

Katowice /08.11.2022 r.

Oddział Kliniczny
Perinatologii
i Ginekologii
Onkologicznej
Wydziału Nauk
Medycznych
w Katowicach

Sosnowiecki Szpital Miejski Sp. z o.o.
Ul. Zagadłowicza 3,
41-200 Sosnowiec
www.sum.edu.pl

Kierownik
Oddziału Klinicznego
prof. dr hab. n. med.
Marek Kudła

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Erol pt. „Poszukiwanie molekularnych markerów terapeutyczno-diagnostycznych opartych o transkryptomyczne analizy niskozróżnicowanego surowiczego nowotworu jajnika” przeprowadzona w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Corocznie ponad 200 tys. kobiet umiera z powodu nowotworu jajnika i pomimo postępu diagnostyki oraz unowocześnianych metod leczenia prognozy dotyczące przeżycia 5-letniego wielu pacjentek wciąż są bardzo niekorzystne. Najczęstszym podtypem tego nowotworu jest niskozróżnicowany surowiczy rak jajnika (ang. High-Grade Serous Ovarian Cancer, HGSOC), który cechuje się też najbardziej agresywnym przebiegiem. Z powodu niespecyficznych objawów oraz braku czułych oraz specyficznych metod wczesnej diagnozy, kobiety diagnozowane są najczęściej już w zaawansowanym stadium tej choroby, kiedy szanse na przeżycie znacznie maleją. Nowotwór ten poddany leczeniu, najczęściej dość szybko staje się oporny na leczenie. Z tego powodu lepsze zrozumienie jego biologii oraz wprowadzenie nowych metod terapeutycznych mogłyby realnie wpłynąć na życie wielu pacjentek.

Rozwój technologii badawczych ma olbrzymi wpływ na wiele dziedzin, w tym również na onkologię oraz biologię molekularną. Sekwencjonowanie Nowej Generacji (ang. Next Generation Sequencing) stworzyło naukowcom i lekarzom możliwość badania zarówno sekwencji DNA, RNA, jak i zmian w epigenomie. Wiedza ta pozwala lepiej zrozumieć, np. zmiany zachodzące w trakcie nowotworzenia oraz wskazuje na nowe cele terapeutyczne.

Nowoczesne metody molekularne oparte na analizach całego transkryptomu guza nowotworowego pozwalają ocenić zarówno ekspresję genów kodujących białka (mRNA) oraz tych niekodujących (ncRNA), co umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmu regulacji ekspresji oraz progresji choroby nowotworowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Erol jest niezwykle cenną próbą wykorzystania nowoczesnych metod badawczych dla zrozumienia mechanizmów związanych z szlakami patogenetycznymi w przebiegu niskozróżnicowanego surowiczego raka jajnika oraz podjęciem poszukiwania biomarkerów, które mogą być przydatne w potencjalnej terapii lub diagnostyce tego nowotworu o wysokim stopniu złośliwości (HGSOC).

Rozprawa doktorska mgr Anny Erol jest napisana w formie monografii w języku angielskim i obejmuje 68 stron. Ma klasyczny układ, zawiera streszczenia w języku angielskim i polskim, spis skrótów, tabele i ryciny, wstęp, cele pracy doktorskiej, metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię. Dodatkowo tekst wzbogacono o 5 tabel i 8 rycin oraz 3 dodatkowe tabele w części materiałów uzupełniających.

We wstępie Autorka w przystępny i wyczerpujący sposób opisała aktualną wiedzę dotyczącą badań molekularnego podłoża nowotworów jajnika oraz technologiczną rewolucję w zakresie metodologii badań ekspresji genów jaka jest związana z technologią Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS). W oparciu o najnowszą literaturę naukową omówiła rolę niekodujących sekwencji RNA w regulacji interakcji (crosstalk) między RNA a ekspresją genów oraz metody poszukiwania zindywidualizowanych celów terapii w kontekście roli medycyny precyzyjnej w nowoczesnej terapii onkologicznej.

Głównym celem projektu doktorskiego Anny Erol było przeprowadzenie kompleksowej analizy tkankowych profili RNA w tkankach guza HGSOC w porównaniu do tkanek nie zmienionych nowotworowo.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Badanie różnic w ekspresji genów kodujących, lncRNA i miRNA między guzami pierwotnymi HGSOC a próbkami kontrolnymi.
2. Identyfikację kluczowych genów najbardziej zmieniających ekspresję, które mogą być w przyszłości wykorzystane jako cel molekularny.

3. Identyfikację kluczowych mechanizmów i szlaków molekularnych w HGSOc i ich regulację poprzez budowę sieci ceRNA w oparciu o nowoczesne platformy analityczne (DEG, DEM i DEL).

4. Poszukiwanie potencjalnych celów terapeutycznych przy użyciu metod bioinformatycznych i dostępnej wiedzy z piśmiennictwa naukowego.

Badania przedstawione w tej rozprawie obejmują analizę 33 pierwotnych tkanek guza HGSOc i 33 próbek tkanek jajnika usuniętych podczas procedur nieonkologicznych.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań różnic ekspresji genów lncRNA i miRNA między guzami pierwotnymi HGSOc, a próbkami kontrolnymi, wykazały 2330 genów o obniżonej ekspresji i 2570 genów o podwyższonej ekspresji. Analiza DEMs ujawniła 146 miRNA o obniżonej ekspresji i 132 miRNA o podwyższonej ekspresji, podczas gdy analiza DELs wykazała 1058 lncRNA o obniżonej ekspresji i 1054 lncRNA o podwyższonej ekspresji.

Dalsza analiza kluczowych mechanizmów i szlaków molekularnych u pacjentek z HGSOc skupiła się na interakcjach między konkurującymi endogennymi RNA (ceRNA), w tym mRNA, długimi niekodującymi RNA (lncRNA) i mikroRNA (miRNA) oraz ich interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi (TF).

W ocenianej rozprawie doktorskiej na podstawie wykonanych analiz zidentyfikowano związki PI-103 i ZSTK474, które są inhibitorami szlaku kinazy 3-fosfoinozytydowej (PI3K), jako potencjalne leki w terapii niskozróżnicowanego surowiczego raka jajnika. Szlak PI3K, który bierze udział w rozwijaniu lekooporności w raku jajnika jest ściśle powiązany z genami zidentyfikowanymi w sieci ceRNA.

Wyniki rozprawy doktorskiej mgr Anny Erol pozwalają na szczegółową analizę biologii molekularnej raka jajnika. Identyfikacja kluczowych ścieżek i zrozumienie ich regulacji w patogenezie i progresji choroby mogą być wykorzystywane jako cel molekularny oraz poszukiwanie potencjalnych środków terapeutycznych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i dotychczasowej wiedzy dotyczącej poszczególnych szlaków.

Z obowiązku Recenzenta należy zwrócić uwagę na konieczność wykonania, przed wysłaniem manuskryptu pracy do druku w renomowanym czasopiśmie naukowym,

funkcjonalnych badań potencjalnych środków terapeutycznych na liniach komórkowych (*in vitro*) w celu walidacji hipotez uzyskanych *in silico*.

W podsumowaniu bardzo wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską i wykonane badania, które mogą przyczynić się do opracowania nowych możliwości leczenia pacjentek z niskozróżnicowanym surowiczym rakiem jajnika (HGSOC). Autorka wykazała umiejętności właściwego zaplanowania i wykonania niezwykle skomplikowanego i opartego na najnowocześniejszych metodach diagnostycznych projektu badawczego.

Mgr Anna Erol sformułowała interesujące cele badawcze, przeprowadziła właściwe analizy statystyczne i bioinformatyczne oraz wyciągnęła interesujące wnioski z przeprowadzonych badań. Przedstawiona rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie o stopniach naukowych (Ustawa z dnia 20 lipca 2018r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, Dz. U. z 2021r., poz 478).

Mając na uwadze powyższe przedkładam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Anny Erol do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marek Kudła





Katowice /08.11.2022 r.

Oddział Kliniczny
Perinatologii
i Ginekologii
Onkologicznej
Wydziału Nauk
Medycznych
w Katowicach

Sosnowiecki Szpital Miejski Sp. z o.o.
Ul. Zagadkowicza 3,
41-200 Sosnowiec
www.sum.edu.pl

Kierownik
Oddziału Klinicznego
prof. dr hab. n. med.
Marek Kudła

Assessment of the doctoral dissertation of Anna Erol, entitled "Search for molecular therapeutic and diagnostic markers based on transcriptomic analyzes of poorly differentiated serous ovarian cancer" carried out at the Clinical Research Center of the Medical University of Białystok

Every year, over 200,000 of women die of ovarian cancer, and despite the progress in diagnostics and modernized methods of treatment - the prognosis for 5-year survival of many patients is still dramatically unfavorable. The most common subtype of this cancer is High-Grade Serous Ovarian Cancer (HGSOC), which also has the most aggressive course. Due to non-specific symptoms and the lack of sensitive and specific methods of early diagnosis, women are most often diagnosed at an advanced stage of the disease, when the chances of survival are significantly reduced. After treatment, this neoplasm usually becomes resistant quite quickly. For this reason, a better understanding of the biology of this cancer and new treatment methods could have a real impact on the lives of many patients.

The development of research technologies has a huge impact on many fields, including oncology and molecular biology. Next Generation Sequencing has made it possible for scientists and physicians to study both DNA and RNA sequences and changes in the epigenome. This knowledge allows us to better understand, for example, changes occurring in the course of cancer, and allows us to look for new therapeutic targets. Modern molecular methods based on the analysis of the entire tumor transcriptome allow to assess the expression of both protein-coding (mRNA) and non-coding (ncRNA) genes, which enables a better understanding of the mechanism of expression regulation and tumor progression.



The doctoral dissertation of Anna Erol, M.Sc., presented for evaluation is an extremely valuable attempt to use modern research methods to understand the mechanisms associated with pathogenetic pathways in the course of poorly differentiated serous ovarian cancer and to search for biomarkers that may be useful in the potential therapy or diagnosis of this high-grade cancer (HGSOC).

Anna Erol's doctoral dissertation is written in the form of a monograph in English and covers 68 pages. It has a classic layout, contains summaries in English and Polish, a list of abbreviations, tables and figures, introduction, objectives of the doctoral dissertation, methodology, results, discussion, conclusions and bibliography. Additionally, the text was enriched with 5 tables and 8 figures, and 3 additional tables in some of the supplementary materials.

In the introduction, the Author describes in an accessible and comprehensive way the current knowledge on the study of the molecular basis of ovarian cancer and the technological revolution in the field of gene expression research methodology related to the Next Generation Sequencing (NGS) technology. Based on the latest scientific literature, the role of non-coding RNA sequences in the regulation of interactions (crosstalk) between RNA and gene expression as well as methods of searching for individualized goals of therapy in the context of the role of precision medicine in modern oncological therapy was also discussed.

The main objective of Anna Erol's doctoral project was to conduct a comprehensive analysis of tissue RNA profiles in HGSOC tumor tissues in comparison to non-neoplastic tissues.

The specific objectives included:

1. Study of the differences in the expression of coding genes, lncRNA and miRNA between the primary HGSOC tumor and control samples.
2. Identification of key expression-altering genes that can be used as a molecular target in the future.
3. Identification of key molecular mechanisms and pathways in HGSOC and its regulation by building a ceRNA network based on modern analytical platforms (DEG, DEM and DEL).
4. Searching for potential therapeutic targets using bioinformatics methods and available knowledge from scientific literature.

The research presented in this dissertation includes the analysis of 33 primary HGSOC tumor tissues and 33 ovarian tissue samples removed during non-oncological procedures.

The results of gene expression studies, lncRNA and miRNA between the primary HGSOC tumor and control samples presented in the dissertation showed 2330 genes with reduced expression and 2570 genes with increased expression. DEMs analysis revealed 146 down-expressed miRNAs and 132 up-expressed miRNAs, while DELs analysis revealed 1058 lncRNAs with low expression and 1054 lncRNAs with upregulation.

Further analysis of the key molecular mechanisms and pathways in HGSOC patients focused on the interactions between competing endogenous RNAs (ceRNAs) including mRNAs, long non-coding RNAs (lncRNAs) and microRNAs (miRNAs) and their interactions with transcription factors (TFs).

In the reviewed doctoral dissertation, on the basis of the performed analyzes, the compounds PI-103 and ZSTK474, which are inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway, were identified as potential drugs in the treatment of poorly differentiated serous ovarian cancer. The PI3K pathway, which is involved in the development of drug resistance in ovarian cancer, is closely related to the genes identified in the ceRNA network.

The results of Anna Erol's doctoral dissertation allow for a detailed analysis of the molecular biology of ovarian cancer. Identification of key pathways and understanding their regulation in the pathogenesis and progression of the disease can be used as a molecular target and the search for potential therapeutic agents using bioinformatics tools and the existing knowledge on individual pathways.

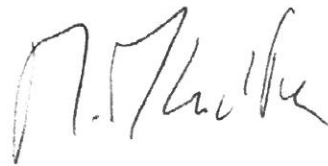
It is the responsibility of the Reviewer to pay attention to the necessity to perform, prior to sending the manuscript for publication in a reputable scientific journal, functional tests of potential therapeutic agents on cell lines (in vitro) in order to validate hypotheses obtained in silico.

In conclusion, I highly appreciate the presented doctoral dissertation and the research carried out, which may contribute to the development of new treatment options for patients with poorly differentiated serous ovarian cancer (HGSOC). The author has demonstrated the ability to properly plan and implement an extremely complex research project based on the

most modern diagnostic methods. Anna Erol formulated interesting research aims, conducted appropriate statistical and bioinformatics analyzes and drew interesting conclusions from the conducted research.

The presented doctoral dissertation meets the requirements set out in the appropriate acts (Ustawa z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. z 2021r., poz 478). Therefore, I strongly recommend the Senate of the Medical University of Białystok, that the dissertation move to further stages of the doctorate process and may be subjected to a public defense.

Prof.dr hab.n.med. Marek Kudła

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Kudła', written in a cursive style.