

Prof. dr hab. Ewa Bartnik
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Staszak pt. „Powiązania pomiędzy nowotworami i retrogenami - kontekst ewolucyjny”

Promotor – Prof. dr hab. Izabela Makałowska

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy retrogenów - w wyniku odwrotnej transkrypcji wiele genów u ssaków stało się pseudogenami pozbawionymi promotorów, ale część z nich ulega ekspresji. Doktorantka postawiła 4 hipotezy badawcze dotyczące związku retrogenów z procesami nowotworzenia, które przedstawiam w formie pytań. 1) Czy retrogeny nowsze ewolucyjnie i specyficzne dla człowieka (naczelnych) częściej wykazują zmiany ekspresji w nowotworach niż retrogeny starsze ewolucyjnie? 2) Czy retrogeny wykazujące zmienioną ekspresję w nowotworach głównie powstały z genów istotnych dla procesów nowotworzenia lub są ulokowane w intronach takich genów? 3) Czy retrogeny z punktu (2) regulują ekspresję genów macierzystych/genów, w których intronach są ulokowane i (4) czy retrogeny wykazujące zmienioną ekspresję w nowotworach mają też zmienioną ekspresję w czasie rozwoju łożyska?

Materiał stanowiły dane transkryptomiczne człowieka, psa oraz kury pochodzące z nowotworów i w większości przypadków ze zdrowych tkanek okalających. Badano także ekspresję retrogenów w wybranych liniach komórkowych i próbkach z nowotworów psa i szczura a także w dostępnych komercyjnie panelach RNA z różnych tkanek człowieka i psa.

Praca ma klasyczny układ, i jest stosunkowo krótka i napisana dobrym językiem.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na parę drobnych nieścisłości itp.

Na str. 9 cytowany odnośnik Richardson i in. nie jest właściwy, powinna być cytowana oryginalna praca np. Sayah i wsp. (2004). Na tej samej stronie dwukrotnie nieprawidłowo użyto słowa "ilość" (dużej ilości retrokopii; metody szacowania ilości zduplikowanych genów) - w obu przypadkach powinna to być liczba.

Od czasu do czasu gen i jego produkt są utożsamiane - str. 10 "retrogeny mogą tworzyć dupleksy RNA-RNA". Nie mogą.

Nie można nazywać niewinnego niezmutowanego genu onkogenem (*FMOS*, str. 12), to gen albo protoonkogen. Jest to dość niefortunne nazewnictwo, ogólnie przyjęte (tzn. nazwa protoonkogen), niestety już nie da się zmienić, ale przed mutacją gen nie jest onkogenem. Podobnie jest na str. 18 - "genów rodzicielskich należących do onkogenów" - o ile supresory nowotworów pełnią swoją funkcję w stanie niezmutowanym, protoonkogeny nie są onkogenami w stanie nienaruszonym - musi nastąpić mutacja, nadmierna ekspresja itp.

str. 13 - inaktywacja p53 występująca w 40-50% ludzkich nowotworów - nie p53, tylko *TP53*, i to nie zawsze jest inaktywacja.

W materiałach i metodach nie jest nic podane o liczebności próbek nowotworu i tkanki otaczającej u psów i szczurów - ile tego było? I jakie guzy?

Jest błędna numeracja podpunktów wyników do str. 45, gdzie po częściach numerowanych podobnie jak Materiał i Metody od 3. nagle pojawia się część 4.2.2.

Proszę o uzasadnienie wspólnego traktowania nowotworu piersi i wątrobiaka zarodkowego - str. 36 - nowotwory są tak heterogenne, że nie bardzo widzę dlaczego te dwa odrębne typy nowotworów mają być traktowane razem. Chyba że jest to nieścisłość językowa, bo na następnej stronie te nowotwory są porównywane ze sobą. No i "wszystkie dwa nowotwory" chyba nie jest właściwym wyrażeniem.

O ile chodzi o sprawy merytoryczne mam wątpliwości co do porównywania linii komórkowej nowotworowej z linią kontrolną, rys. 18. Każdy nowotwór jest inny, i co więcej każda linia komórkowa też, na tej rycinie dla piersi linia rakowa to MCF-7, a kontrola to MCF-12. MCF-7 to "a human breast cancer cell line with estrogen, progesterone and glucocorticoid receptors [26]. It is derived from the pleural effusion of a 69-year-old Caucasian metastatic breast cancer (adenocarcinoma) in 1970" a MCF-12F to "an epithelial cell that was isolated from the mammary gland of a White, 60-year-old female donor". Nie można porównywać zdrowej tkanki jednej osoby z rakiem drugiej, podobny zarzut mam do porównania NCI-H1703 (**NCI-H1703** was derived from a stage 1 lung squamous cell carcinoma of a 54-year-old Caucasian male smoker) z MRC-5 (the MRC-5 cell line was derived from the lung tissue of a 14-week-old male fetus, specifically from an elective termination). Różnice mogą wynikać z różnic osobniczych, różnic w ekspresji związanej z wiekiem, niekoniecznie z różnic nowotwór/tkanka zdrowa. Proszę doktorantkę o ustosunkowanie się do tego w czasie obrony. Chcę też podkreślić, że pani mgr Staszak zdaje sobie sprawę z ograniczeń stosowania modeli linii komórkowych - wynika to z tego, co napisała na str. 83 "...nie zawsze w prawidłowy sposób odzwierciedlają procesy zachodzące w

żywym organizmie, i nie zawsze... są najlepszym modelem. Z drugiej strony są często jedynym modelem możliwym do wykorzystania."

Podobny zarzut mam do porównywania ekspresji retrogenów w linii komórkowej nowotworu wątroby kury z próbkami RNA z różnych narządów kury - ta sama rasa? Różne? Ten sam wiek kur? I czy różnice nie wynikają z tego, że komórki w hodowli mają mnóstwo przypadkowych zmian ekspresji związanych z ich pochodzeniem, pasażami czy warunkami hodowli, a niekoniecznie z tego, że to linia nowotworowa.

I ostatnia uwaga - cytowana na str. 89 praca Kalyana-Sundaran i wsp. (2012) nie znajduje się w spisie literatury.

Uwagi krytyczne nie zmniejszają mojego uznania dla ogromnej ilości pracy wykonanej przez doktorantkę. Analiza obejmuje różnicową ekspresję retrogenów w nowotworach, ustalenie czy dany retrogen jest stary ewolucyjnie, co występuje u ssaków, a co nie - mogłabym to dłużej wyliczać, ale wyniki są przedstawione w rozprawie doktorskiej, a moją rolą jest ocena, a nie streszczanie.

Wracając do czterech przedstawionych powyżej hipotez, dla pierwszej z nich odpowiedź na zadane pytanie to zasadniczo tak, i młode i stare ewolucyjnie retrogeny wykazują zmienioną ekspresję w nowotworach, ale większość z nich to te młodsze, specyficzne dla naczelnych. Nie wykazano, by retrogeny wykazujące zmienioną ekspresję w nowotworach pochodziły głównie z genów istotnych dla procesów nowotworzenia lub były ulokowane w intronach takich genów. To oczywiście jest może bardziej skomplikowane zagadnienie, bo złożoność procesu nowotworzenia jest tak wielka, że ta klasa genów związanych z procesami nowotworzenia jest bardzo duża i bardzo rozmyta. Dla trzeciej hipotezy stwierdzono, że regulacja ekspresji genów rodzicielskich przez retrogeny jest częsta, choć - co ciekawe - badania przeprowadzone in vitro dla trzech przypadków dały różne wyniki - wyciszenie ekspresji genu rodzicielskiego, brak wpływu i podwyższenie ekspresji. Dla ostatniej hipotezy - dla 14 retrogenów stwierdzono, że zmiany ich ekspresji są podobne w procesie nowotworzenia i rozwoju ludzkiego łożyska.

Przeprowadzenie opisanych w rozprawie doktorskiej badań wymagało od doktorantki opanowania nie tylko "mokrych" technik izolacji i analizy RNA, wyciszania ekspresji retrogenów ale też - przede wszystkim - rozwiniętych analiz bioinformatycznych. Jak dla wielu prac opartych na dużej liczbie danych trudno streścić wnioski bo są one trochę rozstrzelone, pewne retrogeny ulegają zwiększonej ekspresji w jednym typie nowotworu ale nie w innych itp., ale chciałabym podkreślić, że badań tego typu jest dotychczas niewiele, a badania pani mgr Staszak wnoszą dużo nowych danych na temat ekspresji retrogenów w

różnych ludzkich nowotworach. Co więcej, jest ona współautorką 2 już opublikowanych prac na ten temat (w Cells i w Life). Czy na podstawie tych danych uda się ustalić markery do wczesnego wykrywania nowotworów trudno powiedzieć, ale jest to dziedzina, w której wiele się dzieje i nie jest jasne jaki kierunek badań może przynieść najlepsze efekty i ewentualne zastosowania praktyczne. Badania dotyczące ludzkich nowotworów dotyczyły 10 różnych typów - choć tylko dla 8 udało się uzyskać porównania z kontrolną zdrową, wśród tych 8 znajdują się najczęstsze i najbardziej groźne nowotwory takie jak rak piersi, płuc, prostaty i jelita grubego. Interesujące są badania zmian ekspresji retrogenów przy progresji nowotworu - być może mogłoby to w przyszłości stanowić markery progresji, choć zważywszy na niejednorodność i złożoność nowotworów na pewno wymaga to dalszych badań.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Klaudii Staszak spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2024. poz. 1571). Zwracam się więc do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza o dopuszczenie pani mgr Klaudii Staszak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 1.07.2025



UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII
prof. dr hab. Ewa Bartnik