



Warszawa, 20.05.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Effi Haque p.t. „Ocena wpływu mutacji genów z rodziny NRF2 i HNF występujących w ludzkim raku wątroby na aktywność transkrypcyjną w komórkach ssaków”

(„Evaluation of the effect of the NRF2 and HNF family genes mutations found in human liver cancer on transcriptional activity using mammalian cells”)

wykonanej w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora Pana profesora dr hab. Mariusza Pierzchały i promotora pomocniczego dr Hiroaki Taniguchi

Nowotwory, w tym rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* - HCC) stanowiący przedmiot badań w rozprawie doktorskiej mgr inż. Effi Haque to nadal ogromny problem w medycynie ludzkiej. Mimo postępu w zakresie zastosowania nowych terapii i intensywnych badań nad przyczynami rozwoju choroby nowotworowej, rak wątroby nadal pozostaje jednym z najbardziej agresywnych nowotworów u ludzi, charakteryzującym się wysoką zachorowalnością i śmiertelnością, zwłaszcza w Azji Wschodniej. Dlatego wybór tematyki dotyczącej określenia wpływu mutacji czynników transkrypcyjnych w genomie raka wątroby na aktywność transkrypcyjną w komórkach ssaków jest bardzo ciekawy i wpisuje się w nurt nowatorskich badań onkologicznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Effi Haque została przygotowana w języku angielskim w sposób właściwy dla rozpraw doktorskich stanowiących zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, spełniając tym samym wymogi formalne stawiane tego typu dziełom. Rozprawę stanowią trzy publikacje: jeden artykuł przeglądowy opublikowany w 2020 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* i dwie oryginalne prace badawcze opublikowane w 2021 i 2022 roku odpowiednio w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Genes*.

Pierwszą część rozprawy stanowi manuskrypt obejmujący: listę publikacji zawartych w rozprawie, wykaz skrótów, streszczenie w języku angielskim i polskim, wstęp, opis hipotezy badawczej, wyjaśnienie celu badań, opis wykorzystanych materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników, dyskusję, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Kolejną część rozprawy stanowią załączone kopie artykułów naukowych oraz pisemne oświadczenia współautorów w języku angielskim i polskim.

Publikacje naukowe tworzące rozprawę doktorską stanowią w mojej opinii spójny tematycznie cykl. Choć nie są uszeregowane chronologicznie wszystkie publikacje dotyczą badań nad ludzkim rakiem wątroby i roli w jego etiopatogenezie specyficznych somatycznych mutacji czynników transkrypcyjnych z dwóch rodzin. Po pierwsze czynników transkrypcyjnych związanych ze stresem oksydacyjnym z rodziny NRF2 z ang. „*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*”, a po drugie genów z rodziny HNF, a przede wszystkim HNF1A z ang. “*hepatocyte nuclear factor 1A*”, który reguluje homeostazę wątroby i organogenezę, a także wiele funkcji hepatocytów. Ocena wpływu wybranych mutacji w genie NRF2 na aktywność transkrypcyjną została określona w mysich i ludzkich liniach komórkowych raka wątroby (Hepa1-6, Huh7), zaś mutacji w genie HNF1A w ludzkiej linii komórek raka wątroby (Huh7).

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy Web of Science, a ich łączny współczynnik wpływu tzw. *impact factor* wynosi 15,944, zaś suma punktów MNiSW – 350 punktów. Są to w mojej opinii wysokie wskaźniki, które świadczą o dużej wartości merytorycznej i poznawczej stanowiącego rozprawę doktorską cyklu publikacji. We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem i deklaruje znaczący wkład w powstanie publikacji. W oryginalnych pracach badawczych polegał on na opracowaniu koncepcji badawczej czyli ustaleniu celu oraz głównych aspektów procesu badawczego; opracowaniu metodyki badań, gromadzeniu i przygotowaniu materiału do analiz; przeprowadzeniu doświadczeń i walidacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. A w przypadku pracy przeglądowej napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin.

We *Wstępie* pracy Doktorantka przedstawia dane dotyczące epidemiologii nowotworów wątroby oraz opisuje etiologię raka wątrobowokomórkowego i molekularne mechanizmy jego progresji. Następnie opisuje zmiany genetyczne w raku wątrobowokomórkowym, skupiając się na mutacjach genu *NRF2* i ich roli w rozwoju tego nowotworu. Rozwinięciem i uzupełnieniem tej części rozprawy jest zawarta w cyklu publikacji praca przeglądowa, która dotyczy właśnie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw indukcji raka wątrobowokomórkowego przy występowaniu mutacji *NRF2*. W pracy przeglądowej Doktorantka wraz z współautorami opisuje w jaki sposób nieprawidłowa aktywacja *NRF2* oraz innych czynników z rodziny NRF wpływa na rozwój raka wątroby. Według danych literaturowych przedstawionych w artykule mutacje w genie *NRF2*, powodujące akumulację *NRF2* w jądrze komórkowym sprzyjają powstawaniu raka wątroby, a dokładnie progresji zmian przedrakowych do nowotworu złośliwego. Początkowo uważano, że *NRF2* chroni wątrobę przed stresem oksydacyjnym, gdyż reguluje ekspresję szeregu genów antyoksydacyjnych i enzymów detoksykacyjnych. Ostatnie badania wykazały jednak, że nadmierna aktywność transkrypcyjna *NRF2* promuje rozwój raka wątroby poprzez regulację ekspresji genów docelowych, ale także zaburzenia metabolizmu lipidów, prowadzące do zapalenia bądź stłuszczenia wątroby. Podczas stresu oksydacyjnego komórki inicjują odpowiedź adaptacyjną, która zwiększa ekspresję szeregu genów cytoprotekcyjnych m.in. genu kodującego oksydoreduktazę hemową-1 (HO-1). Jest to enzym biorący udział w biodegradacji hemu, o szerokim spektrum działania antyoksydacyjnego. W zdrowych komórkach HO-1

wykazuje działanie cytoochronne poprzez detoksykację i mechanizmy eliminacji wolnych rodników, które zmniejszają ryzyko inicjacji procesu kancerogenezy. Jednak w mikrośrodowisku rozwijającego się guza utrzymująca się nadekspresja NRF2, który ściśle reguluje ekspresję HO-1 sprawia, że enzym ten zaczyna odgrywać rolę pro-nowotworową poprzez zwiększenie proliferacji komórek nowotworowych i przerzutowania oraz blokowanie ich śmierci. Mechanizmy powodujące rozwój raka wątrobowokomórkowego przy mutacjach NRF2 zostały przedstawione również graficznie w postaci ryciny w pracy przeglądowej. W ostatniej części *Wstępu* Doktorantka opisuje budowę i funkcję HNF1A oraz sieć wzajemnych zależności między HNF1A a HNF4A, podkreślając konieczność szerszego zbadania wpływu mutacji HNF1A na rozwój raka wątroby i określenia szlaków zaangażowanych w kancerogenezę.

Reasumując wykorzystanie w tej części rozprawy bogatej bazy danych literaturowych świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki oraz dojrzałym warsztacie badawczym Doktorantki.

Następnie Autorka przedstawia trzy hipotezy badawcze. Pierwsza zakłada, że mutacje w domenie funkcjonalnej NRF2 promują nieprawidłową aktywność transkrypcyjną, która wpływa na hepatokancerogenezę poprzez zwiększoną transkrypcję genów docelowych. Druga, że mutacje w domenie funkcjonalnej HNF1A wpływają na hepatokancerogenezę wywołaną utratą funkcji HNF1A i HNF4A. Trzecia zakłada, że utrata funkcji HNF1A powoduje istotne rozregulowanie metabolizmu lipidów i cholesterolu.

W kolejnym rozdziale Autorka w oparciu o przedstawione hipotezy badawcze definiuje dwa główne cele badawcze: 1) określenie wpływu wybranych mutacji NRF2 na złośliwą transformację nowotworową komórek linii Hepa1-6, Huh7 przez nieprawidłową aktywność transkrypcyjną oraz 2) określenie wpływu wybranych mutacji HNF1 na złośliwą transformację komórek raka wątroby przez utratę funkcji HNF1A oraz na metabolizm.

W części *Materiały i Metody* Doktorantka skrótowo opisuje wykorzystane linie komórkowe oraz plamidy i startery. Ponadto, test reporterowy, analizę z wykorzystaniem techniki Western blot, barwienie immunofluorescencyjne, a także szereg różnorodnych technik biologii molekularnej oraz analizę statystyczną; odnosząc się do odpowiednich oryginalnych prac eksperymentalnych.

Podobnie w rozdziale *Wyniki* znaleźć można zwięzły opis uzyskanych wyników z odniesieniem do poszczególnych rycin zawartych w oryginalnych publikacjach. Zważywszy na fakt, iż obie oryginalne prace badawcze były już poddane wnikliwej analizie i ocenie pod względem merytorycznym przez specjalistów z dziedziny genetyki w procesie recenzji (w formie tzw. *peer-review*) oraz ze względu na mnogość uzyskanych przez Doktorantkę wyników nie będę przedstawiać ich wszystkich szczegółowo. Chciałabym jednak podkreślić, iż fakt ich opublikowania w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z listy JCR wskazuje na ich wysoką wartość naukową.

W ogólnym zarysie w pierwszej pracy oryginalnej Doktorantka wykazała, że mutacje zlokalizowane w funkcjonalnej domenie DLG NRF2 (D29A i L30F), znalezione u japońskich pacjentów z rakiem wątroby, zwiększają aktywność transkrypcyjną NRF2 w liniach komórkowych raka wątrobowokomórkowego (HCC). Ponadto, aktywność transkrypcyjna mutacji NRF2 nie jest tłumiona przez KEAP1 - białko, które w warunkach prawidłowych ułatwia ubikwitynację i późniejszą proteolizę NRF2. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że somatyczne mutacje NRF2 zaburzają prawidłowe wiązanie NRF2 z KEAP1, blokując jego (NRF2) degradację. Dodatkowo Autorka dowiodła, że obie mutacje somatyczne (zarówno D29A jak i L30F) zwiększają aktywność transkrypcyjną NRF2 na promotorze genu kodującego metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (*MMP9*) w mysich i ludzkich liniach komórkowych raka wątroby. Ze względu na fakt, że *MMP9* jest markerem inwazyjności komórek nowotworowych, a jej wzmożona ekspresja koreluje ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i wpływa na angiogenezę, uzyskane wyniki są niezwykle ciekawe i sugerują, że pozyskane poprzez mutacje wzmocnienie funkcji NRF2 może być bardzo istotne dla progresji raka wątrobowokomórkowego (HCC). Ponadto, Doktorantka wykazała, że mutacje NRF2 działają synergistycznie z innymi mutacjami onkogennymi tj. genu *BRAF* (V600E), powodując zwiększoną aktywność transkrypcyjną na promotorze *MMP9*.

Z kolei w drugiej pracy oryginalnej Doktorantka prezentuje wyniki dotyczące badań mutacji HFN1A zlokalizowanych w funkcjonalnej domenie POU (Y122C, R229Q and V259F). W pracy wykazano, że mutacje te hamują aktywność promotora HNF4A, zakłócając wiązanie HNF1A z jego docelowym promotorem HNF4A, bez wpływu na jego lokalizację jądrową. Zakłócenie wiązania z *HNF4A* związane jest ze zmianą konformacyjną w N-końcowym regionie HNF1A, powodowaną przez mutację V259F, co zostało stwierdzone na podstawie symulacji strukturalnej. Udokumentowane przez Autorkę upośledzenie wiązanie do DNA jest więc przyczyną zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej mutantów HNF1A. Obniżenie ekspresji genu docelowego HNF4A na skutek mutacji HFN1A zostało zmodelowane w pracy poprzez wyciszenie ekspresji HNF4A z wykorzystaniem siRNA w ludzkich komórkach raka wątroby (*siRNA-mediated knockdown of HNF4A*). Następnie została przeprowadzona analiza sekwencjonowania RNA transfekowanych komórek raka wątroby, która wykazała istnienie 748 genów o zmienionej ekspresji, z których 311 genów wykazywało obniżoną ekspresję (np. *HNF1A*, *ApoB* i *SOAT2*), a 437 genów wykazywało podwyższoną ekspresję. Dalsza analiza wykazała, że geny o obniżonej ekspresji zaangażowane były o organizację macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w szlaki metabolizmu lipidów i cholesterolu, które są również powiązane z rozwojem raka wątrobowokomórkowego (HCC).

Reasumując, w mojej opinii zaprezentowane wyniki mają dużą wartość poznawczą i jak twierdzi sama Autorka gwarantują dalsze badania dotyczące ich potencjalnej użyteczności diagnostycznej, prognostycznej, a także terapeutycznej w raku wątroby u ludzi.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki z dostępną literaturą, ponownie odnosząc się dwóch opublikowanych prac

eksperymentalnych. Opisuje znaczenie mutacji badanych genów w rozwoju różnych typów nowotworów, a także cukrzycy - mutacje HFN1A. Jednocześnie wskazuje na nowatorski charakter przeprowadzonych badań i wyniki które uzupełniają aktualny stan wiedzy w dziedzinie genetyki nowotworów wątroby, m.in. wykazuje że mutacje NRF2 znacznie redukują powinowactwo do KEAP1, co skutkuje zablokowaniem degradacji NRF2. Zwraca także uwagę na role NRF2 w regulacji aktywności transkrypcyjnej MMP9 i sugeruje iż mutacje NRF2 wpływają na rozwój raka wątroby poprzez zwiększenie inwazyjności komórek. Komórki z mutacjami NRF2 uzyskują w ten sposób złośliwy fenotyp. Wreszcie po raz pierwszy w literaturze dokumentuje fakt, że mutacje NRF2 wraz z onkogeną mutacją BRAF V600E wpływają synergistycznie na zmienioną aktywność transkrypcyjną w komórkach raka wątroby. Ponadto, doktorantka potwierdza, że mutacje HFN1A znacznie zmniejszają jego zdolność do wiązania z promotorem *HFN4A*, gdyż powodują zmiany konformacyjne, które ograniczają wiązanie z DNA. Skutkiem czego zmniejsza się ekspresja HFN4A, który reguluje homeostazę lipidów i cholesterolu w wątrobie. Wyniki badań sugerują zatem iż mutacje HFN1A mogą powodować rozwój i progresję raka wątroby poprzez zakłócenie metabolizmu lipidów i cholesterolu w wątrobie spowodowane zredukowana ekspresją HFN4A.

W ostatniej części rozprawy Doktoranta formułuje sześć wniosków, logicznie wynikających z analizy uzyskanych wyników.

Podsumowując, w ogólnej ocenie merytorycznej stwierdzam, że postawione przez Doktorantkę cele naukowe zostały w pełni zrealizowane i udokumentowane w postaci dwóch oryginalnych prac badawczych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, co wskazuje na ich wysoką wartość naukową. Doktorantka dokonała charakterystyki i walidacji funkcjonalnej wybranych mutacji znajdujących się w funkcjonalnej domenie czynników transkrypcyjnych NRF2 i HNF1A potencjalnie odpowiedzialnych za rozwój raka wątrobowokomórkowego.

Na podstawie przeprowadzonej analizy rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Effi Haque stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm). Niniejsza praca stanowi oryginalne opracowanie, które w istotny sposób poszerza wiedzę na temat patogenezy raka wątroby i wyjaśnia jak specyficzne mutacje czynników transkrypcyjnych NRF2 i HNF1A mogą wpływać na progresję raka wątroby. Treść rozprawy wskazuje na wysoki poziom wiedzy naukowej Autorki oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Effi Haque do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim oraz wnioskuję o wyróżnienie pracy.



dr hab. Kinga Majchrzak - Kuligowska



Uchwała Nr 15/2022

Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Pan w Jastrzębcu

z dnia 23 września 2022 r.

w sprawie zmiany promotora w przewodzie doktorskim

Na podstawie art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z póź. zm.) w związku z art. 33 ust. 2 ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw (Dz. U. Nr 84, poz. 455) Rada Naukowa IGiBZ PAN uchwała co następuje:

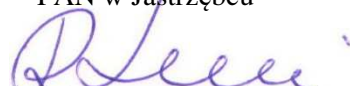
§ 1.

Zmienia się promotora w przewodzie doktorskim **mgr Effi Haque** z **prof. dr hab. Mariusza Pierzchały** na **dr hab. Hiroaki Taniguchi**.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Rady Naukowej IGiBZ
PAN w Jastrzębcu



Prof. dr hab. Ryszard Słomski