

Prof. zw. dr hab. n. med. Janusz Klatka

Lublin, 22.01.2025 r.

Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej

UM w Lublinie

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Kamili Ostrowskiej pt. „Rola genu METLL3 oraz procesu metylacji RNA w rozwoju płaskonabłonkowego raka głowy i szyi”

Stoimy obecnie w obliczu lawinowo narastającej zachorowalności na choroby nowotworowe coraz lepiej zdając sobie sprawę, że nie do chirurga należy ostateczne rozwiązanie problemu raka, bez względu na to, jak dalece postąpi rozwój technik operacyjnych. Pomimo rozwoju, jaki dokonał się w leczeniu chirurgicznym raka krtani w ostatnim dwudziestoleciu, zwłaszcza w zakresie tzw. operacji zachowawczych i rekonstrukcyjnych, który doprowadził do poprawy wyników czynnościowych, nie uzyskano zwiększenia odsetka 5-letniego okresu przeżycia u leczonych chorych. Dotychczasowe kryteria oceny guza oraz choroby nowotworowej, oparte jedynie na klasyfikacji TNM i wynikach badań histopatologicznych, bez uwzględnienia cech związanych z jego biologią, wydają się być niewystarczające w prognozowaniu i wyborze optymalnego postępowania terapeutycznego. Poznanie i właściwe wykorzystanie w praktyce klinicznej biologicznych cech nowotworu jest warunkiem dalszego postępu w racjonalnym wyborze metod leczenia raka krtani. Podstawowym wyzwaniem w określaniu nowych celów diagnostycznych, prognostycznych i terapeutycznych jest identyfikacja zmian na poziomie genetycznym i epigenetycznym, które zachodzą na skutek pojawiania się choroby nowotworowej.

Do najlepiej zbadanych zmian epigenetycznych w HNSCC należą: metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz aktywność niekodujących RNA. Na temat metylacji RNA danych naukowych jest znacznie mniej, co stanowiło przesłankę do podjęcia przez Doktorantkę badań właśnie w tym kierunku.

Biorąc pod uwagę potrzeby współczesnej medycyny oraz kierunki badań prowadzonych w wiodących laboratoriach uniwersyteckich, wybrany przez Doktorantkę temat pracy uważam za celowy i w pełni uzasadniony.

Wyniki badań zostały opisane w trzech publikacjach stanowiących spójny ciąg badawczy.

Doktorantka w 3-stronicowym wstępie przedstawiła wyczerpująco aktualny stan wiedzy z zakresu epidemiologii i etiopatogenezy nowotworów głowy i szyi. Wstęp to również

popis wiedzy Doktorantki w zakresie biologii molekularnej i genetyki. Szczegółowo odniosła się do modyfikacji epigenetycznych, które są dynamiczne, odwracalne i kontrolują maszynę ekspresyjną wielu genów istotnych w procesie patogenezy nowotworu. Doktorantka wskazała, że do najlepiej zbadanych zmian epigenetycznych w HNSCC należą metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz aktywność niekodujących RNA. Doktorantka w sposób niezwykle kompetentny przedstawiła nam współczesną wiedzę na temat procesu metylacji RNA

Głównym założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu procesu metylacji RNA oraz genu METTL3 na patogenezę płaskonabłonkowego raka głowy i szyi poprzez realizację trzech szczegółowych zadań badawczych:

1. Porównanie poziomu metylacji RNA N6-metyloadenozyny w tkankach nowotworowych i tkankach z wolnego marginesu pooperacyjnego pobranych od chorych z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi oraz modelu in vitro z wykorzystaniem spektrometrii masowej z chromatografią cieczową i jonizacją przez elektrorozpylanie.
2. Oznaczenie poziomu ekspresji głównego enzymu odpowiedzialnego za metylację RNA- metylotransferazy 3 (METTL3) w tkankach nowotworowych i tkankach z wolnego marginesu pooperacyjnego pobranych od chorych z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi oraz modelu in vitro.
3. Ocena biologiczna wpływu wyciszenia genu METTL3 w modelach in vitro płaskonabłonkowego raka głowy i szyi na potencjał proliferacyjny, apoptotyczny, obecność markerów macierzystości oraz odpowiedzi na chemioterapię.

W publikacji pt. "Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Epigenetic Landscape" Doktorantka dokonała podsumowanie dostępnej literatury naukowej na temat zaburzeń mechanizmów epigenetycznych i ich wartości predykcyjnych w płaskonabłonkowym raku głowy i szyi. W pracy szczególnie skupiono się na procesie metylacji DNA, modyfikacji histonów, aktywności niekodujących RNA oraz metylacji RNA.

W drugiej publikacji pt. "The m6A RNA modification quantity and mRNA expression level of RNA methylation-related genes in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and patients" celem przeprowadzonych badań było globalne, ilościowe oznaczenie modyfikacji m6A i określenie poziomu ekspresji mRNA wybranych genów, związanych z maszyną procesu metylacji m6A RNA metylotransferazy (METTL3), demetylazy (FTO) i białek rozpoznających modyfikację m6A (YTHDF2, YTHDC2) u 45 chorych z HNSCC i w

4 liniach komórkowych. Do najbardziej istotnych wyników powyższej pracy należą: – wykazanie korelacji liczby modyfikacji m6 A w całkowitym RNA z wybraną metylotransferazą (METTL3), demetylazą (FTO) i białkami wiążącymi m6 A (YTHDC2, YTHDF2) w tkankach nowotworowych, która sugeruje, że metylacja RNA może być zaangażowana w procesy związane z nowotworzeniem w HNSCC, – wykazanie istotnych statystycznie różnic w poziomie mRNA genów METTL3, FTO i YTHDC2 w badanych liniach komórkowych, które wskazują, że ich ekspresja może się różnić w zależności od lokalizacji guza.

W trzeciej publikacji pt. "The two-faced role of RNA methyltransferase METTL3 on cellular response to cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma in vitro model" Doktorantka postanowiła ocenić znaczenia genu METTL3 w odpowiedzi komórkowej na cisplatynę w HNSCC. Przeprowadzono badania uwzględniające wyciszenie genu w modelu in vitro oraz analizę dystrybucji cyklu komórkowego, apoptozę, ekspresję markerów 23 komórek macierzystych i zdolność komórek do tworzenia kolonii po leczeniu cisplatyną. Materiał badawczy stanowiły linie komórkowe FaDu i Detroit-562.

Otrzymane wyniki wskazały, że niedobór METTL3 może zarówno uwrażliwiać komórki HNSCC na cisplatynę poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy i hamowanie tworzenia kolonii, jak i zwiększać ekspresję markerów nowotworowych komórek macierzystych. Doktorantka podkreśla, że przedstawione w pracy badania stanowią pierwszą analizę biologiczną odpowiedzi komórkowej na cisplatynę w trzech niezależnych, pochodzących z różnych lokalizacji nowotworowych, liniach komórkowych HNSCC z obniżoną ekspresją genu METTL3.

W dyskusji (dwóch oryginalnych prac doświadczalnych) Autorka umiejętnie porównuje wyniki własne do uzyskanych przez innych autorów. Wykazuje się dużą wiedzą, logicznie próbuje interpretować uzyskane wyniki, odbiegające czasami od wyników przedstawianych przez innych autorów. W dyskusji, jak i w pozostałych częściach pracy wykorzystuje i cytuje kilkadziesiąt pozycji piśmiennictwa, przeważnie anglojęzycznego.

W ocenie przedstawionej mi rozprawie doktorskiej mam wyjątkowo ułatwione zadanie, ponieważ wszystkie trzy prace zostały opublikowane w doskonałych czasopismach naukowych i przeszły już dokładny proces oceny merytorycznej.

Po szczegółowym zapoznaniu się z każdą rozprawą doktorską przedstawianą mi do recenzji, zazwyczaj nasuwają mi się pewne uwagi krytyczne, które w związku z

przysługującym mi prawem wskazuję w podsumowaniu recenzji. Z przyjemnością stwierdzam, że po lekturze tej pracy takich uwag nie mam.

Reasumując, w oparciu o przeprowadzone badania oraz wyniki uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, głęboką wiedzę Autorki, jej samodzielność i swobodę poruszania się w temacie będącym przedmiotem badań, uważam, że omawiana rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim i na tej podstawie mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Kapitułe Kolegium Nauk Medycznych UM w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Kamili Ostrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. JANUSZ KLATKA
specjalista otolaryngolog
tel. 603 593 259
1761230



Prof. dr hab. med. Janusz Klatka