

Pracownia Multiomiki Chorób Człowieka
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk
ul. A. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa



Warszawa 16.04.2022

RECENZJA RZOPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANNY BALCERAK

pt. „Próba oszacowania molekularnej funkcji transkryptów oraz nowo odkrytego mikropeptydu kodowanego przez gen *CRNDE* oraz ich wpływu na wybrane aspekty procesu nowotworzenia”

Rozprawa doktorska pani mgr Balcerak jest wartościowym zbiorem informacji i wyników badawczych na temat roli ekspresji genu *CRNDE* zarówno jako niekodujących transkryptów, jak mikropeptydu, przede wszystkim w raku jajnika, z implikacjami dla innych chorób nowotworowych.

Rozprawę rozpoczyna klarowne streszczenie wyników i wstęp, celnie podsumowujący wiedzę zarówno o patologii i epidemiologii raka jajnika, dotychczasową wiedzę na temat genu *CRNDE*, jak i wybranych procesów komórkowych, które są przez *CRNDE* regulowane. Na pochwałę zasługuje dział Materiały i Metody, zawierający wyczerpujący opis zastosowanych metod badawczych, a także informacje na temat wyników pomocniczych działań wykonanych w laboratorium doktorantki, w celu uzyskania np. wektorów czy linii komórkowych, stosowanych podczas głównych doświadczeń.

Wyniki doświadczalne przedstawione są w jasnych i łatwych do prześledzenia rozdziałach. Wy tłumaczony jest dobór linii komórkowych, logika wyciszenia i nadekspresji *CRNDE*. Pokazane są szczegóły wykonanych doświadczeń sekwencjonowania RNA – zarówno kontrolne podstawy, jak analiza ontologii szlaków i procesów molekularnych zasocjowanych z wynikami analizy różnicowej RNA-seq. Zademonstrowane są wyniki wpływu genu *CRNDE* na liczebność komórek, indeks mitotyczny, elementy cytoszkieletu oraz wrażliwość na cytostatyki. Pokazane są wyniki doświadczeń oceniających interakcję mikropeptydu CRNDEP z wewnątrzkomórkowymi partnerami oraz jej krótka walidacja.

Całość zamknięta jest szczegółową dyskusją, pozwalającą umiejscowić przedstawione wyniki w dotychczasowej wiedzy na temat genu *CRNDE*, mikropeptydu CRNDEP oraz ich

potencjalnego znaczenia w diagnostyce i leczeniu nowotworów. Dokładnie opisane są też specyfika i trudności doświadczeń polegających na badaniu interaktomu mikropeptydów.

Rozprawa stanowi bogaty, różnorodny i logiczny zbiór doświadczeń, prowadzący do spójnych konkluzji, co potwierdza bardzo dobry poziom naukowy doktorantki. Dla mnie wyjątkowo wartościowe były próby spojrzenia na problemy badawcze z kilku storn – np. równoległe użycie kilku bioinformatycznych narzędzi do analizy asocjacji wyników wysokoskalowych ze szlakami molekularnymi czy badanie wpływu *CRNDE* na elementy cytoszkieletu komórek nowotworowych zarówno poprzez obserwacje bezpośrednie, jak pośrednie badanie wrażliwości na cytostatyki trafiające w metabolizm cytoszkieletu. Bardzo wartościowa jest też próba rozróżniania funkcjonalnego dwóch trudnych do badania, ale bardzo istotnych dla przyszłości badań molekularnych nad nowotworami cząsteczek – długich niekodujących RNA i mikropeptydów – tu pochodzących z tego samego locus.

Jak przy każdej pracy doktorskiej, także tu można wymienić kilka słabszych punktów, choć nie są one kluczowe i nie wpływają znacząco na całościowy pozytywny odbiór rozprawy. Moim zdaniem słaba jakość wyników metody western blot – np. na Ryc. 18, 20, 55 – być może podyktowana ograniczeniami technicznymi, wpływa na jednoznaczny odbiór tych wyników. Innymi ograniczeniami przedstawionych wyników są kwestie, których dotyczą moje dodatkowe, poniższe pytania – braku pokazanej w rozprawie walidacji m.in. wyników transkryptomicznych czy potwierdzenia interakcji z mikropeptydem CRNDEP w komórkach raka jajnika.

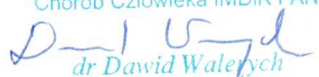
Nie są to jednak problemy, które wpływają na ostateczny wysoki poziom wyników naukowych wniosków rozprawy, ani na mój ogólnie bardzo dobry jej odbiór. Praca jako całość zasługuje na wysoką ocenę i spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii o dopuszczenie mgr Anny Balcerak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Moje dodatkowe pytania naukowe (podyktowane przede wszystkim ciekawością, nie krytyką):

1. Czy geny reprezentujące procesy wybrane w analizie ontologicznej wyników sekwencjonowania RNA były walidowane (potwierdzone) w innych doświadczeniach? Na Ryc. 36-38 pokazane jest bardzo ładnie umiejscowienie białek kodowanych przez szereg tych genów i kierunek zmiany ich ekspresji w znalezionych w analizie szlakach molekularnych. Czy poza dalszym badaniem samych szlaków/procesów molekularnych

- sprawdzona została/będzie ekspresja wybranych z tych genów technikami niskoskalowymi (qPCR, western blot) w komórkach z wyciszonym *CRNDE*, z nadekspresywowanym *CRNDE* (przeciwny spodziewany kierunek zmiany ekspresji) czy innych układach doświadczalnych?
2. Czym spowodowane było przejście w doświadczeniach nad mikropeptydem *CRNDEP* z komórek raka jajnika na komórki HeLa (raka szyjki macicy)? Czy wyniki interakcji, uzyskane metodą wysokoskalową (spektrometria mas) w komórkach HeLa mogą być potwierdzone metodami niskoskalowymi (np. co-IP) w innych układach doświadczalnych – przykładowo w liniach komórkowych raka jajnika, po nadekspresji np. z wektora wirusowego?
 3. Czy przy badaniu genu *CRNDE* możliwe jest przeprowadzenie doświadczeń, lub może porównania już otrzymanych wyników dla RNA i białka, pozwalających na oddzielenie od siebie funkcjonalnie efektów niekodujących transkryptów *CRNDE* od mikropeptydu *CRNDEP*?
 4. W raku jajnika wyjątkowo licznie spośród innych nowotworów występują mutacje genu *TP53*. Poza inaktywacją dzikiego białka p53, wspomnianego w pracy doktorskiej, jest wśród nich dużo mutacji typu zmiany sensu, które często skutkują ekspresją aktywnie onkogennych wariantów *TP53* (tzw. gain-of-function [GOF] mutantów p53). Co wiadomo jest o ew. współdziałaniu/współistnieniu mutantów p53 typu GOF i ekspresji *CRNDE*?
 5. Generalnie – jakie są dalsze kierunki badań nad genem *CRNDE* w laboratorium doktorantki i jej udział w nich, z myślą o ew. kolejnych publikacjach?

Z gratulacjami i wyrazami szacunku

KIEROWNIK
Pracowni Multi-omiki
Chorób Człowieka IMDiK PAN

dr Dawid Walefych