



Warszawa, 16.06.2014

Prof. dr hab. Barbara Tudek  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,  
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Marcina Szaumkessel

**The analysis of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in laryngeal carcinoma**

Coraz więcej danych wskazuje, że deregulacja białek naprawy DNA może być ważnym czynnikiem etiologii nowotworów człowieka, a także narzędziem do poprawy terapii oraz prognozowania postępu choroby. Rozprawa doktorska mgr Marcina Szaumkessel wpisuje się w ten nurt badań. Przedmiotem rozprawy było zbadanie deregulacji ścieżki Fanconiego w etiologii nowotworów krtani. Uzasadnieniem podjęcia takich badań były obserwacje, że chorzy z niedokrwistością Fanconiego (FA) często zapadają na nowotwory głowy i szyi, a także fakt, że geny ścieżki Fanconiego są zmutowane w wielu sporadycznych nowotworach człowieka. Temat został podjęty przez Doktoranta bardzo szeroko zarówno pod względem stawianych pytań jak i metod, które zostały zastosowane w pracy, a także materiału, na którym zostały wykonane badania, t.j. na 22 liniach komórek wyizolowanych z raka krtani, materiału pooperacyjnego (guzy i obrzeże) uzyskanego od 101 pacjentów z rakiem krtani oraz DNA wyizolowanego z policzków i leukocytów osób zdrowych jako kontroli. W liniach komórek raka krtani mgr Szaumkessel zaobserwował hipometylację promotorów czterech, spośród 14 badanych genów FA, *FANCA*, *FANCB*, *BRCA1* i *BRCA2*. Jednak w materiale pooperacyjnym zaobserwował hipometylację jedynie *FANCA*, a także hipermetylację *BRCA2*. Dalsze badania zostały skoncentrowane na analizie genu *FANCA*. Najbardziej spektakularny wynik uzyskany przez Doktoranta to obserwacja, że hipometylacja genu *FANCA* koreluje z dłuższym 5-letnim przeżyciem chorych na raka krtani. Wydawało się więc, że wyższa ekspresja genu *FANCA* prawdopodobnie zwiększająca tempo naprawy DNA, a więc poprawiająca funkcjonowanie nowotworu jest paradoksalnie czynnikiem ograniczającym jego wzrost i/lub inwazyjność. Należy jednak zauważyć, że w histologicznie niezmiennym obrzeżu mgr Szaumkessel również obserwował hipometylację genu *FANCA*, co mogło być cechą charakterystyczną pacjentów z rakiem krtani. Szkoda, że nie oznaczono także metylacji promotora *FANCA* w DNA z policzków lub leukocytów tych samych pacjentów. Myślę, że ostatnio opublikowana praca grupy Roselli, *Journal of Experimental Medicine*, 5 Maj 2014, która pokazuje rolę *FANCA* w zwiększaniu różnorodności przeciwciał w procesie somatycznych hipermutacji mogłaby częściowo tłumaczyć te kontrowersyjne wyniki.

Dalsze badania miały na celu wyjaśnienie aktywności produktu genu *FANCA* w komórkach raka krtani i obejmowały badanie amplifikacji lub utraty genów *FANCA*, polimorfizmu pojedynczych



nukleotydów *FANCA*, ekspresji mRNA i białka, a także aktywacji systemu Fanconiego w komórkach raka krtani. Ogólny uzyskany obraz sugeruje, że hipometylacji promotora genu *FANCA* towarzyszy wzrost ekspresji mRNA zarówno w badanych liniach komórkowych jak i w pierwotnych guzach krtani. Wzrost ekspresji może też być spowodowany amplifikacją genu w niektórych liniach. Chociaż poziom białka w liniach raka krtani jest mierzalny metodą Western, zaś nie można go zidentyfikować w materiale uzyskanym z niezmięnionej tkanki krtani, to nie koreluje on z poziomem mRNA. Doktorant tłumaczy to indukcją różnych rodzajów miRNA w rakach krtani, które mogą hamować translację białka. Białko to powinno być aktywne, gdyż mgr Szaumkessel nie znalazł inaktywujących mutacji punktowych. W wybranych liniach komórkowych z wysokim poziomem białka *FANCA* naprawa przerw DNA po traktowaniu cis platyną była bardzo wydajna. Linie, które miały niski lub umiarkowany poziom *FANCA* albo nie usuwały przerw DNA, albo ich poziom wzrastał po 2 godz. naprawy, co mogło sugerować, że naprawa jest wprost proporcjonalna do ilości białka *FANCA*. Doktorant obserwował jednak rozdzźwięk pomiędzy szybkością naprawy DNA w relacji do poziomu *FANCA*, a zdolnością komórek do aktywacji ścieżki Fanconiego mierzoną ubikwitynacją białka *FANCD2*. W dyskusji rozdzwięk ten tłumaczy możliwością naprawy przerw DNA przez inny system naprawczy, łączenie niehomologicznych końców DNA. Mam jednak wątpliwości odnośnie sposobu badania ubikwitynacji białka *FANCD2*, str. 86. Białka zostały słabo rozdzielone. Moim zdaniem co najmniej w jeszcze jednej linii (UT-SCC-29) widać ubikwitynację białka *FANCD2*. Poza tym, w komórkach niepoddanych stresowi replikacyjnemu, jak na Ryc. 23, ubikwitynacji *FANCD2* na ogół nie widać. Dopiero po ekspozycji na czynniki blokujące replikację następuje wyraźna ubikwitynacja *FANCD2*. Wprowadź badania takie wykonano, ale tylko dla trzech linii komórkowych, tak że ogólny wniosek o braku aktywnego systemu FANC w komórkach LSCC nie musi być prawomocny. Chciałabym także zapytać czy Doktorant badał żywotność komórek po traktowaniu cis platyną. Czy spadek ilości białka *FANCD2* przy wyższej ilości CDDP, a szczególnie po okresie dodatkowej inkubacji w celu naprawienia uszkodzeń DNA nie jest związany ze śmiercią komórki.

Niezależnie od tych wątpliwości sądzę, że główny cel pracy mgr Marcina Szaumkessel został osiągnięty. Doktorant w elegancki sposób pokazał deregulację ekspresji genu *FANCA* w raku krtani, łącznie z mechanizmem związanym z aktywacją transkrypcji zależną lub niezależną od liczby kopii genu oraz aktywnością miRNA. Cennym wynikiem jest odkrycie nowych miRNA dla *FANCA* i propozycja, że regulują one nie poziom transkryptu lecz poziom translacji. Najciekawsza, moim zdaniem, jest korelacja hipometylacji promotora genu z długością 5-letniego przeżycia pacjentów z rakiem krtani. Ten wątek może stwarzać podstawy do prognozowania przebiegu choroby, co jest poważnym problemem współczesnej onkologii. Na uwagę zasługuje także szeroki wachlarz metod, które zostały użyte w pracy i wymagały od Doktoranta szerokich umiejętności, od metod biologii molekularnej do wysokoprzepustowych metod analizy ekspresji genów i polimorfizmów pojedynczych nukleotydów do badań bioinformatycznych i wyrafinowanej analizy statystycznej. Wszystkie one zostały opanowane przez mgr Szaumkessel bardzo dobrze.

Praca napisana jest w języku angielskim, liczy 147 stron i zawiera poza rozdziałami typowymi dla tego rodzaju opracowań, t.j. wstępu, materiałów i metod, wyników i dyskusji, a także streszczeń w języku angielskim i polskim dodatkowe tabele i ryciny przedstawiające jednostkowe wyniki, zebrane w tabelach



części zasadniczej rozprawy, a także dodatkowe ryciny, które uzupełniają dane i umożliwiają pełniejszą dyskusję wyników. Wstęp (17 stron) zawiera szczegółową charakterystykę nowotworów głowy i szyi ze szczególnym naciskiem na nowotwory krtani, ich etiologię, a także znane markery molekularne. Poza tym opisuje szlak niedokrwistości Fanconiego. Wstęp nie jest bardzo rozbudowany, ale w pełni wprowadza do dalszych części rozprawy. Materiały i metody są opisane na tyle szczegółowo, że możliwe jest ich odtworzenie. Wyniki zostały zebrane na 32 stronach oraz dodatkowo w formie nieopracowanej w materiałach uzupełniających, co daje wyczerpujący obraz. Mam jednak kilka uwag odnośnie prezentacji wyników. Wydaje mi się, że kwantyfikacja ilości białka w panelu D Ryc. 24 nie odzwierciedla obrazu elektroforetycznego pokazanego w panelu B (str. 88). Na rycinach 24-27, panele C, krzywe chyba nie powinny być prowadzone od zera. Skąd bierze się ogon komety w komórkach nietraktowanych CDDP?

Dyskusja jest wnikliwa, dobrze napisana, stawia ciekawe hipotezy i tłumaczy możliwe konsekwencje deregulacji genu *FANCA* w raku krtani. Ogólnie rozprawa prezentuje się bardzo dobrze, szczególnie starannie są przygotowane ryciny, a poszczególne wątki są rozwijane logicznie, czyta się ją bardzo dobrze.

Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na drobne uchybienia w edycji pracy. Pomimo starannie przygotowanych i jasnych ilustracji zawiera szereg błędów literowych, niewykreślonych lub niepotrzebnie wykreślonych sformułowań, a to utrudnia czytanie. Poza tym często mylone są nazwy genów, np. w kilku miejscach (Tabela na str. 28, a także w dyskusji) podano, że *FANCD1* to *BRCA1*, a tymczasem jest to *BRCA2*. W innych częściach pracy informacje te są prawidłowe. W kilku miejscach pomyłono numerację rycin, np., na str. 76-77 po Ryc. 16 następuje 19, są dwie ryciny 10, itd. Opisy niektórych rycin są nieprzejrzyste, np. opis Ryc. 4, str. 45 nie pokazują w którym miejscu znajduje się marker RNA. Dobrze także byłoby trzymać się jednej nomenklatury. Niestety w nazewnictwie genów *FANC* panuje chaos i posiadają one kilka nazw. Doktorant naprzemiennie używa nazw starszych i nowozalecanych, lepiej byłoby ujednolicić nazewnictwo. Poza tym w całej rozprawie Doktorant używa terminu czynniki alkilujące dla związków sieciujących. Niektóre czynniki alkilujące mogą sieciować DNA, ale stosowana w pracy cis platyna nie alkiluje DNA. Ponadto podpisy tabel powinny być zamieszczone raczej nad tabelą niż pod nią. Przy kilkustronicowych tabelach, jak w niniejszej rozprawie, podpisy pod tabelą bardzo utrudniają czytanie.

Powyższe uwagi krytyczne nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Marcina Szaumkessel. Zawartość merytoryczna rozprawy, sposób przeprowadzenia badań, ich analiza i dyskusja wyników świadczą o dojrzałości naukowej Kandydata i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Cel pracy został w pełni zrealizowany, a wyniki zamieszczone w rozprawie zostały opisane w trzech publikacjach w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku oddziaływania. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie mgr Marcina Szaumkessel do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także o wyróżnienie stosowną nagrodą ze względu na wysoki poziom naukowy prezentowanych badań.

Prof. dr hab. Barbara Tudek