznych w guzach granicznych wskazuje na możliwość określenia w przyszłości potencjalnych biomarkerów bądź celów terapeutycznych.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- I. Identyfikację 10 genów, których poziom ekspresji koreluje z wartością niezależnych czynników prognostycznych lub predykcyjnych, w tym identyfikacja lncRNA LINC00937
- II. Potwierdzenie wyników NG RNA-seq z przeprowadzoną analizą ekspresji metodą qRT-PCR
- III. Identyfikacja 18634 i 3156 wariantów genetycznych w komórkach raka jajnika i guza granicznego jajnika, wcześniej nie opisywanych o silnym lub pośrednim wpływie na strukturę i funkcje kodowanych białek
- IV. Identyfikacja lncRNA związanego z rakiem jajnika: LINC01876 oraz LINC02301

Dyskusja zawiera wnikliwą analizę uzyskanych przez Doktorantkę wyników wraz z wynikami innych badaczy. Ponadto, Doktorantka w sposób bardzo dojrzały wskazuje również plany na przeprowadzenie nowych badań - przestrzennej analizy ekspresji genów na poziomie komórkowym. W 9 rozdziale – Doktorantka formułuje właściwe wnioski. Całość pracy zamyka bibliografia - 168 pozycji literaturowych.

Tekst rozprawy został napisany poprawnie, ale w kilku fragmentach należałoby przygotować korektę językową w związku z drobnymi niedociągnięciami edytorskimi:

- Str.1-35 brak numeracji stron
- Spis rycin i spis tabel - nieczytelny; odstęp pomiędzy poszczególnymi rycinami (tak jak w spisie treści - istnieje odstęp między rozdziałami i podrozdziałami) czy tabelami znacząco by zwiększył czytelność i ułatwił szukanie właściwej ryciny.
- Rycina 11 – mało wyraźna, zbyt mała czcionka; powiększenie ryciny zwiększyłoby czytelność i zrozumiałość środkowej części.
- Str. 161 *CD200 (CD200 Molecule)* powinno być przesunięte na następną stronę
- Str. 197 brak pełnego piśmiennictwa

Lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Parady była bardzo interesująca, nowatorska i intrygująca, skłoniła mnie do zadania pytań o charakterze dyskusyjnym, z prośbą o odpowiedzi w trakcie publicznej obrony:

- 1) Która strategia jest zdaniem Doktorantki ciekawsza i dlaczego: analiza funkcjonalna trójwymiarowej organizacji genomu w jądrze komórki raka jajnika czy analizie funkcjonalna konkretnych nowo zidentyfikowanych genów.
 - 2) Które geny Doktorantka chciałaby zbadać w pierwszej kolejności pod kątem funkcjonalności jako pierwsze i dlaczego?
- 

- 3) Proszę Doktorantkę o skomentowanie możliwości wykorzystania zidentyfikowanych lncRNA w diagnostyce genetycznej, w tym również możliwości płynnej biopsji.

Powyższe punkty dyskusyjne wynikają jedynie z ciekawego, unikalnego i pionierskiego w Polsce tematu pracy badawczej oraz wnikliwej analizy rozprawy doktorskiej a drobne poprawki stylistyczne w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć naukowych zaprezentowanych przez Doktorantkę.

Podsumowując swoją opinię o rozprawie doktorskiej, chciałabym jednoznacznie stwierdzić, że wybitnie oceniam jej poziom naukowy, a przedstawione wyniki prac w rozprawie wraz z 2 opublikowanymi artykułami przez doktorantkę w Plos one nie tylko znacząco poszerzają wiedzę, ale mają znaczenie aplikacyjne - pozwalają przewidzieć rokowanie lub odpowiedź na leczenie.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do oceny rozprawa mgr Joanny Parady pt. „Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem długich niekodujących RNA (lncRNA) – w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Joanny Parady do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. W związku wysoką wartością merytoryczną pracy, bogactwem uzyskanych istotnych wyników oraz możliwościami aplikacyjnymi, ponadto biorąc po uwagę dorobek naukowy doktorantki Pani mgr Joanny Parady wnioskuję o jej wyróżnienie.

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