

Prof. dr hab. med. Agnieszka Słowik  
Katedra Neurologii UJ CM  
Ul. Jakubowskiego 2; 30-688 Kraków

Kraków 9.08.2020

## Recenzja

Pracy doktorskiej lek med. Anny Elżbiety Żurawskiej

Pt: „Znaczenie kolistych RNA (circRNA) w immunologii stwardnienia rozsianego”

Przesłana do recenzji praca doktorska lek med. Anny Elżbiety Żurawskiej obejmuje 116 stron znormalizowanego druku komputerowego. Wstęp zajmuje 25 stron, uzasadnienie wyboru tematu i cele pracy – 2 strony, metody badawcze - 12 stron, wyniki – 21 stron, omówienie wyników – 8 stron. Doktorantka zamieściła 186 pozycji piśmiennictwa. Praca zawiera 7 tabel i 19 rycin. Do pracy dołączono wykaz stosowanych skrótów. Pracę wykonano na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej. Badania były finansowane przez NCN: grant PRELUDIUM 2015/17/N/NZ6/03 504; OPUS 2016/23B/NZ6/02541 oraz grant CEE Merck.

Wstęp pracy jest podzielony na 6 podrozdziałów. W pierwszym podrozdziale Doktorantka scharakteryzowała epidemiologię, patofizjologię oraz czynniki ryzyka stwardnienia rozsianego (SM). Omówiła szczegółowo wyniki dotychczasowych badań genetycznych, podkreślając poligenowy charakter podatności na zachorowanie na SM i wskazując na wpływ kombinacji genów HLA-DRB1\*15 i HLA-A\*02 na ryzyko choroby. Wskazała także na związek dużej liczby polimorfizmów pojedynczego nukleotydu zlokalizowanych w genach innych niż geny głównego kompleksu zgodności tkankowej (HLA) mających sumujący się wpływ na ryzyko wystąpienia SM. Bardzo interesująco, w oparciu o najnowszą literaturę omówiła znaczenie środowiskowych czynników ryzyka SM, takich jak: przebyte zakażenie wirusem Epstein-Barr, palenie papierosów, niska ekspozycja na słońce, niedobór witaminy D, otyłość stwierdzana w wieku dziecięcym i młodzieńczym, szczególnie u kobiet, przebieg choroby czy nadmierna konsumpcja soli.

Następnie Doktorantka w sposób klarowny opisała dostępne dane dotyczące patofizjologii SM wskazując, że jest to proces autoimmunologiczny skierowany przeciwko antygenom mielinowym takim jak: białko zasadowemieliny (MBP), białko proteolipidowemieliny (PLP), glikoproteina związana z mieliną (MAG) i mielinowe białkooligodentrocytów (MOG). Doktorantka wskazała na kluczową rolę limfocytów T, szczególnie Th1 i Th17 oraz coraz bardziej uznawaną w ostatnich latach, ważną rolę limfocytów B w patofizjologii SM. Na końcu pierwszego podrozdziału Doktorantka opisała znaczenie mechanizmów epigenetycznych uczestniczących w rozwoju stwardnienia rozsianego, tzn. metylacji DNA, modyfikacji białek histonowych, oraz działania mikroRNA (miRNA). Doktorantka wskazała, że miRNA może odgrywać kluczową rolę w kontrolowaniu funkcji układu immunologicznego oraz w regulacji funkcji komórek immunokompetentnych ze znaczącym wpływem na rozwój reakcji autoimmunologicznych. Jak podkreśliła, w regulacji procesów autoimmunologicznych i zapalnych udokumentowane znaczenie mają miRNA-21; miRNA-146a/b, miRNA-301a i miRNA-155.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisuje budowę, mechanizmy syntezy oraz funkcję kolistego RNA (circular RNA, circRNA), które jest odpowiedzialne za regulację miRNA. CircRNA to podgrupa długich nie kodujących RNA, stanowiących okręgi zamknięte wiązaniami kowalencyjnymi, pozbawione wolnego końca 5' i 3', odporne na działanie RNazy R - egzonukleazy. CircRNA to cząsteczki stabilne, okres półtrwania w komórce przekracza 48 godzin; stabilność cząsteczek w komórce jest porównywalna do stabilności w osoczu. Jak podkreśliła Doktorantka, stabilność circRNA powoduje, że te cząsteczki są bardzo dobrym kandydatem na biomarker stwardnienia rozsianego, tym bardziej, że największa kumulacja kolistych RNA jest w mózgu. Doktorantka w bardzo plastyczny sposób opisuje różne funkcje biologiczne circRNA, w tym interakcję z miRNA. Do tego podrozdziału dołączona jest rycina nr 1, autorstwa Doktorantki, która bardzo ułatwia zrozumienie mechanizmów powstawania różnych typów circRNA.

Osobny podrozdział Doktorantka poświęciła opisaniu znaczenia circRNA w funkcjonowaniu mózgu. Podrozdział zawiera tabelę, opracowaną przez Doktorantkę (Tabela nr 1) wskazującą na udokumentowanie znaczenia tych cząsteczek w patofizjologii różnych chorób mózgu, w tym SM, choroby Parkinsona, choroby Alzheimer, stwardnienia bocznego zanikowego, zaniku wieloukładowego, gwałtownej depresji i schizofrenii.

Następnie Doktorantka bardzo szczegółowo opisała związek circRNA z różnymi chorobami immunologicznymi, np. z zapaleniem stawów, cukrzycą typu drugiego, toczeniem układowym

trzewnym a także z nowotworami układu krwiotwórczego i chłonnego oraz z odpowiedzią przeciwwirusową.

Osobny podrozdział Doktorantka poświęciła omówieniu aktualnych informacji dotyczących znaczenia miRNA w SM. Szczególną uwagę poświęciła znaczeniu trzech cząsteczek: miR326, miR-155 oraz miR124. Opisała szczegółowo wyniki badań u chorych na SM. Na przykład przywołała badania, które wskazują, że poziom miR92a-1\* i miR-145 różnicują pacjentów z postacią rzutowo remisyjną SM, postacią wtórnie postępującą i zdrowych, czy też miRNA-let-7 różnicują chorych z postacią wtórnie postępującą SM i zdrowych. Na koniec tego podrozdziału Doktorantka cytuje bardzo interesujące prace porównujące wzór ekspresji różnych miRNA u chorych z różnymi postaciami SM. Niestety, jak podkreśliła Doktorantka żadna cząsteczka miRNA nie została jeszcze zidentyfikowana jako biomarker SM.

Na końcu wstępu Doktorantka przedstawiła dostępne wyniki dotychczasowych badań na temat znaczenia circRNA w SM. Okazuje się, że takich badań jest niewiele, a ich wyniki wymagają potwierdzenia. Jak słusznie uzasadnia Doktorantka badania poszukiwania związku circRNA z mechanizmami autoimmunologicznymi prowadzącymi do wystąpienia SM są zasadne, ponieważ koliste RNA cechuje wysoka ekspresja w mózgu, jest ono stabilne, jest powiązane z patomechanizmem różnych chorób immunologicznych.

Trzeba podkreślić, że Doktorantka posiada umiejętność syntetycznego opisywania skomplikowanych zjawisk biologicznych; dodatkowo tekst zawiera rycinę i tabelę ułatwiające zrozumienie trudnego tekstu.

Doktorantka zdefiniowała pięć celów pracy:

1. Zebranie materiału biologicznego oraz izolacja PBMC, a następnie RNA od chorych na RRSM oraz od dobranych pod względem płci i wieku osób zdrowych;
2. Jakościowa i ilościowa ocena ekspresji circRNA przy pomocy mikromierzy;
3. Potwierdzenie wyników profilu circRNA uzyskanego przy pomocy mikromierzy poprzez pomiar wybranych circRNA w komórkach PBMC uzyskanych od nowej, niezależnej grupy chorych na RRSM i niezależnej dobranej pod względem płci i wieku grupy kontrolnej wykorzystując technikę qPCR;
4. Ocena korelacji circRNA o zróżnicowanej ekspresji w RRMS z aktywnością kliniczną i rezonansową choroby;

5. 5. Bioinformatyczne określenie potencjalnych miRNA oraz miRNA regulowanych poprzez ujawnione w poprzednich etapach circRNA.

W moim przekonaniu warto byłoby dołączyć do pracy podrozdział „Zadania Badawcze”, co pozwoliłoby rozdzielić zadania badawcze i cele badawcze. Na przykład zadaniem badawczym jest określony przez Doktorantkę cel 1. czy cel 2.

Podrozdział „metody badawcze” napisany został bardzo czytelnie i profesjonalnie. Czytanie ułatwiają ryciny pokazujące kolejne etapy badań. Mam tylko jedno zastrzeżenie. Tabela 2. zawierająca charakterystykę badanych grup powinna być umieszczona w rozdziale prezentującym wyniki pracy.

Uzyskane wyniki są opisane detalicznie, etap po etapie. Na początku Doktorantka zidentyfikowała 595 cząsteczek circRNA, które uległy zwiększonej ekspresji u chorych z postacią rzutową SM w okresie rzutu choroby w porównaniu do zdrowych ochotników oraz 319, które uległy zmniejszonej ekspresji porównując te dwie grupy chorych. Z kolei u chorych z postacią rzutową SM okresie remisji w porównaniu do zdrowych ochotników wykazała, że 573 cząsteczki circRNA, wykazuje zwiększoną ekspresję, a 49 – wykazuje zmniejszoną ekspresję. Co ciekawe Doktorantka nie wykazała różnic ekspresji circRNA pomiędzy chorymi z postacią rzutową SM w okresie rzutu i podczas remisji. Doktorantka wykazała także, że genu kodujące circRNA wykazującą odmienną ekspresję są zlokalizowane na chromosomie 1 i chromosomie 3.

Walidacja uzyskanych wyników została przeprowadzona u kolejnej niezależnej grupypacjentów z rozpoznaniem postaci rzutowo-remisyjnej SM w okresie rzutów (n=19) lub remisji (28) oraz 27 zdrowych ochotników.

Doktorantka zastosowała specyficzne startery ukierunkowane na każdy circRNA i z powodzeniem amplifikowała pięć circRNA. Z tych pięciu circRNA w trzech przypadkach (hsa\_circRNA\_102611; hsa\_circRNA\_104361 i hsa\_circRNA\_101348) uzyskała istotnie statystycznie wyższą ekspresję u chorych z postacią rzutowo remisyjną SM w czasie rzutu choroby w porównaniu grupą kontrolną oraz dodatkowo potwierdziła, że różnicuje ona pacjentów z postacią rzutowo-reemisyjną SM w okresie rzutu i w okresie remisji. W kolejnym etapie badań Doktorantka zbadała korelację tych trzech w/w

circRNA występował z zmianami zapalnymi w rezonansie magnetycznym głowy i wykazała taką korelację z dwoma z trzech badanych circRNA (hsa-circRNA\_101348 oraz hsa\_circRNA\_104361). Z kolei trzeci circRNA (hsa\_circRNA\_102611) korelował z niepełnosprawnością, ale nie wykazywał związku ze zmianami zapalnymi.

Następnie Doktorantka przeprowadziła analizę miejsc wiązania miRNA z w/w circRNA powiązanymi z SM. W tym celu zidentyfikowała 5 najmocniej przewidywalnych miRNA dla każdego z trzech zidentyfikowanych circRNA. Analiza bioinformatyczna bardzo wnikliwie opisana przez Doktorantkę pozwoliła na końcu zidentyfikować pięć transkryptów kodujących białko będących celem molekularnym dla circRNA u chorych na SM, z tego dwa miRNA okazały się być zaangażowane w funkcje komórek B (AK2 i IKZF3). Mutacja AK2 powoduje upośledzenie proliferacji komórek B i hipogammaglobulinemię, natomiast w odniesieniu do IKZF3 wykazano, że jest on odpowiedzialny za proliferację i różnicowanie komórek B. Wyniki powyższej analizy bioinformatycznej zostały potwierdzone przez Doktorantkę w badanej grupie chorych z rzutem SM. Doktorantka udokumentowała, że circRNA ulegające odmiennej ekspresji u chorych z rzutem SM mają wpływ na transkrypcję białek związanych z funkcją limfocytów B.

Dyskusja stanowi podsumowanie wyników oraz omówienie ich znaczenia na tle aktualnych wyników innych autorów. Jak podkreśla sama Doktorantka najważniejszym odkryciem prezentowanej pracy jest stwierdzenie, że wśród pięciu cząsteczek miRNA podlegających regulacji przez circRNA zidentyfikowanych w prezentowanej pracy dwie cząsteczki miRNA, które mają wpływ na funkcję limfocytów B. Odkrycie Doktorantki potwierdza znaczenie limfocytów B w SM, które u chorych na SM są odpowiedzialne za prezentację antygenów w OUN, wydzielanie cytokin prozapalnych, wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom mieliny, oraz tworzenie tzw. ektopowych guzków limfatycznych. W dyskusji Doktorantka wskazuje, że dalsze badania mogą przyczynić się do potwierdzenia roli circRNA jako nowych biomarkerów diagnostycznych choroby. Dyskusja jest napisana bardzo ciekawie, podkreśla znaczenie odkrycia Doktorantki. Niektóre fragmenty dyskusji są powtórzeniem informacji, które Doktorantka umieściła we wstępie, co nieco rozprasza czytelnika.

Podsumowując, lek med. Anna Elżbieta Żurawska przedstawiła do recenzji pracę doktorską: „Znaczenie kolistych RNA (circRNA) w immunologii stwardnienia rozsianego”

która spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami. W związku z tym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosek o dopuszczenie Pani dr Anny Elżbiety Żurawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią bardzo duży wkład do wiedzy na temat znaczenia kolistych RNA (circRNA) w immunologii stwardnienia rozsianego. Uzyskane wyniki były prezentowane podczas uznanych konferencji międzynarodowych, a także są zawarte w publikacji w trakcie recenzji.

Składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o wyróżnienie pracy. Podstawą wyróżnienia mogą być bardzo istotne wartości poznawcze opracowanego problemu oraz jego przedstawienie w sposób merytorycznie poprawny i bardzo ciekawy.