

Gabriel Wcisło, dr hab. med.

Onkologia

Europejskie Centrum Zdrowia w Otwocku

OCENA

Osiągnięcia naukowego dr n. med. w dyscyplinie biologia medyczna Łukasza Michała Szafrona zatrudnionego – od października 2006 do nadal- w Zakładzie Genetyki w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, w związku z postępowaniem habilitacyjnym wszczętym przed Radą Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego oraz Rady Doskonałości Naukowej w Warszawie, o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

1. Udokumentowanie wniosku i podstawa prawna

Na wstępie bardzo serdecznie dziękuję Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, za zaproszenie mnie do uczestnictwa w procesie postępowania habilitacyjnego Pana Doktora L.M. Szafrona, jako recenzent. Zostałem powołany na jednego z recenzentów w postępowaniu habilitacyjnym Pana Doktora L. M. Szafrona na podstawie art. 221 ust. 5 ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) oraz art. 29 ust. 2 pkt 14 ustawy z dnia 30 kwietnia 2010 o instytutach badawczych (tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 534) oraz uchwały nr 41/2025 Rady Naukowej z dnia 19 marca 2025 r. oraz uchwały Rady Doskonałości Naukowej (art. 221 ust 4. Z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. z 2024 , poz. 1571. w sprawie określenia trybu postępowania i nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Ocenę osiągnięcia naukowego oraz całości dorobku naukowego, organizatorskiego i popularyzującego naukę dokonałem w oparciu o przesłane źródła i kopie dokumentów:

1. Wniosek i dane wnioskodawcy z dnia 27 listopada 2024
2. Kopia dyplomu doktora nauk medycznych i innych dyplomów zawodowych
3. Otrzymane granty i nagrody
4. Autoreferat
5. Osiągnięcie naukowe w oparciu cykl sześciu publikacji
6. Oświadczenia współpracowników
7. Kopie publikacji będących podstawą postępowania habilitacyjnego w oparciu o cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych

8. Potwierdzenie innych aktywności naukowych
9. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego opracowana przez Bibliotekę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie
10. Wniosek końcowy

Ad. 1.

Doktor Łukasz Michał Szafron jako Habilitant złożył wniosek dnia 27 listopada 2024 roku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne w oparciu o określenie osiągnięcia naukowego zatytułowanego:

Poszukiwanie nowych molekularnych markerów prognostycznych i predykcyjnych u pacjentek z guzami jajnika o zróżnicowanej agresywności.

Wniosek jest przeprowadzany w oparciu o art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) z przeprowadzeniem głosowania jawnego.

Ad. 2.

Habilitant dostarczył w wersji elektronicznej kopie oryginalnych dyplomów: naukowego doktora nauk medycznych w dziedzinie biologii medycznej oraz dyplomów zawodowych, tj.

- Dyplom doktora nauk medycznych na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt: „A Search For A New Molecular Prognostic Markers in Ovarian Cancer Patients” (12 czerwca 2013)
- Dyplom potwierdzający tytuł specjalisty w dziedzinie laboratoryjna genetyka medyczna po złożeniu Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego Diagnostów Laboratoryjnych w dniu 30.11.2016 roku.
- European Board Of Medical Genetics, April 15, 2018

Ad.3.

Granty realizowane przez Habilitanta:

- 1. Narodowe Centrum Nauki 2020/37/ B/ NZ5/042 15

„Kompleksowa charakterystyka mikrośrodowiska granicznych, wysoko zróżnicowanych oraz nisko zróżnicowanych surowiczych guzów jajnika w kontekście cech kliniczno patologicznych, w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji”, 2021 – 2024, 1 233 600 PLN, Realizowany

- 2. Narodowe Centrum Nauki 2016/23/ D/ NZ5/014 53

„Analiza molekularna genu CRNDE oraz próba oszacowania funkcji i klinicznego znaczenia nowo odkrytego mikropeptydu kodowanego przez ten gen”, 2017 – 2020, 400 000 PLN, Rozliczony

- 3. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N407 027238

„Poszukiwanie molekularnych markerów prognostycznych u pacjentek z rakiem jajnika”, 2010 – 2012, 50 000 PLN, Rozliczony

- 4. Perlman.com.pl-KONKURS VISIUM SCIENTIFIC CHALLENGE 2022- ok. 30 000 PLN Realizowany 5 plgrid.pl ovcarnas eq

„Analiza wyników sekwencjonowania następnej generacji (NGS)”, 2019 – 2020, 5000 godzin, Rozliczony

- 6. Fundacja Jakuba hr. Potockiego 657/19 Ocena klinicznego znaczenia zmian liczby kopii genu CEBPA oraz ich wpływu na przeżycie i odpowiedź na leczenie u pacjentek z rakiem jajnika 2019 – 2020, 99 500 PLN, Rozliczony

-7. NIO-PIB SN/ GW05/2 015

„Badanie genu CRNDE oraz jego nowo odkrytego produktu białkowego metodami molekularnymi i immunohistochemicznymi. Próba określenia roli peptydu CRNDEP w procesach nowotworzeni”, 2015 – 2016, 50 000 PLN, Rozliczony

Nagrody Habilitanta:

- 2015 Nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za artykuł:

„ The putative oncogene CRNDE is a negative prognostic factor in ovarian cancer patients.” Oncotarget 2015; 6(41): 43897-43910

-2016.04.07 Polska Akademia Nauk, Wydział Nauk Medycznych za rozprawę doktorską:

“A Search For A New Molecular Prognostic Markers in Ovarian Cancer Patients.”

-2019 List nominacyjny: Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju

Ad.4.

W autoreferacie Habilitant przedstawił swoją historię zatrudnienia w branży medycznej i przebieg procesu edukacyjnego oraz przedstawił – krótko i treściwie - raka jajnika w kontekście badań oryginalnych jakie przeprowadzał zespołowo zarówno w swoim macierzystym miejscu zatrudnienia jak i z innymi współautorami pochodzącymi z różnych podmiotów naukowych nie tylko w Polsce ale i w Europie.

Przebieg pracy zawodowej związany jest z osiąganiem poszczególnych etapów edukacyjnych potwierdzanych w postaci określonych dyplomów i zaświadczeń.

- Grudzień 2005: Uniwersytet Warszawski - praca magisterska pt. „ Dysrupcja genu *mcmA* *Aspergillus nidulans*

- Lipiec 2011: Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet im. M. Kopernika w Toruniu- tytuł diagnosty laboratoryjnego

- Czerwiec 2013 : Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie – rozprawa doktorska pt. „Poszukiwanie nowych molekularnych markerów prognostycznych u pacjentek z rakiem jajnika”

- Listopad 2016: Centrum Egzaminów Medycznych – specjalizacja z laboratoryjnej genetyki medycznej

- Kwiecień 2018: Europejska Rada Genetyki – dyplom Europejski kliniczny genetyk laboratoryjny.

Rak jajnika – wprowadzenie

Rak jajnika (OvCa) to powszechna i złożona choroba złośliwa o ogólnie złym rokowaniu i wyjątkowo wysokiej śmiertelności na całym świecie. Istnieją dwa główne typy raka jajnika: rak jajnika o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (tzw. raki nisko zróżnicowane) (ang. high-grade ovarian carcinoma, hgOvCa) i rak jajnika o niskim stopniu złośliwości histologicznej (tzw. raki wysoko zróżnicowane) (ang. low-grade ovarian carcinoma, lgOvCa). Pierwszy z nich jest najczęstszym typem raka jajnika, charakteryzującym się dużą niestabilnością genomową, rearanżacjami chromosomowymi i często zmutowanymi genami, zwłaszcza tymi kodującymi białka supresorowe, takie jak TP53, BRCA1 i BRCA2. Z kolei lgOvCa to o wiele rzadszy typ raka jajnika charakteryzujący się młodszym wiekiem diagnozy, względną chemioopornością i dłuższym przeżyciem pacjentek w porównaniu do swojego odpowiednika o wysokim stopniu złośliwości. Ponadto w lgOvCa nie występują lub rzadko występują mają mutacje w TP53 i BRCA1/2, a guzy te (zwłaszcza podtypu surowiczego) wykazują podobieństwo molekularne do guzów granicznych jajnika (ang. borderline ovarian tumors, BOTS) [5]. BOTS cechuje pośrednia agresywność między guzami łagodnymi a rakami inwazyjnymi. Jest to rzadka jednostka chorobowa o stosunkowo niskiej agresywności. W przeciwieństwie do większości raków jajnika BOTS występują głównie u kobiet w wieku rozrodczym, są zwykle diagnozowane w niskim

stadium zaawansowania klinicznego FIGO i charakteryzują się lepszymi wskaźnikami przeżycia. Metody obrazowania (USG, rezonans magnetyczny) są przydatne do odróżnienia BOTS od OvCa przed operacją. Jednak ostateczna diagnoza musi być oparta na badaniu histopatologicznym. Operacja z całkowitą resekcją guza jest podstawą leczenia BOTS. Nadal jednak u młodych kobiet rozważających prokreację, preferencyjnie stosuje się interwencję chirurgiczną oszczędzającą płodność. Co ciekawe, chemioterapia nie jest zalecana w przypadku BOTS. Po całkowitym usunięciu guza nawet 20% przypadków BOTS może nawrócić, zwykle jako guzy graniczne; jednak u niektórych pacjentów BOTS może nawrócić jako rak jajnika o niskim stopniu złośliwości. Z kolei rak surowiczy jajnika o wysokim stopniu złośliwości (hgOvCa) jest uważany za odrębną jednostkę chorobową, molekularnie niezwiązaną z IgOvCa i BOTS. Dane literaturowe na temat biomarkerów prognostycznych i predykcyjnych w BOTS pozostają skąpe. Z drugiej strony OvCa, zwłaszcza OvCa o wysokim stopniu złośliwości, są znacznie lepiej scharakteryzowane niż BOTS. Nadal jednak istnieją rozbieżności co do znaczenia klinicznego niektórych markerów molekularnych, które należy rozwiązać, podczas gdy identyfikacja nowych molekularnych predyktorów przeżycia pacjentów i odpowiedzi guza na chemioterapię ma pierwszorzędne znaczenie dla poprawy wyników leczenia i zmniejszenia wskaźników śmiertelności z powodu OvCa.

Ad.5.

Osiągnięcie naukowe Habilitanta obejmuje cykl 6 publikacji, które zostały opublikowane w okresie 2015-2024. Całość osiągnięcia została zatytułowana : **Poszukiwanie nowych molekularnych markerów prognostycznych i predykcyjnych u pacjentek z guzami jajnika o zróżnicowanej agresywności.** Pierwsza publikacja dotyczy roli zmutowanego, a tym samym biologicznie aktywowanego, genu SMARCA4 w kontekście mutacji germinalnej odgrywającej rolę w dziedziczeniu zachorowania na raka jajnika postaci drobnokomórkowej typu hiperkalcemicznego SCCHT. Ta postać raka jajnika jest bardzo rzadko spotykana a przebieg kliniczny ma charakter bardzo agresywny kończący się zgonem, i tak chore w zaawansowaniu FIGO I przeżywają od 5 miesięcy do kilku lat natomiast w zaawansowaniu FIGO III od 2 do 23 miesięcy. Druga publikacja dotyczy genu CEBPA u chorych na raka jajnika poddanych chemioterapii. Ten gen wykazuje wysoką ekspresję w tkankach dobrze zróżnicowanych poprzez promowanie ekspresji genów charakterystycznych dla odpowiedniej tkanki. Regulacyjne działania genu CEBPA typu *master control* związane jest z hamowaniem cyklu komórkowego, czy też poprzez regulację kompleksu modulującego chromatynę SWI/SNF.

Następne 4 publikacje są ze sobą ściśle powiązane i dotyczą genu CRNDE. Część osiągnięcia naukowego Habilitanta dotycząca tego właśnie genu jest najciekawsza i dotyczy nowych zagadnień , które dotyczą szerszego problemu roli biologicznej lncRNA (long noncoding RNA) w komórkach prawidłowych ale a może i przede wszystkim w komórkach rakowych, w których mogą determinować agresywność różnych typów raków poprzez wieloaspektowe działania, np. promowanie powstawania rybosomów i napędzanie proliferacji komórkowej (Lee et al. Mol Cell 2025;85:154 3-1560). Gen CRNDE, (ang. Colorectal Neoplasia Differentially Expressed) (dawniej ten gen był znany również jako LOC388279 lub LOC643911). Ostatnio onkogen ten był szeroko badany przez wiele grup badawczych zajmujących się różnymi nowotworami (w bazie danych PubMed znajduje się prawie 300 artykułów odnoszących się do niego, opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat). Zdecydowana większość tych artykułów koncentruje

się na transkryptach CRNDE, ponieważ przez lata gen ten był uważany za nie-kodujący lncRNA. LncRNA są zazwyczaj opisywane jako transkrypty RNA o długości przekraczającej 200 nukleotydów, które nie kodują białek. Przez lata wykazano, że cząsteczki RNA z tej klasy biorą udział w rozwoju i progresji różnych typów nowotworów. Jednak najnowsze odkrycia wskazują, że wiele takich cząsteczek koduje mikropeptydy, a nie same lncRNA, które są odpowiedzialne za istotne funkcje biologiczne, w tym, ale nie wyłącznie, regulację homeostazy, stanu zapalnego i układu odpornościowego, a także wpływanie na metabolizm oraz na progresję nowotworów.

1. Germline SMARCA4 mutations in patients with ovarian small cell carcinoma of hypercalcemic type

Joanna Moes-Sosnowska^{1†}, Lukasz Szafron^{1†}, Dorota Nowakowska², Agnieszka Dansonka-Mieszkowska¹, Agnieszka Budziłowska¹, Bożena Konopka¹, Joanna Plisiecka-Halasa¹, Agnieszka Podgórska¹, Iwona K Rzepecka¹ and Jolanta Kupryjanczyk^{1*}

Abstract Background:

SMARCA4 mutations have recently been identified as driving lesions of the ovarian small cell carcinoma of hypercalcemic type (SCCHT). Familial occurrence of this neoplasm was described previously.

Methods: We looked for germline SMARCA4 alterations in eight patients with the SCCHT. DNA was extracted from probands' and their relatives' blood. The SMARCA4 coding sequence, previously found altered in all the tumors, was PCR amplified and sequenced in the germline DNA.

Results: Two patients carried a heterozygous germline SMARCA4 alteration: c.3760G>T and c.2352insG, respectively. The analysis of the probands' next of kins revealed that the c.3760G>T mutation was inherited by the proband and her sister from their father, and the sisters' four children also carried the mutation. The proband's sister was diagnosed with a carcinoma of the parotid gland at age 2. A brother of the other proband was tested negative.

Conclusions: Our study suggests that some women develop the ovarian SCCHT due to the inherited or possibly de novo-occurring germline alterations in the SMARCA4 gene, however, its penetrance appears limited. Nevertheless, because of high aggressiveness of the SCCHT, a molecular diagnostics of the SMARCA4 gene and careful follow-up should be offered to patients with this cancer and their families.

Wnioski:

Nasze badanie sugeruje, że u niektórych kobiet rozwija się SCCHT jajnika z powodu dziedziczonych lub prawdopodobnie występujących de novo zmian germinalnych w genie SMARCA4 z późniejszą utratą allelu typu dzikiego. Jednak ich penetracja wydaje się ograniczona. Niemniej jednak ze względu na wysoką agresywność SCCHT pacjentom z tym nowotworem i ich rodzinom należy zaoferować diagnostykę molekularną genu SMARCA4 i staranną obserwację.

2. The significance of c.690G>T polymorphism (rs34529039) and expression of the CEBPA gene in ovarian cancer outcome

Bożena Konopka^{1,*}, Łukasz Michał Szafron^{1,*}, Ewa Kwiatkowska², Agnieszka Podgórska¹, Aleksandra Zolocińska³, Barbara Pienkowska-Grela¹, Agnieszka Dansonka-Mieszkowska¹, Anna Balcerak³, Martyna Łukasik¹, Anna Stachurska^{1,4}, Agnieszka Timorek⁵, Beata Spiewankiewicz⁶, Mona El-Bahrawy⁷, Jolanta Kupryjanczyk¹

ABSTRACT

The CEBPA gene is known to be mutated or abnormally expressed in several cancers. This is the first study assessing the clinical impact of CEBPA gene status and expression on the ovarian cancer outcome. The CEBPA gene sequence was analyzed in 118 ovarian cancer patients (44 platinum/cyclophosphamide (PC)-treated and 74 taxane/platinum (TP)-treated), both in tumors and blood samples, and in blood from 236 healthy women, using PCR-Sanger sequencing and Real-Time quantitative PCR (qPCR)-based genotyping methods, respectively. The CEBPA mRNA level was examined with Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR). The results were correlated to different clinicopathological parameters. Thirty of 118 (25.4%) tumors harbored the CEBPA synonymous c.690G>T polymorphism (rs34529039), that we showed to be related to up-regulation of CEBPA mRNA levels ($p=0.0059$). The presence of the polymorphism was significantly associated with poor prognosis ($p=0.005$) and poor response to the PC chemotherapy regimen ($p=0.024$). In accordance, elevated CEBPA mRNA levels negatively affected patient survival (pT , $p(\text{Thr230Thr})$ (rs34529039) polymorphism of the CEBPA gene, together with up-regulation of its mRNA expression, are negative factors worsening ovarian cancer outcome. Their adverse clinical effect depends on a therapeutic regimen used, which might make them potential prognostic and predictive biomarkers for response to DNA-damaging chemotherapy.

Wnioski:

W tym artykule wykazano po raz pierwszy, że polimorfizm c.690G>T (rs34529039) w genie CEBPA, wraz z nadmierną ekspresją CEBPA na poziomie mRNA, stanowią negatywne czynniki prognostyczne i predykcyjne u pacjentek z rakiem jajnika leczonych czynnikami uszkadzającymi DNA. Wyniki te mogą mieć znaczenie dla wyboru chemioterapii u pacjentek z rakiem jajnika, a także u pacjentek z innymi nowotworami leczonych cytostatykami uszkadzającymi DNA.

3. The Novel Gene CRNDE Encodes a Nuclear Peptide (CRNDEP) Which Is Overexpressed in Highly Proliferating Tissues

Łukasz Michał Szafron^{1,*}, Anna Balcerak², Ewa Anna Grzybowska², Barbara Pienkowska-Grela¹, Anna Felisiak-Golabek¹, Agnieszka Podgórska¹, Magdalena Kulesza¹, Natalia Nowak³, Paweł Pomorski^{4,5}, Juliusz Wysocki², Tymon Rubel⁶, Agnieszka Dansonka-Mieszkowska¹, Bożena Konopka¹, Martyna Łukasik¹, Jolanta Kupryjanczyk¹

Abstract

CRNDE, recently described as the lncRNA-coding gene, is overexpressed at RNA level in human malignancies. Its role in gametogenesis, cellular differentiation and pluripotency has been suggested as well. Herein, we aimed to verify our hypothesis that the CRNDE gene may encode a protein product, CRNDEP. By using bioinformatics methods, we identified the 84-amino acid ORF encoded by one of two CRNDE transcripts, previously described by our research team. This ORF was cloned into two expression vectors, subsequently utilized in localization studies in HeLa cells. We also developed a polyclonal antibody against CRNDEP. Its specificity was confirmed in immunohistochemical, cellular localization, Western blot and immunoprecipitation experiments, as well as by showing a statistically significant decrease of endogenous CRNDEP expression in the cells with transient shRNA mediated knockdown of CRNDE. Endogenous CRNDEP localizes predominantly to the nucleus and its expression seems to be elevated in highly proliferating tissues, like the parabasal layer of the squamous epithelium, intestinal crypts or spermatocytes. After its artificial overexpression in HeLa cells, in a fusion with either the EGFP or DsRed Monomer fluorescent tag, CRNDEP seems to stimulate the formation of stress granules and localize to them. Although the exact role of CRNDEP is unknown, our preliminary results suggest that it may be involved in the regulation of the cell proliferation. Possibly, CRNDEP also participates in oxygen metabolism, considering our *in silico* results, and the correlation between its enforced overexpression and the formation of stress granules. This is the first report showing the existence of a peptide encoded by the CRNDE gene.

Wnioski:

W tej publikacji jako pierwszej pokazano istnienie peptydu kodowanego przez gen CRNDE. Ten peptyd jądrowy prawdopodobnie bierze udział w podziałach komórkowych, ponieważ jego endogenna ekspresja jest podwyższona w silnie proliferujących tkankach. Po sztucznej nadekspresji CRNDEP wydaje się stymulować powstawanie granul stresu i jest w nich zlokalizowany.

4. The putative oncogene, CRNDE, is a negative prognostic factor in ovarian cancer patients

Lukasz Michał Szafron^{1,*}, Anna Balcerak^{2,*}, Ewa Anna Grzybowska², Barbara Pienkowska-Grela¹, Agnieszka Podgórska¹, Renata Zub², Magdalena Olbryt³, Jolanta Pamula-Pilat³, Katarzyna M. Lisowska³, Ewa Grzybowska³, Tymon Rubel⁴, Agnieszka Dansonka-Mieszkowska¹, Bożena Konopka¹, Magdalena Kulesza¹, Martyna Łukasik¹, Jolanta Kupryjanczyk^{1,*}

ABSTRACT

The CRNDE gene seems to play an oncogenic role in cancers, though its exact function remains unknown. Here, we tried to assess its usefulness as a molecular prognostic marker in ovarian cancer. Based on results of our microarray studies, CRNDE transcripts were further analyzed by Real-Time qPCR-based profiling of their expression. The qPCR study was conducted with the use of personally designed TaqMan assays on 135 frozen

tissue sections of ovarian carcinomas from patients treated with platinum compounds and either cyclophosphamide (PC, N = 32) or taxanes (TP, N = 103). Elevated levels of two different CRNDE transcripts were a negative prognostic factor; they increased the risk of death and recurrence in the group of patients treated with TP, but not PC (DNA-damaging agents only). Higher associations were found for overexpression of the short CRNDE splice variant (FJ466686): HR 6.072, 95% CI 1.814–20.32, $p = 0.003$ (the risk of death); HR 15.53, 95% CI 3.812–63.28, $p < 0.001$ (the risk of recurrence). Additionally, accumulation of the TP53 protein correlated with decreased expression of both CRNDE transcripts in tumor cells. Our results depict CRNDE as a potential marker of poor prognosis in women with ovarian carcinomas, and suggest that its significance depends on the therapeutic regimen used.

Wnioski:

Gen CRNDE wydaje się odgrywać ważną rolę w karcynogenezie. Podczas gdy nasze badania przedstawione w omawianej pracy jako pierwsze dowiodły klinicznego znaczenia CRNDE u pacjentów z rakiem, inni badacze również wykazali jego onkogeną rolę w glejakach oraz innych guzach litych i białaczkach. Ponadto, transkrypty CRNDE mogłyby być potencjalnie użyteczne jako czułe i specyficzne markery molekularne wczesnej karcynogenezy w raku jelita grubego. Biorąc to wszystko pod uwagę, można przypuszczać, że gen ten stanie się w przyszłości ważnym markerem rozwoju nowotworów, a nawet celem terapii.

5. A Multi-Faceted Analysis Showing CRNDE Transcripts and a Recently Confirmed Micropeptide as Important Players in Ovarian Carcinogenesis

Anna Balcerak 1,2, Laura Aleksandra Szafron 3, Tymon Rubel 4, Bianka Swiderska 5, Arkadiusz M. Bonna 6 Magdalena Konarzewska 7, Ireneusz Soltyszewski 7, Jolanta Kupryjanczyk 8 and Lukasz Michal Szafron 3,* 1

Abstract:

CRNDE is considered an oncogene expressed as long non-coding RNA. Our previous paper is the only one reporting CRNDE as a micropeptide-coding gene. The amino acid sequence of this micropeptide (CRNDEP) has recently been confirmed by other researchers. This study aimed at providing a mass spectrometry (MS)-based validation of the CRNDEP sequence and an investigation of how the differential expression of CRNDE(P) influences the metabolism and chemoresistance of ovarian cancer (OvCa) cells. We also assessed cellular localization changes of CRNDEP, looked for its protein partners, and bioinformatically evaluated its RNA-binding capacities. Herein, we detected most of the CRNDEP sequence by MS. Moreover, our results corroborated the oncogenic role of CRNDE, portraying it as the gene impacting carcinogenesis at the stages of DNA transcription and replication, affecting the RNA metabolism, and stimulating the cell cycle progression and proliferation, with CRNDEP being detected in the centrosomes of dividing cells. We also showed that CRNDEP is located in nucleoli and revealed interactions of this micropeptide with p54, an RNA helicase. Additionally,

we proved that high CRNDE(P) expression increases the resistance of OvCa cells to treatment with microtubule-targeted cytostatics. Furthermore, altered CRNDE(P) expression affected the activity of the microtubular cytoskeleton and the formation of focal adhesion plaques. Finally, according to our *in silico* analyses, CRNDEP is likely capable of RNA binding. All these results contribute to a better understanding of the CRNDE(P) role in OvCa biology, which may potentially improve the screening, diagnosis, and treatment of this disease.

Wnioski:

W tym badaniu, wykonując analizę MS, wykryto mikropeptyd CRNDEP, którego istnienie było do niedawna niepewne. Ponadto nasze wyniki poszerzają obecny stan wiedzy na temat funkcji fizjologicznych produktów ekspresji genu CRNDE i ich roli w procesie nowotworzenia. Szczególnie interesujące są wyniki pokazujące związek między wysoką ekspresją CRNDE(P) a zwiększoną opornością komórek raka jajnika na leczenie cytostatykami, które zakłócają dynamikę mikrotubul. Praca ta dostarcza też ważnych nowych informacji na temat stymulującego wpływu produktów ekspresji genu CRNDE na szybkość proliferacji komórek, aktywność cytoszkieletu mikrotubularnego i zdolność komórek do tworzenia płytek przylegania. Wszystkie te wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulacyjnych, w które zaangażowane są produkty ekspresji genu CRNDE, a także do udoskonalenia badań przesiewowych i diagnostyki raka jajnika. Ostatecznie może to również doprowadzić do opracowania mniej obciążających i skuteczniejszych metod przyszłej terapii molekularnej tej choroby.

6. The Clinical Significance of CRNDE Gene Methylation, Polymorphisms, and CRNDEP Micropeptide Expression in Ovarian Tumors

Laura Aleksandra Szafron 1,* , Roksana Iwanicka-Nowicka 2,3 , Agnieszka Podgorska 4, Arkadiusz M. Bonna 5 Piotr Sobiczewski 6, Jolanta Kupryjanczyk 7 and Lukasz Michal Szafron 1,

Abstract:

CRNDE is a non-coding gene expressed as a long non-coding RNA. However, our team previously reported that the CRNDE gene also encodes a micropeptide, CRNDEP. The amino acid sequence of CRNDEP has recently been revealed by other researchers, too. This study aimed to investigate genetic alterations within the CRNDEP-coding region of the CRNDE gene, methylation profiling of this gene, and CRNDEP expression analysis. All investigations were performed on clinical material from patients with ovarian tumors of diverse aggressiveness. We found that CRNDEP levels were significantly elevated in highly aggressive tumors compared to benign neoplasms. Consistently, a high level of this micropeptide was a negative, independent, prognostic, and predictive factor in high-grade ovarian cancer (hgOvCa) patients. The cancer-promoting role of CRNDE(P), shown in our recent study, was also supported by genetic and epigenetic results obtained herein, revealing no CRNDEP disrupting mutations in any clinical sample. Moreover, in borderline ovarian tumors (BOTS), but not in ovarian cancers, the presence of a single

nucleotide polymorphism in CRNDE, rs115515594, significantly increased the risk of recurrence. Consistently, in BOTS only, the same genetic variant was highly overrepresented compared to healthy individuals. We also discovered that hypomethylation of CRNDE is associated with increased aggressiveness of ovarian tumors. Accordingly, hypomethylation of this gene's promoter/first exon correlated with hgOvCa resistance to chemotherapy, but only in specimens with accumulation of the TP53 tumor suppressor protein. Taken together, these results contribute to a better understanding of the role of CRNDE(P) in tumorigenesis and potentially may lead to improvements in screening, diagnosis, and treatment of ovarian neoplasms.

Wnioski:

W artykule tym wykazano kliniczne znaczenie mikropeptydu CRNDEP u pacjentów z guzami jajnika. Poziom CRNDEP był istotnie podwyższony w wysoce agresywnych guzach (hgOvCa) w porównaniu z łagodnymi nowotworami (BOTS bez mutacji BRAF V600E). Zgodnie z tą obserwacją, wysokie poziomy tego mikropeptydu ujawniły się jako negatywny czynnik prognostyczny i predykcyjny w hgOvCa. Nie znaleziono żadnych wariantów genetycznych silnie wpływających na sekwencję aminokwasową CRNDEP w badanym zbiorze guzów jajnika, a także wykazano hipometylację genu CRNDE w bardziej agresywnych guzach. Zgodnie z tym wynikiem, niższy stopień metylacji promotora CRNDE zwiększał oporność hgOvCa na chemioterapię, szczególnie w przypadku guzów z akumulacją białka TP53. Ponadto ustaliliśmy, że SNP rs115515594 w CRNDE jest potencjalnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym tylko w BOTS, w których ten wariant genetyczny był wysoce nadreprezentowany w porównaniu ze zdrowymi osobami. Jednocześnie ten sam polimorfizm okazał się częstszy w guzach BOT V600E niż w hgOvCa. Wyniki te przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli CRNDE(P) w karcynogenezie i potencjalnie mogą prowadzić do udoskonalenia badań przesiewowych, diagnostyki i leczenia nowotworów jajnika.

Ad.6.

W przypadku wszystkich sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, współautorzy potwierdzili w oświadczeniach swój udział w przeprowadzonych badaniach, w których Habilitant odgrywał istotną rolę.

Ad. 7.

Habilitant dostarczył wersje elektroniczne sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Ad.8.

Istotnym składnikiem aktywności naukowej Habilitanta, oczywiście poza zbiorem sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, jest współpraca międzynarodowa z Ovarian Cancer Association Consortium (OCAC) w zakresie badań genetyki molekularnej i epidemiologii oraz współpraca na terenie Polski z osobami zatrudnionymi w innych podmiotach z zakresu medycyny ale nie tylko. Z dostarczonego zestawienia przez Habilitanta wynika, że ta

współpraca pozwoliła stać się współautorem 17 artykułów z autorami zatrudnionymi w UW Wydział Biologii, Triple Helical Peptides, Inc, Cambridge UK, Politechnika Warszawska, Warszawski Uniwersytet Medyczny; Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Imperial College London, UK czy też Polska Akademia Nauk. Dodatkowo Habilitant zwrócił szczególną uwagę na grupę 4 artykułów, w których był pierwszym autorem a tematyka obejmowała badanie kilku nowych potencjalnie markerów molekularnych raka jajnika lub badanie polimorfizmów różnych genów o potencjale prognostyczno-predykcijnym u chorych na raka jajnika. Te 4 artykuły ukazały się w okresie od 2018 roku do 2024 roku w pismach Open Access : Oncotarget, PLOS One, Int. J. Mol. Sci., Cancers.

Habilitant także odgrywał ważną rolę w rozwoju grupy studenckiej końcowych lat, jako promotor lub promotor pomocniczy 2 prac magisterskich:

- 1. Monika Jackiewicz, praca magisterska pt.: „Ocena zmienności liczby kopii genu CRNDE oraz stopnia metylacji jego promotora w ludzkich rakach jajnika”, 2018 (promotor)
- 2. Anna Gassa, praca magisterska pt.: „Ocena klinicznego znaczenia synonimicznego polimorfizmu jednonukleotydowego (SNP) rs34529039 w genie CEBPA oraz zmienności liczby kopii tego genu u pacjentek z rakiem jajnika”, 2019 (promotor)

oraz 2 rozpraw doktorskich:

- 1. Anna Balcerak, rozprawa doktorska pt.: „Próba oszacowania molekularnej funkcji transkryptów oraz nowo odkrytego mikropeptydu kodowanego przez gen CRNDE, oraz ich wpływu na wybrane aspekty procesu nowotworzenia”, 2022 (promotor pomocniczy)
- 2. Joanna Parada, rozprawa doktorska pt.: „Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem długich niekodujących RNA (lncRNA) – w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych”, 2023 (promotor pomocniczy)

Ponadto Habilitant recenzował pracę inżynierską :

- 1. Filip Lyczek: „Analiza wybranych oddziaływań białkowych antyapoptotycznego czynnika HAX1”, 2019, (promotor: Prof. dr hab. Ewa A. Grzybowska)

Ad.9.

Analiza bibliometryczna

Habilitant w dostarczonych materiałach przedstawił szczegółowe dane dotyczące pełnego dorobku ocenionego według różnych klasyfikacji i okresów przygotowane przez Bibliotekę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.

Pełny dorobek Habilitanta łączną punktację IF 162,634 (MEiN 2250); liczba cytowań (29.11.2024: 986 x wg Web Of Science oraz 1065 x wg Scopus; Indeks H: 15 (Web Of Science) oraz 16 wg Scopus.

Wniosek końcowy

W oparciu o dostarczone materiały źródłowe, które pozwoliły ocenić całokształt działalności naukowej, w tym udział w przedsięwzięciach międzynarodowych, Doktor Łukasz Michał Szafron jako badacz spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego na podstawie art. 221 ust.10 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) co pozwala, aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego. W związku z powyższym rekomenduję Komisji w postępowaniu habilitacyjnym Doktora Łukasza Michała Szafrona poparcie wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

22.06.2025

dr hab. n. med. Gabriel Wcisło
profesor nauk medycznych
specjalista chorób wewnętrznych
I stopnia specjalizacji