



Prof. dr hab. Piotr Kozłowski

Poznań, 28 lipca 2022

RECENZJA
rozprawy doktorskiej lek. Piotra Wysockiego

Functional characterization of Disrupted in Renal Carcinoma 3 (DIRC3) long non-coding RNA in differentiated thyroid cancers

Praca doktorska została wykonana na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dominiki Nowis (promotor) i dr n. med. Moniki Kolanowskiej (promotor pomocniczy).

Rozprawa doktorska ma charakter monografii i została przygotowana w języku angielskim. Głównym celem a tym samym przedmiotem pracy doktorskiej była charakterystyka roli długiego niekodującego RNA (lncRNA, ang. *long noncoding RNA*) *DIRC3* w nowotworzeniu, szczególnie w zróżnicowanym raku tarczyc (DTC, ang. *differentiated thyroid cancer*). Przedmiot ten dobrze wyrażony jest w tytule.

Rozprawa ma tradycyjny charakter, składa się z następujących części stanowiących jednocześnie główne rozdziały: (i) Introduction, (ii) Study rationale, objectives and aims, (iii) Materials and methods, (iv) Results, (v) Discussion, (vi) Conclusions i (vii) Literature. Dodatkowo rozprawa uzupełniona jest szeregiem technicznych rozdziałów, tj., spis treści, spisy skrótów, tabel i rycin oraz spisem publikacji doktoranta, oraz podsumowana jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami są odpowiednia a ich rozmiar uzasadniony zawartością.

W skrócie:

(ad. i) Wstęp dobrze wprowadza w zagadnienia rozprawy doktorskiej, w tym kliniczne, molekularne i genetyczne aspekty raka tarczycy oraz zagadnienia dotyczące lncRNA ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki *DIRC3*. Nie dopatrzyłem się w tym rozdziale żadnych poważnych błędów. Bardzo podobał mi się rozdział na temat całogenomowych analiz asocjacji (GWAS, ang. *genome-wide association study*) w raku tarczycy, pokazujący dobre zrozumienie oraz właściwą interpretację wyników GWAS, które często bywają źle albo nadinterpretowane, nie tylko przez doktorantów. Jednocześnie fragment ten dobrze uzasadniał wybór *DIRC3* jako obiektu badań, a tym samym stanowił przekonujące uzasadnienie całej pracy doktorskiej. Jedynie opis aspektów klinicznych wydawał mi się trochę nadmiarowy,

tym bardziej że w niewielkim stopniu do opisywanych aspektów odnosili się wyniki badań, ale to może wynikać z braku mojej ekspertyzy w tym obszarze.

(ad. ii) Cel i uzasadnienie pracy, w skróty sposób przedstawia uzasadnienie podjęcia badań opisane już we wstępie i wyznacza konkretne zadania badawcze oraz ogólne cele pracy.

(ad. iii) Wydaje mi się, że w rozdziale Materiały i metody zostały opisane wszystkie metody użyte w pracy doktorskiej. Nie dopatrzyłem się tutaj, żadnych poważnych błędów.

(ad. iv) Wyniki obejmują opis bardzo szerokiego wachlarza analiz, wymienionych poniżej. (a) Wyniki rozpoczynają się od analizy różnego typu zewnętrznych danych onkogenomicznych, między innymi z repozytorium TCGA, które dodatkowo uzasadniają podjęcie kolejnych kroków charakterystyki *DIRC3*. Między innymi dane te wykazują relatywnie wysoki poziom *DIRC3* w tarczycy i raku tarczycy, obniżoną przeżywalność pacjentów z niskim poziomem *DIRC3*, różnice poziomu *DIRC3* w różnych podtypach raka tarczycy oraz identyfikację genów, w największym stopniu skorelowanych z poziomem *DIRC3* w tym *IGFBP5*. (b) Analiza *DIRC3* w próbkach klinicznych DTC, która między innymi potwierdziła korelację poziomów *DIRC3* i *IGFBP5* oraz wykazała obniżony poziom *DIRC3* w próbkach raka w porównaniu do tkanki normalnej i brak zależności poziomu *DIRC3* i *IGFBP5* od genotypu polimorfizmu rs11693806. (c) Szereg analiz funkcjonalnych *DIRC3* in vitro w liniach komórkowych raka tarczycy z wykorzystaniem między innymi wyciszania *DIRC3* przy użyciu strategii antysens z oligonukleotydami typu gapmeR, lub aktywacji ekspresji *DIRC3* przy użyciu technologii CRSPRa oraz analizy zmodyfikowanych komórek pod względem migracji, inwazyjności oraz proliferacji, jak również poziomu ekspresji *DIRC3* (z uwzględnieniem wariantów splicingowych), *IGFBP5* i aktywacji ścieżki sygnałowej IGF-1/AKT. W wyniku przeprowadzonych analiz funkcjonalnych doktorant wykazał między innymi, że poziom *DIRC3* jest wzbogacony w jądrze komórkowym, że wzrost poziomu *DIRC3* prowadzi do wzrostu poziomu *IGFBP5* i aktywacji ścieżki IGF-1/AKT, że poziom *DIRC3* pozytywnie koreluje z szybkością wzrostu komórek monitorowanym testem MTT, ale zmniejsza inwazyjność i migrację komórek. (d) Użycie technologii CRISPR sprzężonej z HDR do wygenerowania genotypu G/G oraz G/- polimorfizmu rs11693806 w linii komórkowej MDA-T32 heterozygotycznej (G/C) pod względem polimorfizmu rs11693806. W wygenerowanych liniach G/G i G/- doktorant wykazał obniżony poziom *DIRC3* oraz *IGFBP5*, obniżony poziom komórek (test MTT) oraz podwyższony poziom migracji względem komórek macierzystych z genotypem G/C. Sekwencjonowanie całego eksomu (WES, ang. *whole-exome sequencing*) nie wykazało innych istotnych różnic genetycznych pomiędzy porównywanymi liniami komórkowymi. (e) Z wykorzystaniem uzyskanych linii komórkowych z wyciszonym poziomem *DIRC3* i linii komórkowych ze zmodyfikowanym genotypem polimorfizmu rs11693806 oraz odpowiadających im linii typu macierzystego doktorant wykonał całogenomowe profilowanie (RNAseq) oraz różnicową analizę ekspresji i zidentyfikował szereg genów różnicujących wyżej wymienione linie komórkowe w tym każdorazowo obniżony poziom *IGFBP5*.

(ad. v) Dyskusja, choć dość długa została przedstawiona z zachowaniem właściwych proporcji i prawidłowo interpretuje uzyskane wyniki. Nie dopatrzyłem się w tym rozdziale żadnych nadinterpretacji. Wręcz przeciwnie, wyniki są interpretowane/dyskutowane z dużą ostrożnością. Na uwagę zasługuje dyskusja ograniczeń pracy, co rzadko jest prezentowane w pracach doktorskich, a jest to ważny element każdej pracy naukowej. Tutaj wskazanie i dyskusja konsekwencji ograniczeń została przeprowadzona bardzo dojrzałe, co wskazuje na dojrzałość i dobre zrozumienie tematów przez doktoranta. Dyskusja podsumowana jest przekonującym modelem/propozycją funkcjonalnej roli *DIRC3* jako czynnika supresorowego w raku tarczycy, który poprzez pozytywną regulację IGFBP5 reguluje aktywację ścieżki sygnałowej IGF-1. Model w znacznym stopniu oparty jest na wynikach własnych uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka drobnych uwag czy komentarzy, które wymieniam poniżej. Nie ma jednak konieczności odnoszenia się do wszystkich tych uwag w trakcie obrony. (i) W rozdziale 1.2. zauważyłem informację, że rak tarczycy został oszacowany jako drugi najbardziej odziedziczalny nowotwór [ref 16], jednak nigdzie nie znalazłem informacji, jaka jest faktycznie współczynnik odziedziczalności (h^2 , ang. *heritability*) raka tarczycy. (ii) Doktorant zamiast powszechnie stosowanego terminu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), w pracy używa określenia SNV (ang. *single nucleotide variant*), które zwyczajowo ma nieco inne znaczenie/zastosowanie. Czy użycie tego terminu było celowe? (iii) W trakcie lektury trochę brakowało mi graficznego przedstawienia badanego regionu genomu (mapy genu *DIRC3*) z zaznaczeniem miejsc występowania wymienianych SNP oraz bloków nierównowagi sprzężeń (LD, ang. *linkage disequilibrium*) między tymi SNP. (iv) W podpisie do ryciny 5, w punkcie E wskazane jest, że różnica częstości mutacji w wybranych genach w próbkach z wysokim i niskim poziomem *DIRC3* była porównywana przy użyciu jednostronnego testu Fisher'a. Z czego wynikało zastosowanie tutaj testu jednostronnego? Testy jednostronne stosuje się rzadko, zwykle w bardzo szczególnych przypadkach. (v) Odnośnie do ryciny 23. Wydaje mi się, że lepiej byłoby przeprowadzić i przedstawić na jednym wykresie analizę PCA wszystkich 3 typów komórek, anty-*DIRC3*, anty-IGFBP5 i kontroli. Pozwoliłoby to porównać jak różne lub podobne są komórki anty-*DIRC3* i anty-IGFBP5. To samo dotyczy ryciny 37A.

Ponadto chciałbym, żeby doktorant odniósł się w trakcie obrony do następujących pytań/zagadnień: (i) Czy *DIRC3* zawarty jest w bazie Cancer lncRNA Census (CLC) opracowanej ostatnio przez grupę Lory Johnson'a (Vancura A i wsp. NAR Cancer 2021)? Czy powstanie takiej bazy może być przydatne w badaniach lncRNA w nowotworach? (ii) W jakim stopniu uzyskane wyniki dotyczące roli *DIRC3* są specyficzne dla raka tarczycy, a w jakim stopniu są generalne i mogą obowiązywać również w innych nowotworach złośliwych? Ewentualnie jakich? (i) W badaniach próbek „klinicznych” DTC doktorant nie obserwował związku genotypu polimorfizmu rs11693806 z poziomem *DIRC3* (rycina 10). Natomiast w linii komórkowej zmodyfikowanej przy użyciu metody CRISPR/HDR [genotyp G/G vs G/C] wyraźnie

widać obniżenie zarówno poziomu *DIRC3*, jak również *IGFBP5*. Z czego może wynikać różnica w tych dwóch eksperymentach (modelach)?

Podsumowując, praca doktorska dotyczy bardzo ciekawego i aktualnego zagadnienia, jakim jest rola lncRNA w nowotworzeniu. Podjęcie pracy zostało bardzo dobrze uzasadnione, cele pracy zostały dobrze zdefiniowane i poprawnie zrealizowane. Uzyskane wyniki wsparte są dużą liczbą różnego typu testów, od statystycznej analizy zewnętrznych danych onkogenomicznych, poprzez analizę próbek klinicznych, szereg testów funkcjonalnych, generowanie nowych modeli komórkowych, w tym modeli generowanych z użyciem technik CRISPRa i CRISPR/HDR, oraz genetyczne analizy uzyskanych modeli. Wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane i zostały wyciągnięte prawidłowe wnioski.

Warty odnotowania jest również dorobek publikacyjny doktoranta. Doktorant jest współautorem 10 artykułów w dobrych, rozpoznawalnych czasopismach specjalistycznych (notowanych w bazie Web of Sciences), w tym w 3 pierwszym autorem oraz autorem kilku artykułów w czasopismach lokalnych.

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 Dyscypliny Nauk Medycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie lek. Piotra Wysockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na nowatorski charakter pracy, zastosowanie w niej ogromnej liczby różnego typu analiz i testów oraz ze względu na bardzo rzetelną i krytyczną dyskusję wyników, wnioskuję o wyróżnienie pracy/rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Piotr Kozłowski