



Kraków, 29 sierpnia 2022 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH
PANA LEK. PIOTRA TOMASZA WYSOCKIEGO ZATYTUŁOWANEJ:
"FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF DISRUPTED IN RENAL CARCINOMA 3
(DIRC3) LONG NON-CODING RNA IN DIFFERENTIATED THYROID CANCERS"**

Częstość występowania zróżnicowanego raka tarczycy (ang. *differentiated thyroid cancer*, DTC) stale się zwiększa a dane epidemiologiczne wskazują, że stanowi on najczęściej występujący rodzaj nowotworu gruczołów dokrewnych i zajmuje wysoką pozycję wśród nowotworów złośliwych u kobiet. Co prawda cechuje się dobrym rokowaniem i znakomitymi wskaźnikami przeżycia odległego, jednak wskazane jest dogłębne poznanie molekularnych mechanizmów prowadzących do jego rozwoju, a szczególnie lepsze poznanie uwarunkowań genetycznych predysponujących do rozwoju tego typu nowotworu. Takie zadanie postawił sobie Doktorant, Pan lek. Piotr Wysocki, przystępując do realizacji pracy doktorskiej w Laboratorium Medycyny Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką prof. dr hab. n. med. Dominiki Nowis (promotor) oraz dr n. med. Moniki Kolanowskiej (promotor pomocniczy).

Zanim przejdę do oceny rozprawy, chciałabym podkreślić, że Doktorant ma bogate doświadczenie naukowe, poparte współautorstwem w 13 publikacjach naukowych, opublikowanych w czasopismach o różnym wskaźniku oddziaływań. Na podkreślenie zasługuje współautorstwo w pracach w czasopismach *Nature Communications*, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* czy *Oral Oncology*. Publikował też w polskich periodykach takich jak *Gastroenterologia Kliniczna* czy *Medycyna Praktyczna*. Brał czynny udział w konferencjach naukowych, prezentując zarówno dane związane z realizacją głównego nurtu badawczego stanowiącego kanwę rozprawy doktorskiej jak i wyniki innych projektów, w których realizację był zaangażowany. Na szczególne pokreślenie zasługuje fakt, że Doktorant był Kierownikiem własnego projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Preludium).

Formalny opis rozprawy

Praca doktorska jest napisana w języku angielskim i ma klasyczny układ. Na 196 stronach Autor zawarł główne rozdziały takie jak Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję i Konkluzję. Dodatkowo, na początku pracy Doktorant umieścił listę figur i tabel, a na końcu rozprawy zaprezentował swoje osiągnięcia (listę publikacji). W dodatkowej tabeli (Appendix) przedstawiono wyniki porównania tzw. DEGs (czyli genów o różnicowej ekspresji), wspólnych dla doświadczeń z zahamowaniem ekspresji genów DIRC3 i IGFBP5 w

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycyny

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioteka.moi.uj.edu.pl/zbm>

linii MDA-T32. Pracę kończy Bibliografia licząca 395 pozycji, prawidłowo sformatowana i zawierająca w dużej mierze najnowsze prace dotyczące badanej tematyki.

Praca jest napisana bardzo dobrze. Na palcach jednej ręki można wskazać drobne błędy literowe. Nie znalazłam innych niedociągnięć redakcyjnych. Biorąc pod uwagę zakres (obszerność) pracy, taka dbałość o warstwę językową oraz opracowanie edytorskie zasługuje na dużą pochwałę.

Ocena merytoryczna

Pracę otwiera **Wstęp**, zawarty na 13 stronach, podzielony na dziewięć podrozdziałów i zobrazowany dwiema rycinami. Kolejno skoncentrowano się na opisie klasyfikacji raków tarczycy, przedstawieniu możliwych opcji terapeutycznych, głównych ścieżek sygnalizacyjnych zaburzonych w przebiegu choroby a w końcu na opisie możliwej roli genu DIRC3 w patologii choroby.

Cele pracy zostały jasno wyznaczone, Doktorant sformułował sześć ważnych pytań, które stanowiły podstawę do przeprowadzenia szeregu badań podzielonych na trzy główne części.

W 25 podrozdziałach **Materiałów i metod**, szczegółowo przedstawiono bardzo bogaty wachlarz zastosowanych metod, w tym proste testy biochemiczne jak MTT, testy funkcjonalne, w tym testy migracji i wzrostu w agarze, analizę ekspresji genów i białek z użyciem (odpowiednio) metody PCR w czasie rzeczywistym i Western blot. W swoich badaniach Doktorant wykorzystał również zaawansowane, najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej i biotechnologii, między innymi sekwencjonowanie RNA i technologię CRISPR do hamowania i zwiększania ekspresji genów. Materiał badawczy stanowiły nie tylko linie komórkowe raka tarczycy, ale również tkanki (biopsje) od 67 pacjentów z różnymi stadiami nowotworu.

Metody, zawarte na blisko 30 stronach maszynopisu są opisane w sposób niezwykle wyczerpujący, nie mam wątpliwości, że na podstawie zamieszczonych protokołów, uda się odtworzyć przebieg eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że oprócz szczegółów technicznych, *stricte* opisujących przebieg procedury, zamieszczono również dodatkowe informacje, np. w jakim celu zastosowano daną metodę i jaka jest jej ogólna zasada działania. Autor w tej części zamieścił jedną figurę oraz siedem przejrzystych tabel, m.in. z sekwencjami starterów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przeciwciałami użytymi w analizie Western blot czy ciekawą tabelę porównującą profil mutacji różnych linii użytych w doświadczeniach.

Z obowiązku Recenzenta zwrócę uwagę na drobne niedociągnięcia w tej części pracy. Przy opisie reakcji PCR w czasie rzeczywistym niezbyt precyzyjny jest opis ilości użytego cDNA (1 µl diluted cDNA – zamiast ilości, ważniejsze jest



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biologii i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6518

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biologia.mg.uj.edu.pl/bio>



UNIwersytet
Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biochemii,

Biologii i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioteka.moi.uj.edu.pl/zbr>

podanie stężenia). Zwyczajowo podpisy tabel umieszcza się nad a nie pod tabelami. Interesuje mnie również czy przy izolacji RNA z guzów nie prowadzono żadnej homogenizacji tkanek? Nie zauważyłam szczegółów dotyczących reakcji PCR w celu detekcji Mykoplazmy, zastanawiam się również, czy zamiast odczytów absorbancji (OD) dla pomiarów MTT nie lepiej byłoby tych danych przeliczyć i przedstawić np. jako % kontroli.

Powyższe uwagi/pytania nie rzutują na bardzo wysoką ocenę rozdziału Materiały i metody. W mojej opinii tak szczegółowy opis tej części zasługuje na szczególną pochwałę. Co najważniejsze, dobór metod jest prawidłowy a ich wybór i przeprowadzone analizy pozwoliły na realizację głównych celów projektu.

Rozdział **Wyniki** został podzielony na pięć podrozdziałów, w obrębie których dokonano dalszych podziałów koncentrując się na konkretnych zadaniach badawczych. Rozdział ten jest zebrany na 44 stronach i zawiera 37 panelowych rycin. Jest on starannie przygotowany, rysunki są czytelne, zawierają wyczerpujące opisy. Autor dołożył wszelkich starań, aby jasno i klarownie opisać wyniki doświadczeń, wskazując równocześnie na motywację przeprowadzenia danego eksperymentu. Swoje badania rozpoczął od analiz bioinformatycznych oraz badania materiału klinicznego, tj. oszacowania poziomu DIRC3 w próbkach od 67 pacjentów z różnymi typami raka tarczycy. Drugim zadaniem było określenie roli DIRC3 w układzie komórkowym, w tym m.in. analiza ekspresji mRNA w kilku liniach raka tarczycy, ocena subkomórkowej lokalizacji a w końcu eksperymenty z hamowaniem ekspresji DIRC3 w wybranych liniach komórkowych. W kolejnym etapie, Pan lek. Wysocki wykonał badania mające na celu określenie roli DIRC3 w sygnalizacji IGF-1. Poprzez zastosowanie tzw. metody CRISPR activation doprowadził do nadekspresji DIRC3, jak również dokonał edycji rs11693806, jednego z najważniejszych wariantów germinalnych, determinujących ryzyko zachorowania na DTC i przeprowadził analizę uzyskanych klonów, określając zarówno fenotypowe jak i molekularne mechanizmy, w tym sekwencjonowanie RNA czy sekwencjonowanie całoeksomowe. Jestem pod wrażeniem liczby przeprowadzonych eksperymentów. Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana i wykonana a prezentacja wyników jest przeprowadzona poprawnie. Co ważne, wyniki zostały poddane rygorystycznej analizie statystycznej. Zastanawia mnie jedynie wynik analizy statystycznej na Rys. 30. Różnice pomiędzy analizowanymi grupami są bardzo małe, choć jak wynika z wykresu, istotne statystycznie (przy zastosowaniu konkretnego testu). Biorąc pod uwagę dość wysokie wartości absorbancji, szczególnie w punkcie czasowym 96h oraz dalszą uwagę o wyciąganiu wniosków nt. żywotności komórek, korzystając z testu MTT, sugerowałabym powtórzenie tego eksperymentu w nieco zmodyfikowanym zakresie (inna metoda pomiaru żywotności i/lub mniejsza wyjściowa liczba komórek). Ponadto, do tej części mam kilka pytań, na które proszę o ustosunkowanie się Doktoranta podczas publicznej obrony:

1. Porównanie ekspresji DIRC3 w materiale klinicznym wskazuje na obniżony poziom tego czynnika w tkankach nowotworowych w stosunku do zdrowej tkanki. Analizując ekspresję w liniach komórkowych, wykazano zróżnicowany poziom transkryptu DIRC3 w różnych linach, ale nie zawarto w tym panelu normalnych linii komórek tarczycy. Czy takie linie są komercyjnie dostępne? Czy takie porównanie było wykonane, a może dostępne są dane literaturowe pokazujące takie zależności?
2. Przedstawiono szereg wyników z zahamowania ekspresji DIRC3. Czy w świetle informacji o supresorowym działaniu DIRC3 nie byłoby wskazane przeprowadzenie większej liczby analiz z nadekspresją DIRC3?
3. Badania z wykorzystaniem CRISPRa doprowadziły do znacznego zwiększenia ekspresji DIRC3 ale nie wpływało to na poziom IGFBP5. Autor pisze, że nastąpiło „nasilenie wzrostu liczby żyjących komórek w teście MTT”. Również w innych analizach używał tego testu do badania wzrostu/prolifracji. Doktorant co prawda pisze, że jest to metoda pośrednia, zdaje sobie więc sprawę z tego, że jest to test mierzący aktywność metaboliczną komórek i nie powinien być rozpatrywany jako bezpośredni test oceniający żywotność komórek. W przyszłości warto rozważyć inne sposoby określania tego parametru, zaczynając od najprostszego liczenia komórek w kolejnych dniach hodowli.

W końcowej części rozprawy przedstawiono **Dyskusję**, w której nie tylko przeanalizowano uzyskane wyniki na tle literatury przedmiotu, ale również wskazano główne ograniczenia przeprowadzonych badań, a także wskazano potencjalne implikacje terapeutyczne. Ta część jest bardzo ważna, bo z jednej strony wskazuje, że Doktorant zdaje sobie sprawę np. z małej liczby analizowanych grup czy zaskakujących wyników uzyskanych dla różnych wariantów splicingowych DIRC3. Wskazywane są ograniczenia techniczne (w tym np. problemy z testem ELISA). W przedstawionych perspektywach klinicznych podkreślono zastosowanie przeprowadzonych badań do przewidywania ryzyka DTC. Zasugerowano, że terapia spersonalizowana, bazująca na genotypowaniu DIRC3 z równoczesnym pomiarem poziomu czynnika IGF-1 we krwi da szansę na lepsze oszacowanie ryzyka DTC. Dyskusja jest napisana w bardzo dobry sposób, Doktorant ze swobodą interpretuje swoje wyniki. Cytuje wiele nowych i najnowszych publikacji a na koniec przedstawia możliwy szlak sygnalizacyjny związany z DIRC3/IGFBP5 – szlak ten jest hipotetyczny (bazuje na analizie danych literaturowych), ale bardzo możliwy w układzie badanym w rozprawie. Pracę zamyka sześć dobrze postawionych konkluzji.

Do najważniejszych osiągnięć pracy uznaję wielotorowe podejście do wykazania, że DIRC3 jest supresorem w DTC. Zastosowanie metod sekwencjonowania pozwoliło na uzyskanie wielu danych, które otwierają nowe tematy badawcze i z pewnością będą wykorzystane do zadania kolejnych pytań



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii

Biologii i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medyczne

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@u.j.krakow.pl

http://biotech.med.u.j.krakow.pl

badawczych. Na koniec, z obowiązku recenzenta i chęci rozmowy z Doktorantem podczas publicznej obrony, proszę o skomentowanie poniższych zagadnień:

1. Niedotlenienie stanowi bardzo ważny stan związany z rozwojem nowotworów, w tym ma szczególny udział w progresji raków tarczycy. W swoich badaniach Doktorant wspomina o roli czynnika HIF-1 w badanym układzie sygnalizacyjnym. Zasadne wydaje się przeprowadzenie doświadczeń w warunkach niedotlenienia. Czy takie badania były realizowane? Jak taki stan niskiego poziomu tlenu może wpływać na uzyskane wyniki?
2. Doktorant wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych badań, w tym analiz *in vivo*. Jakie typy doświadczeń mógłby zaproponować? Czy w eksperymentach *in vivo* dążyłby do zahamowania ekspresji czy raczej nadekspresji DIRC3? Jakie metody biologii molekularnej można zastosować do takich analiz.

Podsumowanie

Stwierdzam, iż uzyskane przez Pana lek. Piotra Wysockiego wyniki są ważne i poszerzają wiedzę nad patologią raka tarczycy i mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii tej choroby.

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 stanowi dowód na posiadaną przez Doktoranta wiedzę teoretyczną i praktyczną znajomość technik metod biologii molekularnej niezbędnych do prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana lek. Piotra Wysockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zakres merytoryczny rozprawy, zastosowane metody, prawidłową interpretację wyników i dojrzałość w dyskutowaniu wyników uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

Agnieszka Łoboda

UNIwersytet Jagielloński
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
Tel. 12/664-60-00, 12/664-60-15
fax (12)664-69-02
12/664-54-51



UNIwersytet
Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 8412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioteka.mio.uj.edu.pl/zbm>