

Poznań, 22 maja 2025

Prof. dr hab. Piotr Kozłowski

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Staszak

Powiązania pomiędzy retrogenami i nowotworami – kontekst ewolucyjny

Praca doktorska została wykonana na Wydziale Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Makałowskiej, promotora rozprawy.

Rozprawa doktorska ma charakter monografii. Głównym celem a tym samym przedmiotem pracy doktorskiej był związek retrogenów z nowotworami, który to związek był identyfikowany głównie poprzez ekspresję różnicową retrogenów w różnych typach nowotworów człowieka i innych kręgowców oraz w różnych podtypach klinicznych raka. Praca doktorska oparta była głównie na analizach zewnętrznych onkogenomicznych danych ekspresyjnych oraz klinicznych, których wybrane wyniki zostały potwierdzone i uzupełniane własnymi eksperymentalnymi analizami molekularnymi. Praca jest bardzo interesująca i zdecydowanie oryginalna. Nie przypominam sobie innych kompleksowych analiz retrogenów w kontekście nowotworzenia.

Rozprawa ma tradycyjny charakter, składa się z następujących części stanowiących jednocześnie główne rozdziały: (i) Wstęp, (ii) Cel pracy, (iii) Materiały i metody, (iv) Wyniki, (v) Dyskusja, (vi) Wnioski i (vii) Literatura. Dodatkowo rozprawa uzupełniona jest streszczeniem w języku polskim i angielski oraz szeregiem technicznych rozdziałów, tj., spis treści, spisy skrótów, tabel i rycin. Rozprawa uzupełniona jest Aneksiem, zawierającym tabele ze szczegółowymi wynikami przeprowadzonych analiz. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami są odpowiednia a ich rozmiar uzasadniony zawartością.

W skrócie:

(ad. i) Wstęp dobrze wprowadza w zagadnienia rozprawy doktorskiej, w tym charakterystykę, mechanizmy powstawania oraz ewolucję retrogenów, oraz powiązanie retrogenów z procesem nowotworzenia, jak również stan wiedzy na ten temat. Z lektury wstępu jasno wynika uzasadnienie do podjęcia badań, które jest przekonujące. Warto odnotowania są starannie przygotowane i informatywne ryciny, których koncepcja merytoryczna i wizualna w znacznym stopniu powstała przy okazji przygotowywanego wcześniej artykułu przeglądowego. Nie dopatrzyłem się w tym rozdziale żadnych poważnych

błędów. Jedynym elementem, którego mi trochę brakowało w trakcie lektury późniejszych rozdziałów, a który mógłby ciekawie uzupełnić wprowadzenie, jest zagadnienie i kryteria identyfikacji retrogenów w genomie. Np. na jakiej zasadzie były identyfikowane i kwalifikowane retrogeny do bazy danych RetrogeneDB, przygotowanej wcześniej w zespole przez Rosikiewicz i Makałowską, a która została wykorzystana jako źródło i podstawa adnotacji retrogenów w tej pracy. W skrócie, w jaki sposób odróżnić retrogen od „normalnego” genu, poza tym, że retrogeny częściej mają strukturę jednoeksonową.

(ad. ii) Cel pracy, jest jasny i dobrze uzasadniony, jasno wynika z poprzedniego rozdziału. Poza celem głównym/ogólnym w części tej zostały zdefiniowane 4 cele szczegółowe, sformułowane jako hipotezy badawcze, które konsekwentnie były weryfikowane w pracy.

(ad. iii) W rozdziale Materiały i metody zostały skrupulatnie opisane wszystkie obliczeniowe i eksperymentalne/molekularne metody użyte w pracy doktorskiej. Dodatkowo w tej części zostały opisane i scharakteryzowane wszystkie zasoby wykorzystane w pracy, w tym ekspresyjne dane RNA-seq z bazy NCBI SRA oraz zestawy danych onkogenomicznych TCGA, jak również źródła adnotacji retrogenów, RetrogeneDB2 i Ensembl. Nie dopatrzyłem się w tej części, żadnych poważnych błędów.

(ad. iv) Wyniki obejmują szereg analiz danych zewnętrznych oraz uzupełniających i potwierdzających je wyników eksperymentalnych. (a) Pierwszą, a jednocześnie zasadniczą analizą była identyfikacja retrogenów ulegających zróżnicowanej ekspresji w tkankach raka w porównaniu do odpowiadających im tkanek nienowotworowych. Analiza ta została przeprowadzona z wykorzystaniem setek wyselekcjonowanych danych RNA-seq, pobranych z bazy danych NCBI SRA oraz zestawów danych dla 8 typów nowotworów wygenerowanych w ramach projektu TCGA. Analiza ta została poprzedzona odpowiednią selekcją najbardziej informatywnych retrogenów oraz wykluczeniem „odstających” próbek, które mogłyby zakłócić analizę, wprowadzając nadmiarową zmienność, a tym samym obniżając moc statystyczną eksperymentów. W wyniku analizy danych NCBI SRA i TCGA zostało zidentyfikowanych odpowiednio 33 i 119 retrogenów wykazujących zróżnicowaną ekspresję, przy czym, na co warto zwrócić uwagę, listy tych genów znacząco się pokrywały ($n=20$), co jest silnym dowodem na prawdziwość wyników. Wśród genów występujących w obu zestawach i wykazujących ten sam kierunek zmiany ekspresji były, CALM5 i RHOB, które obok genu HSPA2 (wykrytemu tylko w TCGA) były najczęściej identyfikowane w różnych, niezależnych analizach w tej pracy, co wzajemnie potwierdza uzyskiwane wyniki, również pod względem technicznym, i wskazuje, że te trzy geny są najpewniejszymi (najrzetelniej udokumentowanymi) retrogenami zidentyfikowanymi w tej pracy. Jestem ciekawy, czy intuicyjnie obserwowana nadreprezentacja retrogenów wykrytych w zestawie NCBI SRA i TCGA jest istotna statystycznie i jaki jest stopień tego wzbogacenia. (b) W kolejnych analizach doktorantka, w podobny sposób zidentyfikowała retrogeny różnicujące w nowotworach innych kręgowców, psa i kury, oraz retrogeny różnicujące różne podtypy i stopnie złośliwości nowotworów. Odnośnie do wszystkich analiz zróżnicowanej ekspresji trochę brakowało mi wizualizacji uzyskanych wyników w formie tzw. volcano plot,

pozwalających na wizualizację genów różnicujących na tle zmian nieistotnych czy globalnych trendów zmiany kierunku ekspresji. (c) Ważnym elementem pracy było, wykazanie, że ogromna większość retrogenów o zróżnicowanej ekspresji, zarówno tych wykrytych w analizie danych NCBI SRA, jak i TCGA, to retrogeny bardzo młode, powstały na etapie ewolucji naczelnych albo nawet na etapie ewolucji człowieka. Ciekawy byłbym spekulacji na temat, w jakim stopniu obserwowana nadreprezentacja młodych retrogenów może wynikać z ich ogólnej częstości w poszczególnych „grupach ewolucyjnych”, lub czy może wynikać z różnego poziomu ekspresji starszych i młodszych retrogenów. Gdyby młodsze retrogeny wykazywały ogólnie wyższy poziom ekspresji, mogłoby to im dawać większą moc statystyczną, do bycia wykrytymi jako zróżnicowane. (d) W pracy wykonano też szereg analiz eksperymentalnych, obejmującą walidację najmłodszych i najstarszych ewolucyjnie retrogenów o zmienionej ekspresji w nowotworach, wpływu retrogenów na poziom genów rodzicielskich, oraz wpływu retrogenów na żywotność komórek nowotworowych. (e) W ostatniej części doktorantka przeprowadziła analizę retrogenów w trakcie różnicowania łożyska i wykazała, że wiele retrogenów różnicujących w trakcie rozwoju łożyska pokrywa się z retrogenami różnicującymi w procesie nowotworzenia.

(ad. v) Dyskusja, została przedstawiona z zachowaniem właściwych proporcji. Doktorantka prawidłowo przedstawiła w tym rozdziale podsumowanie najważniejszych wyników. Najciekawszą dla mnie częścią była dyskusja i powiązanie uzyskanych wyników z dotychczasową wiedzą na temat 3 wspomnianych wcześniej retrogenów CALM5, RHOB i HSPA2. Spójność uzyskanych wyników z wcześniejszą wiedzą potwierdza rolę tych retrogenów w nowotworzeniu, a tym samym uprawdopodabnia poprawność wszystkich wyników. Nie dopatrzyłem się w Dyskusji, żadnych nadinterpretacji.

Poza kwestiami zgłoszonymi powyżej chciałbym, żeby doktorantka odniosła się w trakcie obrony do następujących pytań/zagadnień: (i) Często dowodem na rolę jakiegoś genu w nowotworzeniu jest obserwacja w tym genie czy jego regionie somatycznych mutacji, mutacji utraty funkcji czy delecji w przypadku genów supresorowych, czy mutacji aktywujących/amplifikacji w przypadku onkogenów. Czy istnieją jakieś informacje na temat nowotworowych mutacji somatycznych w retrogenach w wykrytych jako zróżnicowane w nowotworach w tej pracy? (ii) W jakim stopniu na badanie ekspresji retrogenów mogą wpływać zakłócenia wynikające z nieprawidłowego mapowania odczytów/sygnałów pochodzących z ich genów macierzystych, czy z innych kopii danego retrogenu? Również czy występowanie retrogenów może zakłócać ocenę poziomu ekspresji genów macierzystych? Czy stosuje się jakieś specjalne procedury, żeby takich zakłóceń uniknąć?

Podsumowując, praca doktorska dotyczy bardzo ciekawego i niezwykle oryginalnego zagadnienia, jakim jest rola retrogenów w nowotworzeniu. Przeczytałem tę pracę z dużym i autentycznym zainteresowaniem. Sposób przedstawienia pracy jest bardzo klarowny, podjęcie badań zostało dobrze uzasadnione i nie dopatrzyłem się żadnych nieprawidłowości w interpretacji wyników. Zidentyfikowane retrogeny o zróżnicowanym poziomie ekspresji w nowotworach, szczególnie CALM5, RHOB i HSPA2, powtarzalnie wykrywane w różnych

niezależnych analizach, mogą znacząco przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów nowotworowych.

Warto również zwrócić uwagę, że doktorantka jest autorką dwóch artykułów przeglądowych, opublikowanych w czasopismach notowanych w bazie Journal Citation Reports, Life i Cells. Oba artykuły dotyczą retrogenów, zagadnienia ściśle powiązanego z tematyką rozprawy doktorskiej, a pierwszy z tych artykułów, którego doktorantka jest pierwszym autorem, dotyczący zagadnienia retrogenów w raku, został wykorzystany do przygotowania Wstępu.

W związku z powyżej przytoczonymi argumentami jestem przekonany, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Klaudii Staszak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Piotr Kozłowski