



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Ogólnej

Dr hab. Katarzyna Miękus

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr **Martyny Filipskiej**

Tytuł rozprawy: „**Wpływ wybranych mikroRNA na agresywny fenotyp i chemiooporność komórek płaskonabłonkowego raka płuca**”.

Odkryte w 1993 roku mikroRNA (miRNA), czyli krótkie cząsteczki RNA spełniają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów. Spośród genów, których ekspresja zależna jest od miRNA, wiele koduje białka ważne w procesach takich jak proliferacja czy różnicowanie, a sama ekspresja licznych miRNA jest tkankowo-specyficzna, co sugeruje zaangażowanie tych cząsteczek w organogenezę.

Odkrycie miRNA, zmieniło nie tylko sposób postrzegania regulacji ekspresji genów w prawidłowych komórkach, ale również w czasie procesu nowotworzenia. Obecnie wiadomo już, że zbyt niski, bądź zbyt wysoki poziom ekspresji danego miRNA może mieć istotne znaczenie w rozwoju nowotworu. Różne typy nowotworów charakteryzują się odmiennym wzorem ekspresji cząsteczek miRNA. Coraz większa ilość podejmowanych badań dotyczy funkcjonowania miRNA w procesie rozwoju i progresji choroby nowotworowej i wyraźnie wskazuje na ich ogromny potencjał w terapii onkologicznej. Temat ten jest bardzo ważny zarówno ze względów poznawczych, jak i potencjalnie praktycznych. Poznanie miRNA zaangażowanych w proces nowotworzenia i wyjaśnienie molekularnych mechanizmów związanych z regulacją ekspresji genów przez miRNA w komórkach nowotworowych jest koniecznym warunkiem zrozumienia tego procesu jak też identyfikacji skutecznych leków.

Prezentowane w rozprawie wyniki badań są logiczną kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych w zespole prof. Jacka Jassemę, kierownika Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wyniki te, opublikowane w prestiżowym czasopiśmie British Journal of Cancer w 2014 roku, wskazały na miRNA, których zmieniona ekspresja była związana z podwyższonym ryzykiem nawrotu wczesnego płaskonabłonkowego raka płuca. Przeprowadzone badania w niezależnej grupie chorych na raka płaskonabłonkowego wykazały, że wysoka ekspresja miR-662, miR192\*, miR-192 była związana z krótszym czasem przeżycia wolnym od przerzutów. Zbadanie biologicznego znaczenia zidentyfikowanych miRNA o potencjalnym znaczeniu

prognostycznym i przeprowadzenie analiz czynnościowych w warunkach *in vitro* w liniach komórkowych możliwe było dzięki współpracy z Zakładem Biologii Komórki, Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w którym praca została wykonana. Promotor pracy dr hab. Anna Żaczek również prowadzi badania w zakresie podobnej tematyki, i od wielu lat zajmuje się biologią komórek nowotworowych, procesem nowotworzenia i diagnostyką chorób nowotworowych. Warto dodać, że prowadzone badania stanowią doskonały przykład współpracy i tworzenia zespołów badawczych pomiędzy klinicznymi i teoretycznymi jednostkami uczelni.

W pierwszej części przedstawionej do recenzji pracy, Doktorantka określiła chemiowrażliwość linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) na cisplatynę i etopozyd i oznaczyła ekspresję miR-192, miR-192\* oraz miR-662 w 10 liniach komórkowych raka płuca. Do dalszych badań Doktorantka wybrała dwie linie płaskonabłonkowego raka płuca, tj. H1703 oraz H520, które różniły się pod względem ekspresji miR-192, miR-192\* oraz miR-662 i poddała je badaniom funkcjonalnym, takim jak zdolność do migracji, inwazji przez matrigel oraz wzrost bez kontaktu z podłożem. Uzyskane wyniki wskazały, że linia H520 charakteryzuje się wyższą chemioopornością oraz podwyższoną ekspresją ww. miRNA w stosunku do linii H1703. Ponadto wykazano, że komórki H520, w przeciwieństwie do H1703, są zdolne do tworzenia kolonii w środowisku bez kontaktu z podłożem, natomiast komórki H1703 wykazują zdolność do migracji i inwazji przez matrigel, czego nie obserwowano w przypadku linii H520. Różnicom ekspresji miR-192, miR192\* oraz miR-662 odpowiadały różnice fenotypowe dotyczące chemiowrażliwości, migracji i inwazyjności.

Kolejnym celem pracy była analiza funkcjonalna miRNA opierająca się na modyfikacji ekspresji wybranych miRNA i badanie jej wpływu na chemiooporność i cechy fenotypowe. Analiza ta została przeprowadzona z użyciem inhibitorów miRNA. W celu optymalizacji procedury skonstruowano plazmid reporterowy oparty na fluorescencji białka GFP (ang. green fluorescent protein), poprzez wstawienie fragmentów kodujących miejsca wiązania dla poszczególnych miRNA w regionie 3'UTR sekwencji dla GFP. Zmiana fluorescencji GFP w odpowiedzi na ko-transfekcję inhibitorami miRNA w obecności odpowiedniego systemu plazmidowego umożliwiła ocenę wydajności wyciszenia miRNA inhibitorem oraz dobranie optymalnych warunków transfekcji. Doktorantka zbadała wpływ wyciszenia badanych miRNA na chemiowrażliwość komórek i wykazała, że zastosowane inhibitory miRNA nie wpływają na chemiowrażliwość na cisplatynę, natomiast wyciszenie miR-192 oraz miR662 uwrażliwia obie linie na etopozyd. Kolejnym krokiem było zbadanie wpływu inhibitorów miRNA na fenotypowe cechy złośliwości nowotworu. W tym celu komórki H520 transfekowane inhibitorami

miR-192, miR-662 lub kontrolą negatywną poddane zostały testowi klonogennemu w półpłynnym agarze, a komórki H1703 testowi zarastania rany (ang. wound healing assay). Doktorantka zaobserwowała obniżenie liczby kolonii formowanych przez komórki H520 traktowanych inhibitorami i obniżenie zdolności do migracji komórek H1703. Przeprowadzone analizy funkcjonalne wskazały na potencjalne znaczenie ekspresji badanych miRNA na agresywność i chemiooporność badanych komórek nowotworowych. W kolejnym kroku Doktorantka skoncentrowała swoje badania na poszukiwaniu genów regulowanych przez badane miRNA. W tym celu przeprowadzona została analiza transkryptomyczna komórek po traktowaniu inhibitorami miR-192-p i miR-662-5p. W analizie głębokiego sekwencjonowania nowej generacji całego transkryptomu (ang. RNA-seq) w odpowiedzi na wyciszenie odpowiednich miRNA wykazano zmiany w ekspresji genów związanych ze ścieżkami sygnałowymi związanymi z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (ang. EMT epithelial-to-mesenchymal transition), szlakiem Wnt (ang. wingless type), oraz genach modulujących odpowiedź układu immunologicznego. Uzyskane wyniki sugerują, że ekspresja wyżej wymienionych miRNA w materiale klinicznym mogłaby znaleźć zastosowanie jako predykcyjny marker korzyści z leczenia etopozydem.

Warto podkreślić, że część prezentowanych w rozprawie wyników badań została opublikowana w 2018 roku w renomowanym czasopiśmie Lung Cancer, a Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji.

Praca opublikowana jest na 104 stronach maszynopisu, z czego 81 stron obejmuje wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja wraz z literaturą. Pozostała część pracy to dwa Aneksy, Aneks I, w którym Autorka umieściła wyniki uzupełniające i Aneks II obejmujący Odczynniki, Sprzęt i Aparaturę. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 184 pozycje.

Celem pracy było zbadanie wpływu trzech miRNA: miR-192-5p, miR-192-3p i miR-662-5p na agresywność i chemiooporność komórek płaskonabłonkowego raka płuca (SCC) w warunkach *in vitro*. Podwyższona ekspresja badanych miRNA u chorych z SCC korelowała z podwyższonym ryzykiem rozwinięcia przerzutów odległych, co zostało wykazane we wcześniejszych badaniach zespołu. Osiągnięcie zamierzonych celów zostało bardzo dobrze zaplanowane. Doktorantka rozpoczęła od optymalizacji modelu komórkowego. Pozwoliło to na wybranie dwóch linii komórkowych, które z uwagi na chemiooporność, poziom ekspresji miRNA i cechy fenotypowe wykorzystano w dalszych badaniach. W kolejnych krokach, Doktorantka zbadła wpływ wyciszonej ekspresji badanych miRNA na chemiooporność i fenotyp wybranych linii komórkowych i wykonała analizę transkryptomu w celu wskazania potencjalnie regulowanych genów przez badane miRNA.

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ  
Zakład Biochemii Ogólnej

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska jest stylistycznie bardzo dobrze napisana. Udowadnia dobrą znajomość tematu. Praca jest wartościowa pod względem naukowym i poznawczym aczkolwiek mam do niej kilka zastrzeżeń:

We **Wstępie** Autorka porusza zagadnienia związane z tematem pracy doktorskiej. Rozpoczyna od opisu raka płuca (czynniki ryzyka, rozpoznania, typów histologicznych i leczenia). Ta część wstępu jest bardzo dobrze napisana, jedynie zbędne wydaje się zamieszczenie rycin obrazujących strukturę zachorowań i zgonów wśród mężczyzn (Ryc.1) i kobiet (Ryc.2). Tym bardziej, że odnośnik w tekście znaleziono jedynie dla Ryc. 2. Następnie Doktorantka opisuje cechy nowotworu i metody ich badania w warunkach *in vitro*. Znajduje się tu opis testu MTT (test cytotoksyczny z użyciem soli tetrazolowej), testu gojenia ran, migracji przez matrygel oraz badania właściwości klonogennych komórek i badanie oddziaływań pomiędzy komórkami w ko-hodowlach komórkowych. Ta część Wstępu wydaje się niepotrzebna i pasuje bardziej do części Materiały i Metody. Doktorantka mogła tutaj krótko opisać zjawisko oddziaływania komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem, na przykładzie makrofagów, które to komórki wykorzystywała w swoich badaniach.

W dalszej części Wstępu Autorka bardzo wyczerpująco opisuje miRNA, mechanizm ich działania i znaczenie w procesie nowotworzenia. Sporo miejsca poświęca również znaczeniu miRNA jako czynników prognostycznych a także ich zastosowaniu jako cele terapeutyczne. Ta część jest dobrze napisana i wskazuje na dobrą znajomość podjętej tematyki badawczej.

Najwięcej uwag i wątpliwości budzą rozdziały: Materiały i metody oraz opis i sposób przedstawienia wyników. Ta część jest dość chaotyczna i nie wszystkie procedury opisane są w sposób jasny i klarowny. Część wyników, istotnych dla pracy zamieszczono w Aneksie I. W części metodycznej brakuje dokładnego i jasnego opisu konstrukcji wektorów wirusowych.

#### **W rozdziale "Materiały i Metody":**

1. Moje główne zastrzeżenie i wątpliwość budzi część poświęcona konstrukcji wektorów reporterowych:

- Brakuje jasnego i klarownego opisu konstrukcji wektorów a pojedyncze wyniki znajdują się dopiero w Aneksach. W rozdziale 3.6.2 Autorka pisze, że „zaprojektowano oligonukleotydyty zawierające po dwa miejsca wiązania dla „seed region” wymienionych miRNA, miejsca restrykcyjne EcoRI i XbaI na obu końcach nici kodującej i niekodującej oraz miejsce restrykcyjne HindIII pośrodku sekwencji”. W

tym miejscu brakuje informacji jak długie są zaprojektowane oligonukleotydy. Taką informację Autorka umieściła dopiero w Aneksie II, Tabeli V.

- Nie jest również jasne czemu miało służyć miejsce restrykcyjne HindIII, które miało potwierdzać obecność wstawki, skoro w pracy brakuje wyników cięcia restrykcyjnego tym enzymem. Nigdzie w pracy nie znaleziono analizy restrykcyjnej dla enzymu HindIII. Należało dokładnie opisać jakie wyniki spodziewano się otrzymać w wypadku analizy restrykcyjnej plazmidów: niezmodyfikowanego pMIR-GFP i plazmidów ze wstawionymi wstawkami.

- Analiza restrykcyjna otrzymanych plazmidów została przeprowadzona z użyciem enzymu BamHI (Ryc.IV), którego miejsce cięcia, zgodnie z zamieszczonym schematem wektora reporterowego pMIR-GFP, znajduje się powyżej używanych do klonowania miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez enzymy EcoRI i XbaI (Ryc. 20). Enzym ten będzie przecinał wszystkie plazmidy bez względu na obecność wstawki. Natomiast, zaprojektowane wstawki, według opisu, posiadają miejsce restrykcyjne dla enzymu HindIII (Aneks II, Tabela V). Nie jest niestety jasne, czy jest to pomyłka w opisie zaprojektowanych nukleotydów, czy też w opisie metodologii, gdzie zamiast BamHI powinien znaleźć się HindIII.

- Nie wyjaśniono jaka jest kontrola dla cięcia enzymem BamHI (HindIII?) (Ryc.IV)? Kontrolą nie może być plazmid w formie niezmodyfikowanej (nietrawiony enzymem). Wektory, nietrawione nie wędrują w elektroforezie zgodnie ze swoją masą, dlatego nie mogą stanowić jedynej kontroli i nie można ich odnosić do próbki badanej migrującej w formie liniowej. Brak wyników cięcia restrykcyjnego nie oznacza, że plazmid pMIR-GFP nie posiada miejsca restrykcyjnego, może być to wynikiem np. braku aktywności enzymu restrykcyjnego lub warunków przeprowadzenia doświadczenia. Dlatego nie można wyciągnąć żadnych wniosków z wyników przedstawionych na Ryc. IV (B i C). Ostatecznym krokiem w konstrukcji wektorów powinno być ich sekwencjonowanie. Tu brakuje takiej informacji.

- Analiza funkcjonalności wektorów reporterowych pMIR-GFP i działania inhibitorów również nie jest jasna. Na tej analizie oparte zostało założenie, że zmodyfikowane wektory oraz zastosowane inhibitory działają specyficznie. Wykres przedstawiający pomiar fluorescencji (Aneks I wykres VIII) powinien, jako niezwykle istotny, znaleźć się w części opisującej wyniki. Jednak brakuje na tym wykresie słupków błędów i zaznaczenia istotności statystycznej. Nie wiadomo również ile razy doświadczenie było powtarzane a zastosowanie inhibitora nie przekonuje. Przy zastosowaniu wektora pMIR-GFP-192-5p przywrócenie świecenia wynosi 20%, przy wektorze pMIR-GFP-192-3p ok. 15%, a przy zastosowanym w dalszych częściach pracy pMIR-GFP-662-5p jedynie kilka procent.

- W podrozdziale: Konstrukcja wektorów reporterowych część 3.6.2.5. Doktorantka pisze, że dodano 2-3  $\mu\text{l}$  mieszaniny ligacyjnej. Nie wyjaśniono od czego zależało dodanie 2 czy 3  $\mu\text{l}$ ?

2. W części obejmującej „Transfekcję inhibitorami miRNA” brakuje, bądź nie znalazłam, opisu w jaki sposób wykonywano badania wpływu wyciszenia ekspresji badanych miRNA na chemiowrażliwość, migrację komórek i klonogenność. W pracy nie natknęłam się również na informację jak przygotowywano komórki do doświadczeń, po jakim czasie od transfekcji prowadzono doświadczenia. Nie wiadomo również, co stanowi kontrolę negatywną w doświadczeniach z inhibitorami miRNA. Czy jest to inhibitor o sekwencji nieodpowiadającej sekwencjom genomu ludzkiego? Czy jest to kontrola polecana przez firmę Exiqon (scrambled miRNA LNA<sup>®</sup> inhibitor negative control A) wspomniana w rozdziale 3.7.2 przy opisie transfekcji inhibitorami miRNA jako „kontrola negatywna A”? Czy też komórki niczym nie traktowane?
3. W pracy brakuje mi również dokładnego opisu przygotowania próbek do analizy transkryptomu. Po jakim czasie od transfekcji inhibitorami miRNA izolowano RNA? Czy w próbkach tych sprawdzano poziom wyciszenia badanych miRNA? Ile powtórzeń zastosowano dla każdego badanego warunku? Co stanowiło kontrolę?

#### **W części "Wyniki":**

1. Z opisu zawartego w części metodycznej można wywnioskować, że wyniki z testu MTT pochodzą po 24 godzinach inkubacji z badanymi lekami (cisplatyna i etoposyd). Czy doktorantka wydłużała czas hodowli w obecności leków? Dlaczego do dalszych analiz nie wybrano np. linii HCC827 czy A549, które również charakteryzowała nadekspresja badanych miRNA względem linii H1703?
2. Wyniki analizy zdolności klonogennych komórek H520 i H1703 powinny zostać uzupełnione o wykres przedstawiający liczbę kolonii a zdjęcia powinny stanowić jedynie wzbogacenie przedstawionych wyników.
3. Wyniki z testu klonogenego przedstawione na Ryc.29 według Doktorantki wykazują istotność statystyczną zaznaczoną na poziomie  $p < 0,001$ . Budzi to, przy aż tak dużych słupkach błędów, poważne wątpliwości. Autorka nie podaje również czy jest to błąd statystyczny, czy odchylenie standardowe
4. Odwołując się do Ryc. 26 przedstawiającej test migracyjny makrofagów, na wykresie zaznaczono istotność statystyczną (\*\*\*) i dodano linię poziomą. Czy linia ta wskazuje na różnicę w migracji pomiędzy makrofagami M2 migrującymi w kierunku różnych linii

komórkowych? Czy też wskazuje na istotną statystycznie różnicę w migracji populacji M2 w stosunku do kontroli? Co stanowiło kontrolę w tym doświadczeniu? Co oznacza stwierdzenie „czysta pożywka”? Można wnioskować, po ilości komórek, które przemigrowały, że była to pożywka wzbogacona surowicą, która może stanowić kontrolę pozytywną. Brakuje tu kontroli negatywnej, czyli pożywki pozbawionej surowicy, co pozwoliłoby na rzeczywiste porównanie chemotaksji migrujących makrofagów w kierunku komórek SCC. Dlaczego nie sprawdzono zdolności do migracji makrofagów w kierunku komórek z wyciszoną ekspresją miRNA?

5. Nie jest jasne co stanowi kontrolę dla poszczególnych doświadczeń z inhibitorami miRNA? Co oznacza kontrola negatywna na rycinach 27 – 30 i kontrola negatywna A na Ryc. VI i VIII (Aneks I).
6. W pierwszej części pracy w teście MTT Doktorantka podaje wartości IC50 dla etopozydu 693 dla komórek H520 i 80 dla H1703 (Tabela 4). Natomiast w teście MTT przeprowadzonym po wyciszeniu miRNA wartości dla kontroli są zupełnie inne. Podobnie jest dla wyników po zastosowaniu cisplatyny i inhibitorów (Ryc. 27 i 28). Z czego wynikają te różnice?
7. Jakość prezentowanych zdjęć Ryc. 22, Ryc. 23 a zwłaszcza Ryc. 25 mogłaby być lepsza.

#### **W części "Dyskusja":**

1. W dyskusji brakuje zdecydowanie odniesienia do bardzo niskiego poziomu wyciszenia miR-662-5p po zastosowaniu inhibitorów (Ryc.VIII). Wynik ten, na którym oparto założenie specyficznego działania zastosowanego inhibitora budzi wątpliwości i powinno to zostać wytłumaczone w dyskusji.
2. Uważam, że w pracy powinna się znaleźć krótka dyskusja tłumacząca, dlaczego po uzyskaniu wyników z sekwencjonowania nie potwierdzono w badanym układzie zmiany ekspresji konkretnych transkryptów a także białek potencjalnie zaangażowanych w obserwowane zmiany fenotypowe. Szczególnie interesujące wydają się tu geny i białka związane ze ścieżką EMT czy szlakiem Wnt.

W pracy są również nieliczne błędy stylistyczne i interpunkcyjne.

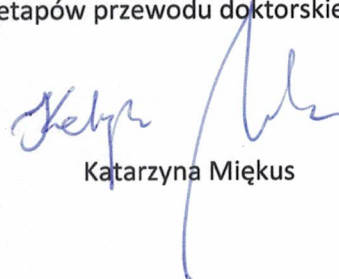
Pomimo tych zastrzeżeń chciałabym jeszcze raz podkreślić, że w pracy uzyskano wiele interesujących wyników, które dostarczyły nowych danych na temat roli miR-662 i miR-192 i znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat tych miRNA w komórkach płaskonabłonkowego raka płuca. Niewątpliwie

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ  
Zakład Biochemii Ogólnej

dobrym pomysłem było zestawienie cech fenotypowych komórek H520 i H1703 w Tabeli 6 oraz przedstawienie w tabelach (7 i 8) liczby zmienionych transkryptów oraz genów i ich korelacji z procesami biologicznymi. Dyskusja przeprowadzona jest bardzo dobrze i świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu. W dyskusji Doktorantka odnosi się do własnych wyników, ale też bardzo szeroko dyskutuje potencjalne geny i ścieżki sygnałowe regulowane przez badane miRNA odnosząc je do uzyskanych wyników.

Praca jest nowatorska, pokazuje bardzo dobre opanowanie bardzo szerokiego wachlarza metod. Wykonane analizy są czasochłonne, pracochłonne, zwłaszcza hodowle tak wielu linii komórkowych czy optymalizacja transfekcji inhibitorami miRNA.

W mojej opinii, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę więc do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Martyny Filipskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Katarzyna Miękus