



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Święcickiego 4
60-781 Poznań

tel.: + 48 61 854 66 20
fax: + 48 61 854 66 20
e-mail: baerw@ump.edu.pl

Poznań, 16 czerwca 2014

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej
Mgr inż. **Marcina Szaumkessel**

p.t. „The analysis of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in laryngeal carcinoma”

Niedokrwistość Fanconi’ego (FA) jest stosunkowo rzadkim recesywnym defektem spowodowanym mutacjami w co najmniej jednym z 14 znanych genów kodujących białka szlaków związanych z naprawą DNA, w tym BRCA. Wiąże się to ze zwiększonym ryzykiem choroby nowotworowej. Choć najczęściej dotyczy to białaczek, to coraz więcej jest informacji na temat powiązania FA z guzami litymi, w tym płaskonabłonkowymi nowotworami głowy i szyi (HNSCC). Sprzyjają temu m.in. dłuższe okresy przeżycia pacjentów z FA. Poszukiwanie mechanizmów, które wyjaśniałyby powiązanie tych zjawisk jest ważne ponieważ inaktywacja szlaków naprawy DNA może mieć istotne znaczenie w skuteczności terapii.

Recenzowana praca dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy. Co więcej międzynarodowy zespół, w którym praca była realizowana należy do wiodących, które tym zagadnieniem się zajmują. Do niedawna badania epigenetycznej inaktywacji ścieżki FA/BRCA w guzach litych koncentrowały się na hipermetylacji promotora genów *BRCA1* i *BRCA2*.

Biorąc pod uwagę możliwość wspólnego molekularnego podłoża nowotworów głowy i szyi będących skutkiem FA i sporadycznych Doktorant postawił sobie za cel pracy identyfikację genów ścieżki FA/BRCA, których ekspresja może być zmieniona w raku krtani.

W tej obszernej pracy imponuje ilość przeprowadzonych doświadczeń, zarówno *in vitro* w 20 liniach komórkowych wyprowadzonych z raków krtani (LSCC) jak i w materiale klinicznym oraz różne podejścia eksperymentalne zmierzające do wszechstronnego poznania mechanizmów wywołujących zaburzenia badanego szlaku nie tylko na poziomie DNA, ale także funkcjonalnym.

Praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. Ze względu na fakt, że jest napisana w języku angielskim na jej początku oprócz streszczenia w języku angielskim zamieszczono bardziej obszerne w języku polskim. W tym ostatnim wkraść się drobny błąd powtórzony także w innej części pracy. Zamiast o całkowitej metylacji genomu, należałoby raczej mówić o zawartości 5-metylocytozyny w genomie.

Opis eksperymentów i uzyskanych wyników poprzedza wstęp oparty na 175 pozycjach literaturowych prawidłowo cytowanych i dobrze dobranych. Objętość tej części pozostaje we właściwej proporcji do

całości pracy. Omówiono w niej charakterystykę płaskonabłonkowych raków głowy i szyi ogólnie i szczegółowo w odniesieniu do nowotworów krtani, główne czynniki ryzyka oraz aktualny stan wiedzy na temat genetycznych i epigenetycznych mechanizmów indukcji tych nowotworów podkreślając jednocześnie brak wiarygodnych markerów diagnostycznych i prognostycznych, co odczytałam z satysfakcją, bo zapotrzebowanie na tego typu markery jeszcze kilka lat temu było kontestowane przez Promotora pracy. W kolejnych podrozdziałach tej części autor pracy opisuje objawy, diagnostykę i terapię niedokrwiistości FA i jej molekularne podłoże. Wprowadzenie kończy omówienie możliwych powiązań zakłócenia systemu naprawy DNA ścieżki FA/BRCA z nowotworami głowy i szyi..

Ta część pracy jak i jej całość jest starannie napisana i dobrze uzasadnia zarówno hipotezę badawczą jak i cel pracy.

Czytający odnosi jednak wrażenie, że niektóre zagadnienia omawiane w tej części zostały potraktowane trochę hasłowo. Dotyczy to np. opisu sekwencji LINE-1, w którym nie odniesiono się do charakterystycznego dla nowotworów zjawiska hypometylacji całego genomu związanego z obniżoną zawartością 5-metylocytozyny i w tym kontekście możliwości wykorzystania sekwencji LINE-1 jako pośredniego źródła informacji o całkowitej zawartości w 5-metylocytozyny genomie. Osobiście odczuwam niedosyt w opisie zjawisk epigenetycznych. Choć celem pracy była m.in. ocena metylacji promotorów wybranych genów oraz sekwencji LINE-1 i miRNA, to w tzw kodzie epigenetycznym równie ważna są modyfikacje histonów/chromatyny i należało o nich chociażby wspomnieć.

Zaprezentowana część teoretyczna udowadnia jednak, że doktorant posiada obszerną teoretyczną wiedzę z zakresu biologii komórki nowotworowej ze szczególnym uwzględnieniem epigenetycznej regulacji aktywności genów oraz roli białek uczestniczących w transformacji nowotworowej. Fakt dobrej znajomości tych zagadnień dodatkowo potwierdzają publikacje z tego zakresu, w tym rozdział w monografii: *Head and neck cancer*.

W oparciu o przedstawione we wstępie do pracy przesłanki prawidłowo sformułowano założenia i cel pracy. Pewne zastrzeżenie może budzić stwierdzenie w punkcie a) celów szczegółowych: promotor DNA methylation, z którego należałoby usunąć słowo promotor lub doprecyzować methylation of the selected genes promoters and global LINE-1 methylation

Część eksperymentalna pracy została dobrze zaplanowana i wykonana umożliwiając weryfikację postawionej hipotezy badawczej i realizację celu pracy. Na uznanie zasługuje bardzo nowoczesny warsztat badawczy uwzględniający m.in pirosekwencjonowanie do oceny metylacji wysp CpG i NGS do sekwencjonowania.

Opis zastosowanych procedur, odczynników, a nawet drobnego sprzętu jest bardzo szczegółowy. Listy tych ostatnich można by zdecydowanie skrócić. Należałoby natomiast biorąc pod uwagę oceniane parametry bardziej szczegółów opisać hodowle komórkowe w tym skład medium, w którym zawartość kwasu foliowego może mieć istotny wpływ na stan metylacji przynajmniej niektórych genów (Lubecka-Pietruszewska et al., 2013). Wprawdzie stosowano standardową pożywkę, ale zawartość KF mogła się różnić w poszczególnych seriach.

Opis wyników, zgodnie z przyjętym celem, charakterystyki wybranych genów na różnych poziomach molekularnych, zapoczątkowuje przedstawienie danych dotyczących metylacji DNA. W zdaniu

wprowadzającym autor stwierdza, że metylacja DNA jest najważniejszym mechanizmem regulacji transkrypcji, co nie jest stwierdzeniem prawdziwym, bo biorąc pod uwagę choćby tylko mechanizmy epigenetyczne ważniejsza są raczej kowalencyjne modyfikacje histonów.

Analiza profilu metylacji techniką pirosekwencjonowania produktów chemicznej konwersji DNA z użyciem wodorosiarczanu (IV) sodu, pozwoliła jednak na dokonanie ciekawych obserwacji, które mogą mieć wpływ jak to również Doktorant udowodnił na ekspresję analizowanych genów. Zmieniony profil metylacji stwierdzono w odniesieniu do czterech (*FANCA*, *FANCB*, *BRCA1* i *BRCA2*) spośród 16 analizowanych genów ścieżki FA/BRCA w komórkach LSCC w porównaniu z komórkami kontrolnymi nabłonka jamy ustnej. Wiązał się on najczęściej z obniżoną metylacją promotorów tych genów.

Szczegółowa analiza metylacji promotora *FANCA* wykazała, że hipometylacja tego genu zarówno w liniach komórkowych wyprowadzonych z raka krtani jak i materiale klinicznym jest zjawiskiem częstym w porównaniu z komórkami nabłonka jamy ustnej, jednak nie w porównaniu z marginesem operacyjnym. Co więcej hipometylacja charakteryzowała pacjentów o dłuższym okresie przeżycia.

Pewną korelację stwierdzono też pomiędzy hipometylacją promotora *FANCA* i LINE-1 traktowaną jako surogat całkowitej zawartości 5-mcytozyny w genomie

Wstępna analiza techniką mikromacierzy ekspresji 14 genów ścieżki FA/BRCA wskazała również na znaczące różnice w ekspresji 6 genów FA, których promotory charakteryzowała zmieniona metylacja. W odniesieniu do *FANCA* potwierdziła to dalsza analiza techniką R-T PCR, wykazując ponadto komórkowo specyficzne różnice w ekspresji tego genu. W liniach komórkowych niski poziom ekspresji mierzony mRNA wiązał się zgodnie z oczekiwaniami z wysokim poziomem metylacji.

Brak wyraźnej korelacji pomiędzy poziomem metylacji promotora genu *FANCA* i jego ekspresją na poziomie mRNA w materiale klinicznym może być spowodowany pochodzeniem z różnych próbek DNA i RNA. Ten fakt zasadniczo uniemożliwia lub co najmniej ogranicza interpretację uzyskanych danych. W celu dalszego wyjaśnienia nadekspresji *FANCA* w próbkach klinicznych przeprowadzono sekwencjonowanie techniką NGS, która jednak nie wykryła mutacji w sekwencjach kodujących tego genu.

Zgodnie z oczekiwaniami analiza Western blot z detekcją chemiluminescencyjną nie wykryła sygnału w tkance prawidłowej (human tissue lysate; Abcam UK) i było to skorelowane z poziomem transkryptu i metylacji promotora *FANCA*. Jednak takiej korelacji nie stwierdzono w liniach LSCC.

Ostatni etap pracy to badanie funkcjonowania systemu naprawy DNA w komórkach LSCC poprzez ocenę ubikwitynacji białka FANCD2 i uszkodzeń DNA metodą kometkową (single gel electrophoresis). Do tego ostatniego wybrano linie komórkowe charakteryzujące się zróżnicowanym poziomem białka FANCA. Do wywoływania uszkodzeń zastosowano cisplatynę w dawce 20 i 80 μ M. Nie podano jednak kryteriów doboru tych dawek. Szkoda, że nie poprzedzono tych badań oceną przeżywalności komórek poddanych działaniu różnych stężeń tego leku. Umożliwiło by to m.in. interpretację wyników w linii UT-SCC-108 (niski poziom/brak białka FANCA) gdzie stwierdzono wyższy poziom uszkodzeń przy zastosowaniu niższej dawki cisplatyny.

Uzyskane wyniki autor omawia w rozdziale *Dyskusja* odnosząc się do poszczególnych etapów badań. Omówienie każdego z etapów podobnie jak w omówieniu wyników podsumowuje krótkim

komentarzem, co dyskusję w dużej mierze porządkuje. Niektóre fragmenty wprowadzenia do dyskusji (str 94), można by pominąć bo są powtórzeniem informacji przedstawionych wcześniej w części teoretycznej

Dla recenzenta szczególnie satysfakcjonujący jest fragment dyskusji (str 95) omawiający brak zróżnicowania w poziomie metylacji promotora genu *FANCA* w tkance guza i tzw marginesie operacyjnym ponieważ potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące metylacji innych genów w LSCC.

Zależność ekspresji genu *FANCA* od metylacji jego promotora w tkance guza (str 97) jest, jak to już wspomniano wyżej, w zasadzie nie możliwa do zinterpretowania ponieważ DNA i RNA pochodziło z odrębnych próbek.

Ciekawym stwierdzeniem (str 97) jest sugestia, że zwiększona ekspresja *FANCA* może być wynikiem zwiększonej aktywności ścieżki ATR/CHEK1. Szkoda, że nie przeanalizowano bliżej tej możliwości – badając zależność pomiędzy aktywacją ATR/CHEK1 i metylacją *FANCA*.

Jak wspomniano wyżej interpretację znaczenia zróżnicowanej ekspresji *FANCA* w odpowiedzi na cisplatynę (str 101) ułatwiłaby ocena cytotoksyczności

Na str 102 dyskusja na temat możliwego powiązania zwiększonej ekspresji *FANCA* z okresem przeżycia pacjentów i podatnością na terapię jako że dotyczy dwóch różnych zjawisk jest pewną nadinterpretacją zwłaszcza, że autor sam stwierdza, że chemioterapia, w tym cisplatyna, jest rzadko w Polsce stosowana.

W zakończeniu *Dyskusji* zabrakło zdania podsumowującego jakie jest znaczenie biologiczne zamienionej ekspresji *FANCA* w kancerogenezie HN.

Pracę podsumowuje sześć uzasadnionych wniosków. Wniosek 4, był bardziej wiarygodny gdyby potwierdzono go stosując siRNA, ale to może być przedmiotem dalszych badań

W odniesieniu do Wniosków 5 recenzent odczuwa ponownie osobista satysfakcję, ponieważ tego rodzaju obserwacje budziły wcześniej wątpliwości Promotora pracy.

Bibliografia obejmuje łącznie 218 pozycje. Wszystkie odnośniki są poprawnie cytowane.

Praca jest bardzo starannie zredagowana. Tylko w nielicznych miejscach odnotowano drobne niedociągnięcia. I tak w wykazie skrótów można by pominąć powszechnie używane i obowiązujące np. ATP, dNTP. Natomiast skrót CYP odnosi się tylko do cytochromu P450, co należałoby wyjaśnić.

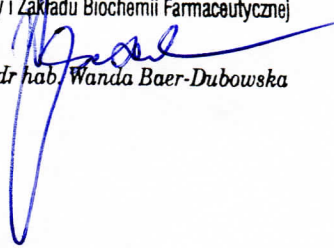
Na str 22 linia 4 od dołu jest demethylation of tumor suppressor genes, a powinno być proto-oncogenes, natomiast na str 97, linia 10 od dołu) zamiast cel impurity, sample impurity. Objasnienia do tabel wbrew zwyczajowo przyjętym zasadom umieszczono pod tabelami. W przypadku tabel umieszczonych na dwóch stronach (np. Tab 4 i 14) utrudnia to trochę czytanie. Ponadto w wielu miejscach pracy, co jest zresztą bardzo powszechne autor posługuje się pojęciem ekspresja mRNA, bądź ekspresja białka, choć to pojęcie odnosi się tylko do genu.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Doktorant zrealizował zakres badań, będących celem dysertacji. Wszystkie eksperymenty zostały rzetelnie przeprowadzone, a przedstawione wyniki są bardzo wartościowe. Ich uzyskanie wymagało nie tylko dużej wiedzy, znakomitego przygotowania laboratoryjnego, ale i ogromu pracy, co dodatkowo podnosi jej wartość. Podkreślić należy konsekwentne dążenie do kompleksowego rozwiązania problemu badawczego.

Praca zawiera elementy nowości i stanowi o indywidualnym wkładzie doktoranta do piśmiennictwa dotyczącego molekularnego podłoża patogenyzy nowotworów krtani. Dotyczy to szczególnie roli genu *FANCA* i jego produktu.

Tym samym praca spełnia więc wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, co pozwala mi wnieść do Wysockiej Rady Instytutu Genetyki Człowieka PAN o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magistra Marcina Szaumkessel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę jakość pracy i fakt, że część wyników w niej przedstawionych została już opublikowana, wnioskuję o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej

Prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska