

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Bednarek pt. „Udział wybranych genów
o potencjale onkogennym lub supresorowym w patogenezie
płaskonabłonkowego raka krtani”**

Płaskonabłonkowy rak krtani stanowi znaczący problem medyczny i społeczny. Zapadalność na ten typ nowotworu oraz śmiertelność utrzymują się od lat na wysokim poziomie. Duże nadzieje pokłada się w badaniach identyfikujących markery nowotworowe, które mogą umożliwić wczesną diagnostykę i skuteczne leczenie. Do takiej grupy należą markery genomowe będące podstawą do opracowania skutecznej terapii spersonalizowanej, dlatego temat podjęty przez mgr Kingę Bednarek uważam za ważny i aktualny.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ typowy: liczy 181 stron, zawiera 40 tabel, 28 rycin. Treść pracy została przedstawiona w 14 rozdziałach.

We wstępie mgr Kinga Bednarek przedstawiła stan wiedzy dotyczący epidemiologii i etiologii raka krtani. Wyczerpująco omówiła mechanizmy transformacji nowotworowej oraz rolę onkogenów i genów supresorowych. Przedstawiła metody leczenia raka krtani oraz szczegółowo scharakteryzowała analizowane geny oraz w sposób logiczny wyprowadziła cele badawcze, które sformułowała następująco:

Celem pracy była analiza udziału wybranych genów - potencjalnych onkogenów i genów supresji nowotworowej - w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani.

Cel główny realizowano poprzez cele szczegółowe:

1. selekcję genów na podstawie zmian profilu ich ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani, informacji zgromadzonych w genetycznych bazach danych i literaturze,
2. analizę korelacji ekspresji analizowanych genów z parametrami histologiczno-klinicznymi w oparciu o klasyfikację stopnia zaawansowania choroby (TNM i G),
3. identyfikację mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za zmiany poziomu ekspresji analizowanych genów,
4. potwierdzenie potencjału onkogennego bądź supresorowego wytypowanych genów w przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani.

Materiał badawczy stanowiło:

1. 25 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani udostępnionych przez badaczy fińskich.
2. Fragmenty guzów pierwotnych pobrane od 35 mężczyzn oraz 5 kobiet ze zdiagnozowanym płaskonabłonkowym rakiem krtani w trakcie laryngektomii całkowitej.
3. Do materiału badawczego odpowiednio dobrano tkanki stanowiące materiał kontrolny.

Liczebność grupy badanej jest wystarczająca do osiągnięcia większości zamierzonych celów badawczych. Ponieważ Doktorantka zaobserwowała także zależności na granicy istotności statystycznej zwiększenie grupy badanej prawdopodobnie umożliwiłoby dokładniejszą analizę. Nasuwa się również pytanie, czy nie było możliwości uzyskania linii komórkowych raka krtani z populacji polskiej. Istnieje prawdopodobieństwo, że czynniki genetyczne jak i niektóre czynniki środowiskowe wpływające na rozwój tego nowotworu mogą być różne w obu populacjach.

Metodykę badań molekularnych jak i typ analiz statystycznych dobrano prawidłowo i opisano szczegółowo.

Wyniki zostały zestawione w tabelach i szczegółowo opisane w sposób przyjazny dla czytelnika. Zaobserwowano potencjalne zaangażowanie poszczególnych genów w różnym stadium choroby:

- obniżony poziom ekspresji genów *FUT3* oraz *CEACAM6* liniach komórkowych wyprowadzonych ze wznów (porównaniu z grupą kontrolną) oraz niski poziom ekspresji genu *FUT3* w guzach dających przerzuty mogą sugerować ich znaczenie w zaawansowanych nowotworach krtani,
- zmieniony w stosunku do grupy kontrolnej poziom ekspresji genów: *LAPTM4B*, *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4* w liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów o niskim stopniu zaawansowania (T1/2 i G1/2) sugeruje ich udział we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu,
- istotne różnice w poziomie ekspresji genu *CLCA4* pomiędzy liniami komórkowymi wyprowadzonymi z guzów dających przerzuty (N+) i niedających przerzutów (N0) wskazują na jego udział w tworzeniu przerzutów raka krtani do węzłów chłonnych.
- jako potencjalny onkogen wytypowano gen *CDK1*. Potwierdzono jego zwiększoną ekspresję w LSCC w odniesieniu do prawidłowej krtani oraz innych tkanek obrębu głowy i szyi zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Przeanalizowano skutki jego

wyciszenia w komórkach nowotworowych, wskazując brak zmian w żywotności i proliferacji komórek nowotworowych w liniach o obniżonym poziomie *CDK1*. Uzyskane wyniki nie były wystarczające, aby *CDK1* uznać za onkogen w analizowanym typie nowotworu. Ponadto wytypowano geny o istotnie zmienionej ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu *CDK1*: *CDK6*, *FYN* oraz *CALD1* jako potencjalnie od niego zależne i, być może, kompensujące niedobory *CDK1* w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani.

- dla genu *CEACAM6* ustalono potencjalną przyczynę obniżonej ekspresji w LSCC. Ze względu na obserwowaną hipermetylację DNA w liniach komórkowych LSCC w stosunku do nienowotworowych prób kontrolnych gen ten uznany został za potencjalny gen supresji nowotworowej w tym typie raka. Jednakże uzyskane w toku pracy wyniki, między innymi brak korelacji pomiędzy poziomem metylacji DNA genu a poziomem jego ekspresji, nie pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie tej hipotezy.
- obserwowana istotność zmian poziomu ekspresji genów *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LPTM4B*, *SERPINH1* w liniach komórkowych LSCC w odniesieniu do prób kontrolnych sugeruje ich zaangażowanie w rozwój płaskonabłonkowego raka krtani.

Sformułowano następujące wnioski:

1. Wyniki badań wskazują na potencjalny udział genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LPTM4B*, w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani.
2. Korelacja poziomu ekspresji genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LPTM4B* z danymi histopatologiczno-klinicznymi nowotworu (w oparciu o klasyfikację TNM oraz G) wskazuje na:
 - A. zaangażowanie genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *LPTM4B*, we wczesnym etapie nowotworzenia,
 - B. obniżenie ekspresji genów *CEACAM6* i *FUT3* w zaawansowanych nowotworach krtani,
 - C. udział genu *CLCA4* w tworzeniu przerzutów raka krtani do węzłów chłonnych.
3. Wskazano hipermetylację DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* jako potencjalną przyczynę obniżenia jego ekspresji w LSCC. Jednocześnie wykluczono zmiany liczby kopii DNA badanych genów oraz mutacje w sekwencji DNA jako czynniki wpływające na obserwowane zmiany poziomu ich ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani.
4. Uzyskane w toku niniejszej pracy wyniki:

- A. nie pozwalają na jednoznaczne uznanie genu *CEACAM6* za gen supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani,
- B. nie potwierdzają onkogennej roli genu *CDK1* w płaskonabłonkowym raku krtani,
- C. sugerują występowanie mechanizmu kompensacji niedoboru białka CDK1 w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani, który pozwala na utrzymanie niezmiennego tempa proliferacji i żywotności komórek. Wskazano trzy potencjalne geny dla dopełniania funkcji CDK1: *CALDI*, *CDK6* i *FYN*.

Dyskusja zawarta w załączonych publikacjach jest dojrzała, w sposób krytyczny odnosi się do uzyskanych wyników oraz uwzględnia aktualną literaturę.

Wnioski odnoszą się do uzyskanych wyników i są prawidłowo sformułowane z wyjątkiem wniosku 2B, który ma formę podsumowania wyniku.

Mam kilka uwag głównie o charakterze redakcyjnym. W rozdziale „Materiał” – str. 23 - Autorka używa określenia „stadium histologicznej dojrzałości” – prawidłowym określeniem jest „stopień histologicznej złośliwości. Nie powinno się używać określenia guzy „wysoko zaawansowane” (str. 75), ale „o wysokim stopniu zaawansowania klinicznego”. W kilku przypadkach nazwy genów nie są zapisane kursywą (np. str 19,). Zmiany DNA dotyczące komórek somatycznych nie powinny być określane jako genetyczne (str. 9, 16), ale genomowe, ponieważ nie są one dziedziczne. W kilku przypadkach opisywane w tekście rysunki są w oddaleniu kilku stron co utrudnia analizę (str. 68). Opis tabeli 7 zawiera nieprawidłową liczbę linii komórkowych wyprowadzonych ze wznów. Pomocne byłoby wstawienie liczebności grup do tabeli (np tabela 7 czy 8). Kilkakrotnie użyto zwrotu „w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1*(str. 96, 97, 98, 99, 102...) – podejrzewam, że chodzi o linie komórkowe, w których ten gen został poddany wyciszaniu. Nieliczne błędy literowe zaznaczono w manuskrypcie.

Chcę podkreślić, że powyższe uwagi mają charakter kosmetyczny i nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej rozprawy.

Podsumowując, pracę doktorską mgr Kingi Bednarek oceniam bardzo wysoko. Oprócz walorów merytorycznych należy podkreślić, że praca jest oparta o 2 publikacje w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania. Doktorantka w tych publikacjach jest pierwszym autorem. Praktycznie te 2 publikacje mogły stanowić podstawę do uzyskania stopnia doktora, ale Doktorantka zdecydowała się na rozwinięcie tematu w formie rozbudowanego manuskryptu, co ma duże znaczenie dla badaczy planujących podobny typ badań, jak i dowodzi o swobodnym poruszaniu się w tematyce. Praca spełnia kryteria

rozprawy doktorskiej, stanowi dowód na samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autorkę.

Biorąc pod uwagę dużą wartość naukową pracy, która dotyczy istotnego tematu badawczego, jej potencjalny aspekt praktyczny oraz opublikowanie w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Kingę Bednarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o wyróżnienie tej pracy.



Prof. dr hab. n. med. Jacek Gronwald