

Warszawa, 06.05.2020 r.

dr hab. Elżbieta Sarnowska
Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej
Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy
Ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej pt. „Rola microRNA MIR-25-3P w regulacji wybranych procesów związanych z progresją raka nerkowokomórkowego typu jasnokomórkowego u człowieka”.

Autorka: mgr Katarzyna Maria Głuchowska

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie dlatego są istotnym problemem cywilizacyjnym. Badania prowadzące do zrozumienia mechanizmów prowadzących do powstania nowotworów pomogą nie tylko zapobiegać ale także skutecznie leczyć chorobę nowotworową. Jasnokomórkowy rak nerki (ccRCC) jest najczęściej występującym podtypem nowotworu nerki występującego u osób dorosłych. Nowotwór ten rozwija się nie tylko u ludzi starszych ale także u osób w młodym wieku. U podstaw tej choroby leżą różnorodne zaburzenia genetyczne, z których najczęściej występujące to mutacje w genach *VHL*, *PBRMI* i *BAP1*. Jednakże w ostatnich latach coraz więcej doniesień naukowych potwierdza ważną rolę microRNA w procesie powstawania i rozwoju wielu typów nowotworów włączając w to jasnokomórkowego raka nerki. W związku z tym lepsze poznanie mechanizmu będącego przyczyną zaburzeń MIR-25-3p obserwowanych w jasnokomórkowym raku nerki a także zrozumienie potencjalnej zależności pomiędzy ilością

tego microRNA a transkryptami, które może regulować jest zagadnieniem bardzo istotnym i doskonale wpisuje się w obecne trendy badań nad jasnokomórkowym rakiem nerki.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była analiza wpływu zaburzeń ekspresji microRNA MIR-25-3p na ekspresję genów związanych z adhezją oraz określenie jak te zmiany wpływają na procesy migracji, adhezji, inwazji a także proliferację, żywotność i zdolność do wzrostu klonalnego.

Przedstawiona praca składa się ze standardowych części. W pracy szczególną uwagę zwraca przejrzystość napisany wstęp bardzo dobrze wyjaśniający podjęte zagadnienia, czytelnie przedstawione cele naukowe, opis materiałów i metod użytych w pracy doświadczalnej, opracowanie wyników przeprowadzonych doświadczeń oraz obszerną dyskusję i bibliografię przedstawiającą 322 pozycje literaturowe. W pracy ponadto znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim a także wykaz skrótów, które są bardzo pomocne podczas czytania pracy. Praca napisana jest w sposób interesujący i zawiera wystarczające informacje, które umożliwiają ocenę dokonań Doktorantki oraz wagę prowadzonych przez nią badań. Zarówno układ pracy jak i ujęte w niej dane literaturowe oraz informacje i oświadczenia spełniają wszelkie wymogi formalne i są zgodne z art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882).

W pracy Doktorantka przeanalizowała ekspresję MIR-25-3p w różnych liniach komórkowych ccRCC. Do dalszych analiz wybrała dwie linie komórkowe CAKI-2 i KIJ265T ze względu na skrajnie różną ekspresję badanego microRNA. W tych liniach Doktorantka wyindukowała nadekspresję MIR-25-3p oraz zahamowanie jego ekspresji i przeprowadziła analizę ekspresji genów związanych z adhezją takich jak: *ITGA5*, *COL5A1*, *MMP16* w linii

CAKI-2 oraz *COL11A1* w linii KIJ265T. Doktorantka wykazała, że ekspresja MIR-25-3p wpływa na obniżenie ekspresji genów *COL5A1*, *COL11A1* i *ITGA5*, natomiast zahamowanie ekspresji MIR-25-3p powodowało wzrost ekspresji tych genów. Następnie Doktorantka przeanalizowała ilość białek COL5A i ITGA5 w liniach z nadekspresją i brakiem ekspresji MIR-25-3p. W obu przypadkach zaobserwowano zmniejszenie ilości białka w linii z nadekspresją MIR-25-3p oraz zwiększenie w linii z zahamowaną ekspresją MIR-25-3p. W celu zweryfikowania uzyskanych wyników Doktorantka przeanalizowała ilość białek COL5A1 i ITGA5 w próbkach klinicznych od pacjentów z rozpoznaniem ccRCC oraz wysoką ekspresją MIR-25-3p. Co ciekawe, w przypadku COL5A1 Doktorantka zaobserwowała brak ekspresji tego białka w guzie, co było spójne z badaniem przeprowadzonym na linii komórkowej, natomiast w przypadku ITGA5 wykazała zwiększoną ilość białka w próbkach guza w porównaniu z tkanką zdrową. **W związku z tym bardzo proszę Doktorantkę o wytłumaczenie rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem linii komórkowych i materiału od pacjentów.**

W dalszej części pracy Doktorantka wykazała, przy użyciu systemu reporterowego z wykorzystaniem lucyferazy, że MIR-25-3p wpływa na ekspresję białka poprzez wiązanie się z elementami znajdującymi się w regionie niekodującym na 3' końcu w mRNA tzw. 3'UTR. Zależność ta została potwierdzona dla wszystkich badanych genów. Następnie Doktorantka udowodniła, że ekspresja MIR-25-3p ma wpływ na adhezję, migrację, proliferację i żywotność komórek nowotworowych. Doktorantka wykazała, że zwiększona ekspresja MIR-25-3p zwiększa o 6% ilość komórek aktywnych metabolicznie natomiast zahamowanie jego ekspresji zmniejsza ilość komórek aktywnych metabolicznie o 5%. **W związku z tym proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, czy tak niewielkie zwiększenie żywotności komórek nowotworowych w kontekście guza nowotworowego może mieć biologiczne i kliniczne znaczenie.**

Praca napisana jest poprawnym językiem, świadczącym o dojrzałości zawodowej Doktorantki, jakkolwiek nie ustrzegła się ona nielicznych literówek, powtórzeń i sformułowań potocznie używanych w laboratorium lub wynikających z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego. Dodatkowo, w moim odczuciu dyskusja jest zbyt długa. Doktorantka zbyt szczegółowo opisuje niektóre zagadnienia, niezwiązane bezpośrednio z wynikami, co powoduje brak zogniskowania i utrudnia czytelnikowi śledzenie głównego przekazu pracy. Niektóre fragmenty dyskusji pasują bardziej do wstępu. Ponadto, w dyskusji w niektórych fragmentach są pewne niespójności np. z opisu wynika, że próbki od pacjentów, które Doktorantka przeanalizowała charakteryzowały się wysoką ekspresją MIR-25-3p oraz wysoką ekspresją transkryptu *COL5A1*, jednak, badania przeprowadzone na linii komórkowej z nadekspresją MIR-25-3p wykazały znaczące zmniejszenie ilości tego transkryptu. Doktorantka, nie przedyskutowała tej rozbieżności. **W związku z tym, bardzo proszę Doktorantkę, aby wytłumaczyła jakie mogą być tego przyczyny.**

Podsumowując uważam, że mgr Katarzyna Maria Głuchowska osiągnęła stawiane sobie cele naukowe. Wyniki prac doświadczalnych ujęte w rozprawie umożliwiły wyciągnięcie wniosku, że microRNA MIR-25-3p odgrywa istotną rolę w rozwoju i progresji jasnokomórkowego raka nerki a przedstawiona w pracy dyskusja w bardzo dobry sposób naświetla dalsze drogi prowadzenia badań w tej dziedzinie nauki. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie mgr Katarzyna Maria Głuchowska do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
PRACOWNI ORGANIZACJI CHROMATYNY
Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej
Elżbieta Sarnowska
dr n. med. Elżbieta Sarnowska
prof. Instytutu