

Piotr Zielenkiewicz
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii

Recenzja

w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr Klaudii Staszak
dla Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Rozprawa doktorska pani mgr Klaudii Staszak została wykonana w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w Instytucie Biologii i Ewolucji Człowieka Wydziału Biologii w grupie i pod kierunkiem Prof. dr hab. Izabeli Makałowskiej.

Zgodnie z tytułem, rozprawa omawia wyniki badań bioinformatycznych i, w małej części, eksperymentalnych w poszukiwaniu powiązań pomiędzy retrogenami i nowotworami. Badania te wpisują się w zainteresowania naukowe Prof. Makałowskiej, która od lat z powodzeniem analizuje sekwencje DNA znajdując w nich często niedostrzeżone przez innych badaczy właściwości. Stanowią także kontynuację prac Jej grupy nad retropozycją i retrogenami opisaną już w licznych publikacjach naukowych.

Badania przeprowadzone przez mgr. K. Staszak oparte są na analizach sekwencji genomów i danych transkrypcyjnych człowieka, psa i kury, dla których istniała odpowiednia ilość danych dotyczących nowotworów z ograniczeniem do organizmów naczelnych, u których proces transpozycji był szczególnie intensywny w trakcie ewolucji.

Przeprowadzone przez doktorantkę analizy rozpoczynają się od znalezienia tych retrokopii, które wykazują ekspresję w komórkach badanych organizmów. Analizowano w tym celu biblioteki RNA-seq uzyskując, przy bardzo zawężonych kryteriach, 1857 retrogenów u człowieka, 591 u psa i 11 u kury. Analizy danych NCBI SRA pozwoliła na identyfikację tych retrogenów, które mają zmieniony poziom ekspresji w tkance nowotworowej (w porównaniu do zdrowej tkanki) dla 5 nowotworów człowieka: raka piersi, gruczolaka jelita grubego, wątrobiaka zarodkowego, raka wątrobowokomórkowego oraz gruczolakoraka płuc. Analizy ekspresji różnicowej wykonano także tam, gdzie było to możliwe dla różnych stadiów i typów nowotworów dla wszystkich 3 analizowanych organizmów.

Następnie, retrokopie o zmienionej, w stosunku do zdrowej tkanki, ekspresji w nowotworach człowieka poddano analizie filogenetycznej. Trzy (RHOA, HSPA8 i CALM5) spośród 34 tak zdefiniowanych retrogenów występują u wszystkich kręgowców, 5 jest specyficznych dla człowieka, a 16 wspólnych. Dla 3 ewolucyjnie starych retrogenów przeprowadzono pogłębioną

analizę, także z porównaniem do podobieństwa z genami rodzicielskimi oraz genami szympansa, psa, kury i myszy. Przeprowadzona przez doktorantkę analiza składowych głównych dla retrogenów o zmienionej ekspresji vs najczęściej cytowane geny związane z nowotworzeniem pokazała, że młodsze ewolucyjnie retrogeny różnicują 4 spośród 5 badanych nowotworów lepiej niż geny opisywane dotychczas. Wyniki tych pogłębionych analiz bioinformatycznych doktorantka zweryfikowała eksperymentalnie przeprowadzając specyficzne reakcje PCR w ludzkich liniach komórkowych nowotworów oraz w panelach cDNA różnych narządów zarówno ludzkich jak i psa oraz kury, a także w świeżych tkankach nowotworów i odpowiadających im tkankach okalających psa i szczura, dla 3 ewolucyjnie starych retrogenów. Sprawdziła również poziom ekspresji w nowotworach vs zdrowych tkankach i narządach dla trzech retrogenów specyficznych dla człowieka.

Szybki wzrost danych wielkoskalowych dotyczących ekspresji genów w nowotworach umożliwił powstanie opisanych powyżej analiz bioinformatycznych na znacznie większej liczbie danych, tym razem pochodzących z The Cancer Genome Atlas. Ekspresję retrokopii sprawdzono na ponad 5000 bibliotekach RNA-Seq, co po ograniczeniach wartości ekspresji uznanych za istotne pozwoliło na identyfikację 2554 ulegających ekspresji, w tym 119 retrogenów o ekspresji istotnie różnej w tkankach zdrowych i nowotworowych (dla 8 nowotworów człowieka). Spośród nich 20 było wspólnych dla analiz z obu zestawów danych (NCBI TCGA). Suma obu analiz to 135 retrogenów o zmienionej ekspresji. Analiza ewolucyjna pokazała, że w 102 przypadkach retropozycja nastąpiła podczas ewolucji naczelnych. Dodatkowo, przeprowadzono także analizę retrogenów związanych z ewolucją guza nowotworowego oraz z odpowiedzią na terapię, a także analizę genów o zróżnicowanej ekspresji pochodzących od genów opisanych w literaturze jako biorące udział w procesie nowotworzenia.

Ta część pracy również została poparta eksperymentalnie na przykładzie wpływu wyciszenia trzech wybranych retrogenów (o zmienionym poziomie ekspresji w nowotworach człowieka) na ekspresję genów rodzicielskich i, w konsekwencji, na żywotność komórek linii nowotworowych. Zaobserwowany spadek żywotności komórek linii MCF-12 po wyciszeniu retrogenu *retro_hsap_852* zaowocował rozszerzeniem badań o wątek retrogenów związanych jednocześnie z rozwojem łożyska ludzkiego, wskazując na możliwy związek ze zjawiskiem nabywania przez guzy cech złośliwości.

Otrzymane przez doktorantkę wyniki dotyczące retrogenów o zmienionym poziomie ekspresji w genomie człowieka, ich analizy ewolucyjnej, regulacji ekspresji genów związanych z nowotworzeniem i ewolucją w obrębie guza, jak i retrogenów jednocześnie związanych z rozwojem łożyska człowieka zostały przedyskutowane w Dyskusji pracy. Zarówno Wstęp, jak i Dyskusja wyników pokazują, że pani K. Staszak dobrze zna bieżącą literaturę dotyczącą przedmiotu badań.

Rozprawa doktorska p. mgr Klaudii Staszak w całości napisana jest bardzo kompetentnie. Szkoda, że tak ciekawe badania i wyniki opisała w formie trudnej, przynajmniej dla mnie, do czytania. W wielu miejscach informacje bardzo istotne mieszają się z nadmiarem nieistotnych liczb, które można by przenieść do opisu metod, dla odmiany bardzo skrótego. Nie mam natomiast żadnych uwag do używanych w pracy metod bioinformatycznych, baz danych i.t.p. Moim zdaniem rozprawa zdecydowanie zyskałaby na zrezygnowaniu z tradycyjnego układu treści na rzecz opisu łączącego metody i stadia pośrednie obliczeń razem z ostatecznymi wynikami, zwłaszcza przy tak dużej liczbie analiz.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa pani mgr K. Staszak zawiera bardzo wartościowe wyniki dotyczące ewolucji retrogenów potencjalnie związanych z procesami nowotworzenia oraz wygenerowała szereg testowalnych eksperymentalnie hipotez, które mogą owocować nowymi/ulepszonymi metodami walki z nowotworami. Przedstawiony w pracy zakres analiz jest tak szeroki, że inni badacze będą mogli, po ich opublikowaniu, zadać także inne pytania niż te, na które zwróciła uwagę doktorantka we Wnioskach rozprawy.

W konkluzji stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Klaudii Staszak spełnia wymogi ustawowe i zwyczajowe do nadania Jej stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne i stawiam wniosek o dopuszczenie doktorantki do kolejnych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii, ze względu do dużą liczbę wartościowych wyników rozprawa zasługuje na wyróżnienie.

Warszawa, 01 lipca 2025 r.