

Białystok, 3. 12.2012

Prof. dr hab. med. Jacek Nikliński
Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

OCENA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Klaudii Skrzypek pt. „Rola mikroRNA w niedrobnokomórkowym raku płuca: wpływ oksygenazy hemowej-1”

Rak płuca jest jednym z najczęściej występującym nowotworem w populacji ludzkiej; w 2010 roku zanotowano na świecie ponad 1.600.000 zachorowań na ten nowotwór. W Polsce notuje się około 26 tysięcy nowych zachorowań rocznie z tendencją wzrostową obserwowaną w przeciągu ostatnich lat. Jak wynika z danych epidemiologicznych naszego kraju, odsetek chorych wyleczonych z powodu raka płuca pozostaje od lat na niskim poziomie i wynosi zaledwie 5-10%.

Jednym z podstawowych warunków opracowania skutecznego leczenia raka płuca jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost i progresję rozwoju tego nowotworu.

Badania przeprowadzane od wielu lat wskazują, że złośliwa zmiana nowotworowa, w tym również rak płuca, powstaje jako wynik akumulacji błędów genetycznych w prawidłowej komórce. W ostatnich latach podkreśla się istotną rolę cząstek mikroRNA w rozwoju nowotworów, w tym w raku płuca. Wykazano, że zaburzenia ekspresji miRNA są związane ze wzrostem i progresją guza. Mogą mieć również znaczenie w postępowaniu terapeutycznym stając się obiecującymi celami dla terapii personalizowanej.

Dlatego też uważam, że tematyka przedłożonej mi do recenzji pracy dotycząca roli mikroRNA w rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca poprzez wpływ oksygenazy hemowej-1 jest nowatorska i w pełni uzasadniona.

Wstępna część rozprawy obejmuje ogólną charakterystykę oksygenazy hemowej, jej roli w procesach wzrostu guza i przerzutowania, przedstawia bieżący stan wiedzy na temat roli cząstek mikroRNA w nowotworzeniu, ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczki miR-378, oraz opisuje morfologiczną i molekularną charakterystykę raka płuca.

Niezwykła przejrzystość przedstawionych przez Autorkę skomplikowanych mechanizmów wzajemnych powiązań cząstek mikroRNA, genów i ich produktów białkowych, świadczy o olbrzymiej wiedzy z zakresu biologii nowotworów oraz umiejętności wybiórczej selekcji najważniejszych informacji i sposobie ich prezentacji. Treść zawarta we wstępie rozprawy może stanowić znakomite źródło wiedzy na temat molekularnych mechanizmów rozwoju nowotworów.

Nadrzędnym celem pracy było określenie roli oksygenazy hemowej 1 (HO-1) i miRNA we wzroście i angiogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC).

W tym celu autorka zbadała zmiany w transkryptomie miRNA NSCLC zachodzące w wyniku nadekspresji HO-1 oraz poddała szczegółowej analizie oddziaływania pomiędzy wybraną cząsteczką miRNA – miR-378 a HO-1 w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Badania zostały przeprowadzone na linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuca- NCI-H292, na modelu mysim *Swiss nude* o obniżonej odporności i na wycinkach tkanek guza uzyskanych podczas operacji chorych na gruczolakoraka płuca oraz na wycinkach usuniętych z przerzutowych węzłów chłonnych.

Autorka zastosowała w pracy szereg najnowocześniejszych metod badawczych.

Szczególną uwagę zwraca wykorzystanie technik transferu genów do uzyskania linii NCI-H292 z nadekspresją HO-1 oraz miR-378 jak również zastosowanie szeregu technik weryfikujących uzyskane wyniki. Wykorzystanie modeli komórkowych, strategii transferu genów za pomocą wektorów retrowirusowych i lentiwirusowych, wyciszania ekspresji genów/microRNA z wykorzystaniem szerokiego spektrum narzędzi (interferencyjny RNA, transfer mirR anatagomirów), sprawdzenie interakcji między badanymi układami zarówno w modelu *in vitro* jak i w modelu *in vivo* i wreszcie zweryfikowanie wyników na materiale klinicznym jest szczególną wartością przedstawionej mi do recenzji pracy.

Umiejętność posługiwania się tak dużym repertuarem niejednokrotnie trudnych technik badawczych świadczy o bardzo dużym doświadczeniu praktycznym Autorki dysertacji.

W wyniku przeprowadzonych badań zostało wyciągniętych szereg nowatorskich wniosków, istotnych z punktu widzenia rozwoju i progresji raka płuca oraz potencjalnego znaczenia klinicznego.

Autorka wykazała, że:

- 1.) Nadekspresja HO-1, uzyskana za pomocą wektorów retrowirusowych, w niedrobnokomórkowym raku płuca NCI-H292 zwiększa ekspresję genów odpowiedzialnych za obróbkę mikroRNA (DGCR8, Drosha, Dicer1) oraz zwiększa globalną produkcję mikroRNA.
- 2.) Analiza mikromacierzy pokazała znacząco obniżoną ekspresję mikroRNA wspomagających wzrost i angiogenezę nowotworu w komórkach z nadekspresją HO-1, podczas gdy poziom mikroRNA hamujących wzrost i angiogenezę był podniesiony.

- 3.) HO-1 zwiększa poziom p53, obniża aktywność ALDH, zmniejsza ekspresję MUC5AC i Ang-1.
- 4.) Komórki NCI-H292 z nadekspresją HO-1 migrują i dzielą się wolniej oraz wykazują zmniejszony potencjał angiogeny.
- 5.) miR-378 jako najbardziej regulowane przez HO-1 onkogenne i angiogenne mikroRNA jest ważnym mediatorem obserwowanych efektów.
- 6.) Tlenek węgla jest mediatorem efektów HO-1 na proliferację i migrację komórek NCI-H292 oraz na obniżony poziom miR-378.
- 7.) Stabilna nadekspresja miR-378, uzyskana z pomocą wektorów lentiwirusowych, w komórkach NCI-H292 prowadzi do spadku poziomu HO-1 i wywołuje efekty przeciwstawne do HO-1.
- 8.) Poziom p53 jest obniżony, podczas gdy poziom MUC5AC, Ang1, VEGF, IL-8 jest podniesiony w komórkach NCI-H292 z nadekspresją miR-378.
- 9.) Nadekspresja miR-378 przyspiesza podział i migrację komórek NCI-H292 oraz zwiększa potencjał angiogeny.
- 10.) Wprowadzenie HO-1 za pomocą wektorów adenowirusowych do komórek ze stabilną nadekspresją miR-378 odwraca efekt miR-378 na proliferację i migrację komórek.
- 11.) *In vivo*, po śródskórnym nastrzyknięciu komórek do myszy z upośledzonym układem odporności, guzy z nadekspresją HO-1 mają zmniejszony poziom miR-378 i są mniejsze, mniej unaczynione, mniej utlenowane i wykazują zmniejszone przerzutowanie do odległych tkanek.
- 12.) Przeciwnie, guzy z nadekspresją miR-378 mają zmniejszony poziom HO-1 i są większe, lepiej unaczynione i lepiej utlenowane oraz wykazują zwiększone przerzutowanie do odległych tkanek.
- 13.) U chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, ekspresja HO-1 jest mniejsza w przerzutach do węzłów chłonnych niż w guzach pierwotnych, podczas gdy ekspresja miR-378 jest nieznacznie podwyższona w przerzutach, ale różnice nie są istotne statystycznie.

Według informacji przedstawionych w rozprawie i mojej wiedzy jest to pierwsze w świecie tak wszechstronne badanie w modelu nowotworowym i wykazanie wzajemnych interakcji między oksygenazą hemowa-1, enzymem o szerokich właściwościach związanych najczęściej ze stymulacją rozwoju nowotworu a regulowanymi przez nie cząsteczkami mikroRNA.

Poprzez zastosowanie bogatej strategii badawczej, poczynając od globalnej analizy ekspresji mikroRNA z wykorzystaniem mikromacierzy, szczegółową weryfikację i skrupulatnie przeprowadzone eksperymenty doktorantka wykazała, iż mikroRNA-378 jest celem działania oksygenazy hemowej-1, w szczególności tlenku węgla - jednego z produktów enzymatycznej aktywności HO-1, a zarazem mikroRNA-378 reguluje ekspresję HO-1. W ten sposób doktorantka zidentyfikowała nowy gen targetowy dla tego istotnego mikroRNA.

Badania Doktorantki wnoszą także nowe informacje do sugerowanego wcześniej, ale badanego tylko w jednym modelu pro-angiogenego działania miR-

378. Tym samym Autorka po raz pierwszy wykazała wzajemną zależność HO-1 i miR-378, która może znacząco wpływać na progresję i angiogenezę niedrobnokomórkowego raka płuca, a miR-378 może być nowym celem dla terapii.

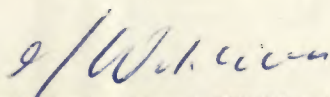
Autorka potrafiła właściwie ustosunkować się do uzyskanych wyników i bardzo umiejętnie i wyczerpująco przeprowadziła dyskusję z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Reasumując, rozprawa Klaudii Skrzypek pt. „Rola mikroRNA w niedrobnokomórkowym raku płuca: wpływ oksygenazy hemowej-1” stanowi istotny wkład do badań nad biologią raka płuca.

Należy podkreślić, że praca ta powstała w oparciu o grant Polsko – Francuski finansowany przez MNiSzW i CNRS i jest modelowym przykładem naukowej współpracy międzynarodowej.

Wobec powyższego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr Klaudii Skrzypek do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przedkładam jednocześnie wniosek Wysokiej Radzie o nagrodzenie rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Jacek Nikliński