

Gdańsk, 5 października 2023 roku

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Parada zatytułowanej
„Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem długich niekodujących
RNA (lncRNA) – w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych”.

Rak jajnika to jeden z najczęstszych nowotworów występujących u kobiet. Nowotwór ten niezmiennie jest częstą przyczyną śmierci pacjentek pomimo, że pięcioletni względny wskaźnik przeżywalności wzrósł na przestrzeni ostatnich lat. Guzy jajnika zazwyczaj rozwijają się bezobjawowo, nadal są trudne do zdiagnozowania i wykazują pierwotną lub wtórną oporność na konwencjonalną chemioterapię. Dlatego też, tak wiele badań koncentruje się na poszukiwaniu nowych biomarkerów, które pozwoliłyby nie tylko na skuteczną diagnostykę ale również efektywne leczenie i monitorowanie tej grupy chorych.

Zatem wykorzystanie nowoczesnych, wysokoprzepustowych analiz molekularnych pozwalających na ocenę ekspresji genów oraz identyfikację wariantów genetycznych w komórkach nowotworowych jest jak najbardziej zasadne i może pozwolić na identyfikację nowych markerów molekularnych o znaczeniu zarówno prognostycznym jak i predykcyjnym w grupie chorych na raka jajnika.

Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Joanny Parada jest bardzo obszerna, Składa się z 201 stron i zawiera wykaz stosowanych skrótów, wstęp, opis celów pracy, materiału i metodyki, uzyskanych wyników, a także dyskusję i wnioski. Ponadto, w pracy zawarto streszczenia zarówno w języku polskim jak i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa, które liczy 225 pozycji i obejmuje prace opublikowane w ostatnich latach. W tekście znajdują się liczne ryciny i tabele, których jest odpowiednio 38 i 35. W pracy przedstawiono również informacje o źródłach finansowania badań. Analizy zostały przeprowadzone dzięki środkom pozyskanym zarówno ze źródeł wewnętrznych Jednostki (NIO-PIB) jak i zewnętrznych (NCN, Fundacja im. Jakuba hr. Potockiego).

We wstępie pracy Autorka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące roli komórek mikrośrodowiska i ich roli w kancerogenezie oraz epidemiologii, etiologii, klasyfikacji kliniczno-patologicznej raka jajnika, a także markerów nowotworowych wykorzystywanych do diagnostyki tego nowotworu. W sposób szczegółowy mgr Joanna Parada opisała obowiązujące schematy leczenia chorych na raka jajnika. Autorka przedstawiła również informacje dotyczące ścieżek sygnalizacyjnych związanych z patogenezą raka jajnika i przerzutami tego nowotworu, a także długich

niekodujących RNA o działaniu onkogennym. Wstęp zamyka rozdział poświęcony technice sekwencjonowania kolejnej generacji oraz jej wykorzystaniu w diagnostyce.

Celem badań mgr Joanny Parada była analiza transkryptomów raków jajnika, oraz ocena potencjalnej przydatności charakterystyki transkryptów w diagnostyce i leczeniu chorych na raka jajnika. W pracy przedstawiono pięć celów szczegółowych, które obejmowały między innymi identyfikację transkryptów, których zmieniona ekspresja ma wpływ na parametry kliniczno-patologiczne raka jajnika, funkcjonalną klasyfikację genów o ekspresji zróżnicowanej w zależności od parametrów klinicznych i patologicznych, czy też określenie różnic i podobieństw transkryptomów raków jajnika i guzów granicznych. Do badań użyto świeżo mrożone skrawki pierwotnego raka jajnika oraz guzów granicznych pobranych w trakcie operacji od uprzednio nieleczonych chorych. Pacjentki otrzymywały następnie chemioterapię w schemacie: taksany/platyna (76%) lub platyna/cyklofosfamid (24%). Materiał został zgromadzony w latach 1995-2008, na podstawie zgody stosownej komisji bioetycznej. W pracy została przedstawiona szczegółowa charakterystyka kliniczna pacjentek oraz histologiczna badanych guzów obejmująca stopień zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histologicznego, a także typ histologiczny. Należy zauważyć, że wszystkie przypadki raka jajnika zostały scharakteryzowane również pod względem wielkości choroby resztkowej, statusu TP53, odpowiedzi na leczenie oraz czasu przeżycia. Natomiast guzy graniczne scharakteryzowano uwzględniając obecność mikroinwazji, wznowy oraz minimalnego czasu wolnego od nawrotu choroby, leczenie chemioterapią, a także status guza (guz pierwotny lub wznowa).

Do badań molekularnych zakwalifikowano 148 raków jajnika (niskozróżnicowanych, surowicze: 82%) oraz 17 guzów granicznych. Wyizolowano RNA i przeprowadzono analizę jakościową i ilościową uzyskanego materiału. Następnie przygotowano biblioteki, które we współpracy z Zakładem Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego zsekwencjonowano przy użyciu sekwenatora NovaSeq 6000 (Illumina) będącym na wyposażeniu Centrum Nowych Technologii (CeNT) UW. Kolejny etap badań polegał na wykonaniu szeregu analiz bioinformatycznych przy użyciu specjalistycznego oprogramowania, co pozwoliło na analizę nie tylko ekspresji poszczególnych genów ale również na identyfikację ewentualnych wariantów genetycznych. Ostatni etap stanowiły analizy statystyczne i wizualizacja danych w celu zidentyfikowania genów, których częstość zmian sekwencji różniła się znacząco między badanymi podgrupami o różnym statusie całkowitego przeżycia (OS), czasu wolnego od choroby (DFS), całkowitej remisji (CR) i wrażliwości na leczenie (PS) w przypadku raków, oraz minimalnego czasu wolnego od nawrotu choroby (RFS) i obecnością lub brakiem mikroinwazji i wszczepów inwazyjnych w przypadku guzów granicznych. Przeanalizowano również wykryte

warianty genetyczne i ich wpływ na strukturę i funkcje białek. Przy użyciu RT-qPCR zweryfikowano wyniki ekspresji uzyskane za pomocą techniki NGS.

Przeprowadzone analizy wykazały między innymi, że guzy o tym samym typie histopatologicznym i stopniu zróżnicowania histologicznego wykazują duże różnice w poziomach ekspresji genów. Obserwowana jest zatem duża heterogenność raków jajnika na poziomie molekularnym. Natomiast analiza 20 genów o najbardziej zróżnicowanej ekspresji zarówno w całej badanej grupie jak i poszczególnych podgrupach, uwzględniających typ terapii i obecność wariantu w genie *TP53*, wykazała silnie zróżnicowaną ekspresję wielu genów, o dotychczas nieznannej funkcji. Zaobserwowano również istotny wpływ mutacji *TP53* na poziom ekspresji badanych genów. W badaniu wykazano również związek pomiędzy ekspresją genów a prawdopodobieństwem całkowitej remisji lub ryzykiem zgonu pacjentek z rakiem jajnika. Natomiast analiza przeżycia z wykorzystaniem wieloczynnikowego modelu regresji Coxa, która uwzględniała zmienne niezależne (poziom ekspresji genu, typ i stopień zróżnicowania histologicznego, chorobę resztkową) oraz zmienne grupujące (status *TP53* i rodzaj chemioterapii) wykazały, że ekspresja genów *GRM8*, *LINC00937*, *L1CAM*, *SCN7A*, *GABRG3*, *PTPRM*, *CGREF1*, *PPP4R4*, *CD200*, *FZD4* ma znaczenie prognostyczne i/lub predykcyjne w rakach jajnika. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że w rakach jajnika w większej liczbie genów występują warianty genetyczne w porównaniu do guzów granicznych. Wśród tych wariantów wykryto dotychczas nieopisane zmiany, które mogą wpływać na strukturę i funkcje białek. Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu techniki RNA-Seq oraz RT-qPCR wykazało korelację poziomów ekspresji badanych genów, co potwierdziło wiarygodność przeprowadzonych analiz molekularnych.

Wyniki swoich badań mgr Joanna Parada analizowała szeroko w oparciu o wykorzystane przez siebie piśmiennictwo. Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie siedmiu wniosków. Reasumując, uzyskano wiele interesujących wyników które stanowią nowe informacje dotyczące podłoża molekularnego raków jajnika i raków granicznych. Dalsze analizy uzyskanych danych oraz kolejne badania być może pozwolą na identyfikację nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, które mogłyby być wykorzystane do rutynowej diagnostyki, leczenia oraz monitorowania chorych na raka jajnika. Uzyskane wyniki powinny też stanowić podstawę do opracowania prac, które zostaną opublikowane w pismach o zasięgu międzynarodowym.

Przedstawiona do recenzji praca posiada jednak kilka ograniczeń, o których należy wspomnieć:

1. W opinii recenzenta dwa podrozdziały: 1.1. Rola mikrośrodowiska nowotworu w kancerogenezie oraz 1.2. Komórki mikrośrodowiska nowotworu są zbędne, gdyż nie są bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej oraz

przeprowadzonymi badaniami. W niniejszej pracy, do analiz wykorzystano RNA wyizolowany z komórek niskozróżnicowanych, surowiczych raków jajnika oraz guzów granicznych. Nie przeprowadzono mikrodysekcji, co pozwoliłoby na wyselekcjonowanie i bezpośrednią analizę komórek mikrośrodowiska. Zatem z założenia, dotychczas uzyskane wyniki pozwalają na analizę ekspresji genów oraz identyfikację wariantów genetycznych charakterystycznych dla komórek nowotworowych.

2. Niezasadne jest również przedstawianie w treści rozprawy dalszych planów naukowych. Badania polegające na przestrzennej analizie ekspresji genów na poziomie komórkowym, za pomocą metody *Visium Spatial Gene Expression* z wykorzystaniem sekwenatorów nanoporowych bez wątpienia są interesujące i mogą pozwolić na uzyskanie wielu interesujących wyników. Natomiast informacja o planach naukowych w żaden sposób nie może wpływać na ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej.
3. Liczba oraz zakres przeprowadzonych badań i analiz jest imponujący. Wykorzystano zarówno zaawansowane techniki biologii molekularnej jak i przeprowadzono szereg złożonych analiz bioinformatycznych i statystycznych. W tekście brakuje szczegółowej informacji w jakie aktywności naukowe była bezpośrednio zaangażowana mgr Joanna Parada. Nie sądzę aby ta informacja miała negatywny wpływ na ostateczną ocenę rozprawy doktorskiej. Obecnie wiele projektów naukowych, ze względu na opisaną złożoność, prowadzonych jest w wieloosobowych zespołach.
4. Wiele analiz zostało przeprowadzonych z uwzględnieniem „statusu mutacji typu missense w genie *TP53*”. Informacja ta jest zatem kluczowa. W pracy nie znajduję jednak listy oraz zapisu wariantów w genie *TP53*, które zostały zidentyfikowane w analizowanej grupie chorych. Jakże to były warianty, w jaki sposób zostały sklasyfikowane? Czy były to tylko warianty patogenne oraz prawdopodobnie patogenne?
5. Przeprowadzone badania wykazały obecność w rakach i guzach granicznych jajnika odpowiednio: 18634 i 3156 wariantów genetycznych, które zostały określone przez Autorkę jako dotychczas nieopisywane i o silnym lub pośrednim wpływie na strukturę i funkcje kodowanych białek. Nie przedstawiono jednak listy zidentyfikowanych wariantów oraz raz jeszcze sposobu klasyfikacji tych wariantów. Należy przypuszczać, że zdecydowaną większość z tej ogromnej liczby zmian będą stanowiły warianty, które jednak nie będą miały patogenicznego znaczenia.

Pozostałe uwagi mają charakter uwag edytorskich.

1. Różnica w udziale procentowym raków niskozróżnicowanych i surowiczych. W Streszczeniu przedstawiono następującą informację: „Badania opisane w niniejszej pracy objęły dużą grupę dokładnie scharakteryzowanych próbek raków jajnika (N=148, 78% raki nisko zróżnicowane, 82% surowicze) oraz guzów granicznych jajnika (N=17), od pacjentek poddanych wieloletniej obserwacji.” natomiast w rozdziale 3.1.1. Materiał kliniczny: „Łącznie przebadano 148 przypadków raka jajnika (nisko zróżnicowane surowicze 82%) i 17 guzów granicznych (N=165).”
2. Duża liczba rycin i tabel umieszczonych w głównym tekście rozprawy doktorskiej. Część z nich, np. wykres elektroforetycznego rozdziału RNA, jakość bibliotek do sekwencjonowania nowej generacji, zbiorcza jakość odczytów jest zbędna lub mogłaby zostać umieszczona jako informacja dodatkowa.
3. W tabelach nazwy genów nie są pisane kursywą.

Te krytyczne uwagi nie wpływają jednak znacznie na ostateczną, pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Joanny Parada. Zastosowana metodyka była prawidłowa i pozwoliła na realizację zadań badawczych przedstawionych w rozprawie a uzyskane wyniki należy uznać za wartościowe i oryginalne. Mam nadzieję, że wartość tych wyników zostanie potwierdzona publikacjami w pismach o zasięgu międzynarodowym.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Joanny Parada oceniam pozytywnie. Praca spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Niniejszym wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Uszy

