

Dr hab. n. med. Marzena Anna Lewandowska, MBA
Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Beaty Naróżnej pt. „Analiza roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego na modelu in vitro”


Wśród epigenetycznych mechanizmów regulujących ekspresję genów należy wymienić metylację DNA, modyfikację białek histonowych, zmiany konformacji chromatyny oraz miRNA. Potranskrypcyjny mechanizm regulacji genów przez miRNA, które łączy się z konkretnym mRNA w celu zmniejszenia procesu translacji i zwiększenia degradacji matrycowego RNA, jest dobrze poznany. Niemniej jednak poszczególne „cele” (geny kodujące białka) dla danego miRNA (których może być kilkanaście jak i kilkadziesiąt), są nadal przedmiotem wielu badań podstawowych. Co więcej, fakt, że te krótkie 20-25 nukleotydowe cząsteczki RNA są stabilne, czyni je również potencjalnymi dobrymi biomarkerami w nieinwazyjnej diagnostyce. Przykładowo, zaburzenia ekspresji opisywanego w rozprawie doktorskiej miRNA -328, w chorobach nowotworowych dają złe rokowania dla pacjenta z ostrą białaczką szpikową czy niedrobnokomórkowym rakiem płuca przy niskiej ekspresji miRNA-328. Natomiast wysoka ekspresja miR-328 dostarcza informacji o potencjalnie lepszej odpowiedzi pacjentów zdiagnozowanych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca na radioterapię; znana też jest rola tego miRNA w chemiooporności w glejakach czy raku piersi jak również w rozwoju przerzutów raka jelita grubego do wątroby. Profilowanie miRNA tkanki nowotworowej, weryfikacja tych danych łącznie z dalszą identyfikacją potencjalnych celów dla wybranych miRNA, było i jest przedmiotem wielu projektów. Natomiast poszukiwanie potencjalnych miRNA jako biomarkerów w astmie czy zaostrej chorobie oskrzelowo-płucnej u dzieci chorych na mukowiscydozę wydaje się być unikalnym tematem badawczym realizowanym w zespole dr hab. n. med. Aleksandry Szczepankiewicz.

Mając na uwadze powyższe doświadczenie Promotora i jej współpracę z naukowcami z Uniwersytetu w Southampton (Lackie PM, Holloway JW.) w zakresie wykorzystania nowoczesnych technik jak i bioinformatycznych narzędzi niezbędnych do identyfikacji miRNAs odpowiedzialnych za procesy odbudowy uszkodzeń nabłonka oddechowego, jak również nieliczne badania i publikacje na w/w temat - wybór tematu rozprawy należy uznać za bardzo atrakcyjny. Rozprawa pt. „Analiza roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego na modelu in vitro” została zrealizowana w Pracowni

Badań Komórkowych i Molekularnych Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Praca była sfinansowana z badania dla młodych naukowców Uniwersytetu Medycznego oraz częściowo z grantów NCN: Harmonia (2011/01/M/NZ3/02906) oraz Preludium (2017/25/N/NZ3/00332). Na uwagę zasługuje też fakt, że niektóre badania były powtórzone a inne wykonane po raz pierwszy na Uniwersytecie w Southampton (Wielka Brytania) podczas stypendium wyjazdowego Doktorantki (doszczegółowienie w dalszych fragmentach recenzji).

Rozprawa doktorska została przygotowana w nowatorskiej formie, gdzie podstawę merytoryczną stanowi cykl trzech publikacji wydanych w uznanych międzynarodowych czasopismach o łącznym Impact Factor = 5,452 indeksowanych w bazie SCOPUS, a osiągnięcie badawcze jest omówione na tle aktualnego stanu wiedzy. W związku z taką formą, przygotowana do recenzji, rozprawa wydaje się być krótsza od klasycznych rozpraw, gdyż zawiera 52 strony wydruku komputerowego, ale należy zauważyć, że strony od 18-24, od 26-33, od 37-44 zawierają już zrecenzowane kopie manuskryptów o bogatej treści, z dobrze przygotowanymi rycinami i tabelami - w większości publikowanymi w zwartej formie kolumn, opublikowane przez znane wydawnictwa takie jak Elsevier czy Springer.

Prezentowana praca doktorska nie ma „klasycznych rozdziałów” jak wstęp, metodologia, wyniki czy dyskusja; niemniej jednak jej układ jest logiczny, podzielony na 10 rozdziałów, gdzie konsekwentnie doktorantka wykazuje się wiedzą teoretyczną jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Praca doktorska rozpoczyna się spisem treści z wydzielonymi rozdziałami i podrozdziałami, z których najważniejszymi, moim zdaniem są, omówienie założenia i celu pracy, omówienie cyklu publikacji wraz z zamieszczeniem tych prac i wnioski. W pierwszej części rozprawy doktorantka w zwięzły sposób przedstawia problem chorób przewlekłych z długotrwałym procesem zapalnym dróg oddechowych, w wyniku którego dochodzi do znaczących zmian w budowie nabłonka oraz wspomina o mało poznanej roli miRNA w naprawie nabłonka oddechowego. Dalej, cel pracy zostaje prawidłowo sformułowany, jako ocena wpływu miRNA na naprawę uszkodzonego nabłonka oddechowego *in vitro*; aby go osiągnąć doktorantka zaplanowała szereg eksperymentów które można poszeregować jako: (I) badanie profilu ekspresji miRNA w czasie naprawy uszkodzenia, (II) weryfikację wybranych miRNA (III) poszukiwanie genów docelowych regulowanych przez miRNA, (IV) badanie czasu naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego w przypadku wyciszenia ekspresji miRNA za pomocą siRNA skierowanym przeciwko DROSHA i DICER. O ile w omówieniu cyklu prac - metodologia i wyniki prac są raczej opisane pobieżnie, o tyle w publikacjach są opisane z niezwykłą starannością, zarówno część laboratoryjna jak i narzędzia bioinformatyczne łącznie z podaniem stron internetowych lub publikacją oraz krótkim opisem algorytmów komputerowych. Następnie Doktorantka konfrontuje swoje badania z doniesieniami literaturowymi (21 pozycji literaturowych w rozprawie; 43 pozycje literaturowe w I publikacji; 27 pozycji literaturowych w II publikacji, 33 pozycje literaturowe w III publikacji; należy zaznaczyć że niektóre pozycje



literaturowe są powtarzane w poszczególnych publikacjach czy rozprawie – ale proceder ten jest nieunikniony zwłaszcza przy cytowaniu metodologii i dostępnych narzędzi bioinformatycznych). W podsumowaniu omówienia osiągnięcia badawczego - doktorantka formułuje właściwe wnioski dla całego cyklu publikacji. Przedstawienie konkluzji w formie osobnego podrozdziału i usystematyzowanie ich w 7 najważniejszych wniosków wskazuje na zdolności analityczne i dobrą znajomość badanych przez doktorantkę zagadnień. Drobna uwaga dotyczy wniosku nr 7 (str. 10), który moim zdaniem określa raczej przyszły kierunek badań, który może planuje doktorantka, niż jeden z najważniejszych wniosków z badań; tym niemniej warto było ten kierunek badań sprecyzować, gdyż pokazuje potencjał aplikacyjny badań podstawowych w zakresie epigenetycznego mechanizmu regulacji genów przez miRNA.

Dalej w rozprawie zawarte są poprawnie przygotowane streszczenia rozprawy w języku polskim i języku angielskim oraz opinia komisji bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, informująca że badanie nie nosi cech eksperymentu medycznego. Ostatni rozdział zawiera komplet oświadczeń zarówno doktorantki o jej wkładzie w powstanie publikacji, jak i oświadczenia pozostałych współautorów cyklu prac - opisujące wkład merytoryczny i procentowy każdego z autorów. Na uwagę zasługuje fakt, że wg podrozdziałów „Acknowledgements” w I i III publikacji wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, dowiadujemy się że doktorantka uzyskała prestiżowe krótko-terminowe stypendium wyjazdowe na Uniwersytet w Southampton, co miało swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w powstaniu publikacji stanowiących rozprawę doktorską; Ponadto, opublikowany na stronie internetowej The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) raport z pracy naukowej Pani Beaty Narożnej podczas prawie półrocznego stypendium w 2015 roku (projekt pt. „MicroRNA Silencing In Airway Epithelial Wound Repair With The Use Of Time Lapse Microscopy”) – nie pozostawia najmniejszych wątpliwości dotyczących jej znaczącego wkładu w powstanie tychże prac, co zostało opisane przez kandydatkę we wcześniej wspomnianych oświadczeniach (str. 49) i oświadczeniach współautorów prac (str. 50-52 rozprawy doktorskiej).

Ponieważ przedstawiony cykl trzech prac jest spójny, zawiera bardzo dobry poziom naukowy a będąc publikowany w czasopismach z bazy JCR (ze wskaźnikami IF odpowiednio dla I publikacji: IF=1.792; II publikacji IF=1.904; III publikacji IF=1.756) był wielokrotnie recenzowany i edytowany - czuje się zwolniona z obowiązku recenzowania samych opublikowanych już artykułów, ale pozwolę sobie wymienić najważniejsze moim zdaniem osiągnięcia doktorantki, w każdej z tych prac.

Publikacja I:

1. Wyciszenie ekspresji mRNA DICER i DROSHA w liniach 16HBE14o⁺ oraz NHBE spowodowało istotne statystycznie wydłużenie czasu naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego.

2. Analiza ekspresji miR-328, miR-342, miR-411, miR-609, miR-888 wykazała, że tylko miR-328 istotnie wpływa na szybkość naprawy nabłonka oddechowego, najprawdopodobniej przez kontrole szlaku sygnału regulacji cytoszkieletu aktywnego.

Publikacja II:

1. Zidentyfikowano 2 wspólne profile ekspresji miRNA (profil 9 składający się z 42 genów miRNA; i profil 17 składający się z 11 genów miRNA) i scharakteryzowano potencjalne cele i szlaki sygnałowe jakie mogą regulować.
2. Scharakteryzowano miR-455-3p, wykazujący w badaniach eksperymentalnych istotne zmiany ekspresji 16 h po uszkodzeniu i wykazano negatywną korelację z ekspresją dwóch genów ze szlaku TGFB.

Publikacja III:

1. Zidentyfikowano wspólny profil 10 genów miRNA (niezależnie od linii badanej), które biorą udział w regulacji podstawowych procesów związanych z naprawą (miR-107, miR-139, miR142-3p, miR-143, miR-146b-3p, miR-214, miR-23b, miR-296, miR384, miR-424).
2. Wydedukowano, że linia ustalona (16HBEo-) jest lepszym modelem badawczym do analizy wpływu miRNA na proces naprawy.

Tekst rozprawy został napisany poprawnie, ale w kilku fragmentach należałoby dokonać korekty językowej w związku z drobnymi niedociągnięciami edytorskimi lub wnieść uzupełnienia dotyczące drobnych uchybień:

- Str 2: na podstawie informacji zawartych w cyklu publikacji - wydaje się zasadne, aby dodać stypendium EAACI jako czwarte źródło finansowania.
- Str 6: proponuje: (ang. remodeling) lub użycie polskich słów jak przemodelowanie, zreorganizowanie.
- Str 6: proponuję: zbudowane z 21-25 nukleotydów; lub mające długość od 21 -25 nukleotydów.
- Proszę ujednoczyć nazewnictwo miRNA (miR, miRNA, mikroRNA); o ile dla konkretnych miRNA Doktorantka podaje prawidłowy zapis (np. miR-455-3p), to w ogólnym opisywaniu miRNA, Doktorantka pozwoliła sobie na zbyt dużą dowolność zamiennego nazewnictwa np.: „zmniejszona ekspresja tego miRa w naszych badaniach...”, „zmniejszona ekspresja tego miR w naszym eksperymencie”, „zbadanie profilu ekspresji miRNA”, „istotnym wpływie mikroRNA”.
- Proszę o uzupełnienie opisu o 10 genach miRNA. Niefortunne uogólnienie znajduje się w omówieniu osiągnięcia, wnioskach i streszczeniach. Aby znaleźć informację konkretnie, jakie 10 miRNA zostało zidentyfikowanych - należy przejść przez gęszcz informacji: odnaleźć publikację 12 piśmiennictwa rozprawy, która jest III publikacją

z cyklu prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej; stamtąd po lekturze całego artykułu przechodzimy na stronę 45 rozprawy, gdzie w tabeli S1 ujętych jest 10 wyselekcjonowanych miRNA (miR-107, miR-139, miR142-3p, miR-143, miR-146b-3p, miR-214, miR-23b, miR-296, miR384, miR-424). Sugeruję najprostsze rozwiązanie, aby za pierwszym razem na stronie 9 wypisać wszystkie 10 genów miRNA rozdzielając je przecinkiem; jest to o tyle ważne aby je wymienić, gdyż w dalszych fragmentach omówienia Doktorantka opisuje ich potencjalną rolę i jakie geny mogą regulować.

Lektura rozprawy doktorskiej, w szczególności cyklu publikacji jest ciekawa i nakłania mnie do zadania kilku pytań o charakterze dyskusyjnym, z możliwością odpowiedzi w trakcie publicznej obrony:

- 1) W podrozdziale 3.2 (w omówieniu osiągnięcia badawczego na tle aktualnego stanu wiedzy) – zabrakło szerszej konfrontacji wyników własnych z piśmiennictwem z ostatnich 2-3 lat. Proszę Doktorantkę o przykładowe przedyskutowanie swoich wyników celów (TGF- β) dla miR-455-3p oraz ich potencjału aplikacyjnego wobec ubiegłorocznych doniesień w The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine o miR-145 i, jego roli w regulacji genu TGF- β w nabłonku dróg oddechowych oraz możliwościach terapeutycznych u pacjentów chorujących na mukowiscydozę.
- 2) Doktorantka - w celu identyfikacji profilu miRNA - używała metod PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu Taqman co doprowadziło ją do wyselekcjonowania 10 genów miRNA, które biorą udział w regulacji procesów naprawczych. Czy dziś Doktorantka mając fundusze i potencjalne większe możliwości użycia sekwencjonowania nowej generacji - użyłaby tej samej metodologii? Jakie są ograniczenia wybranej metody i użytej chemii; czy mogły one wpłynąć na uzyskane wyniki? Czy Doktorantka zna przykłady analiz ekspresji miRNA w nabłonku dróg oddechowych z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technologii?
- 3) Normalizowanie danych ekspresji miRNA było z użyciem danych ekspresji endogennego U6 snRNA. Czy mając własne dane z analizy 378 miRNA bądź na podstawie danych literaturowych, czy z dostępnych baz danych Doktorantka może zaproponować dodatkowe miRNA, których ekspresja jest na stałym poziomie w komórkach nabłonka i mógłby posłużyć jako dodatkowa kontrola?
- 4) Strony 34 i 35 zawierają tabele ze szczegółowym profilem 9 i 17. Jako recenzent zdaję sobie sprawę, że szczegółowe badania lub chociażby opis każdego z miRNA, ich funkcji, potencjalnych celów i osobne przedyskutowanie wyników dla badanych miRNA - znacząco wykracza poza cel tej pracy; niemniej jednak – zaintrygowała mnie Rodzina miR-449, która jako jedyna była obecna w obydwu profilach (profil 9: hsa-miR-449B-001608; profil 17: hsa-miR-449-001030). Rola tych miRNA w różnicowaniu komórek nabłonkowych jest istotna i dobrze

poznana na modelu zwierzęcym, gdzie wykazano, że myszy pozbawione miR-34/449 wykazują niepłodność i ciężką przewlekłą chorobę dróg oddechowych (Otto i wespół. 2017 PNAS). Bardzo proszę Doktorantkę o skomentowanie wyników ekspresji mierzonych w różnych odstępach czasowych dla tej Rodziny miR-449 wobec danych literaturowych o represji cyklu komórkowego za pośrednictwem miR-449, w celu umożliwienia różnicowania komórek nabłonka.

Należy z całą stanowczością zaznaczyć, że powyższe punkty dyskusyjne wynikają jedynie z ciekawego, unikalnego tematu pracy badawczej oraz wnikliwej analizy rozprawy doktorskiej i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć naukowych zaprezentowanych przez Doktorantkę.

Podsumowując swoją opinię o rozprawie doktorskiej, chciałabym jednoznacznie stwierdzić, że wysoko oceniam jej poziom naukowy, a opublikowane wyniki prac znacząco poszerzają wiedzę w zakresie roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego. Ponadto, połączenie wiedzy biologii komórki jak i biologii molekularnej z szerokim wachlarzem technik zarówno eksperymentalnych jak i „in silico” świadczą, że Doktorantka jest doświadczonym naukowcem. Na szczególną uwagę również zasługuje fakt, że umiejętność aplikowania się o zagraniczne stypendia naukowe, zakończone sukcesem (stypendium EAACI) łącznie ze zdobywaniem dodatkowych środków finansowych na prowadzenie dalszych badań podczas studiów doktoranckich, świadczy zarówno o znakomitej relacji naukowej promotor-doktorant, dzięki której możliwe było przez promotora odkrywanie i rozwijanie potencjału doktorantki, a w późniejszych latach - dojrzałości naukowej doktorantki. Tę samodzielność i dojrzałość doktorantki dodatkowo poświadcza fakt, że Pani Beata Narożna w lutym 2018 roku rozpoczęła 36-miesięczny projekt, już jako kierownik projektu Preludium (NCN, 2017/25/N/NZ3/00332), którego tematyka jest ściśle związana z wynikami opublikowanymi w I artykule cyklu publikacji w prezentowanej rozprawie.

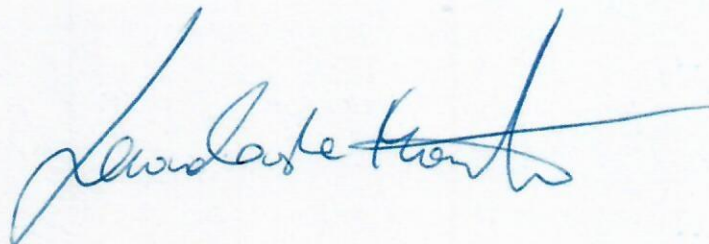
Wniosek końcowy:

Przedstawiona do oceny rozprawa pod tytułem „Analiza roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego na modelu in vitro” na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, spełnia wszystkie wymagania określone w art.13 ust.1 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 późn. zm.) oraz w § 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora. W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu

Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Beaty Narożnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoką jakość unikalnych badań, jak i umiejętność transferu wiedzy w zakresie analiz mikroskopowych w czasie rzeczywistym i analiz ekspresji miRNA w różnych punktach czasowych naprawy uszkodzenia - zwracam się do Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Bydgoszcz, 7.01.2019 r.



Dodatkowe źródła:

1. <https://www.eaaci.org/activities/fellowships/awardees-achievements/3277-2015.html>
2. <https://www.eaaci.org/images/pdf.files/Fellowship-reports/Research Fellowship Report Beata Narożna.pdf>