

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Ewy Byzia

pt.

Analiza uszkodzeń genów DIAPH2, DIAPH3 i PCDH17 w płaskonabłonkowym raku
krtani w kontekście ich roli w procesie przerzutowania do węzłów chłonnych

1. Tematyka rozprawy doktorskiej

Praca dotyczy problematyki nowotworzenia oraz genetycznym i epigenetycznym mechanizmom tego procesu a także perspektywom ewentualnej terapii. Najogólniej mówiąc, nowotwór powstaje na skutek niekontrolowanego przez organizm wzrostu komórek w obrębie danego narządu. Najczęstszym rodzajem nowotworu złośliwego krtani jest rak płaskonabłonkowy, stanowiący ponad 90% wszystkich nowotworów złośliwych tego narządu. Do głównych czynników ryzyka zachorowania na raka krtani należy palenie tytoniu, zwłaszcza połączone z nadużywaniem alkoholu. Ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka płaskonabłonkowego jest zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), który ogrywa również istotną rolę w rozwoju raka odbytu i szyjki macicy. W Polsce każdego roku odnotowuje się około 2500 nowych zachorowań, a około 1600 osób każdego roku umiera z powodu raka krtani. Liczba chorych na raka krtani stanowi około 2% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce. W Europie płaskonabłonkowy rak krtani jest najczęściej diagnozowanym spośród wszystkich nabłonkowych nowotworów głowy i szyi. Dla diagnozy i oceny nowotworu krtani konieczne są badania obrazowe. Najczęściej wykonuje się tomografię komputerową szyi, ultrasonografię szyjnych węzłów chłonnych, lub prześwietlenie klatki piersiowej. W leczeniu raka krtani wykorzystuje się chirurgię, radioterapię i chemioterapię. Wczesna identyfikacja jest ograniczona, ze względu na niewielkie zmiany i niespecyficzne objawy, ale niezwykle istotna, gdyż decyduje o rokowaniach i sposobie leczenia. W związku z tym ważne i uzasadnione jest poszukiwanie znaczników molekularnych swoistych dla tego nowotworu w celu szybkiej i efektywnej diagnozy oraz prognozy choroby.

2. Charakterystyka i cele pracy doktorskiej

Formalnie rozprawa składa się z 10 rozdziałów oraz spisu rycin (48), tabel (25) oraz suplementu (2 rycin i 5 tabel). Praca jest opatrzona 350 odnośnikami literaturowymi.

Praca zawiera 28 – stronicowy wstęp omawiający epidemiologię i etiologię oraz podstawy molekularne płaskonabłonkowych nowotworów krtani.

Autorka rozprawy jako główny cel swoich badań wskazała określenie znaczenia dwóch genów z rodziny formin DIAPH2 i DIAPH3 oraz genu protocadheryny 17 w patogenezie i przerzutowaniu płaskonabłonkowego raka krtani do węzłów chłonnych. Dla osiągnięcia tego celu konieczna była identyfikacja i analiza mechanizmów genetycznych i epigenetycznych kontroli ekspresji genu oraz częstości deaktywacji badanych genów w liniach komórkowych oraz guzach nowotworowych LSCC. Badania epigenetyczne tego procesu polegały na obserwacji zmian profilu metylacji regionów promotorowych, ekspresji mikroRNA a także wykorzystaniu znanego leku epigenetycznego, deoksyrybozydu 5-azacytozyny do potwierdzenia roli hipermetylacji DNA w deaktywacji LSCC a w szczególności ekspresji genu PCDH17.

Dobór metod badawczych i statystycznych był adekwatny do postawionych celów.

Wyniki badań i ich omówienie obejmują 6 podrozdziałów zawierających przejrzyste tabele i ryciny.

Kolejność prezentacji wyników jest jasna i logiczna i stanowi zrozumiałą odpowiedź na problemy postawione w pracy.

3. Główne wyniki badań przedstawionych w rozprawie

3.1. Stwierdzono obniżenie ekspresji genu DIAPH2 w guzach nowotworowych (2x) oraz w liniach komórkowych (4x). Dla genu PCDH17 obniżenie ekspresji w liniach

nowotworowych było statystycznie istotne a dla DIAPH3 nie zaobserwowano zmian.

3.2. Obniżeniu ekspresji genu DIAPH2 nie towarzyszył wzrost poziomu metylacji regionu promotorowego DNA linii komórkowych LSCC.

3.3. Zaobserwowano hipermetylację regionu promotorowego i wyciszenie genu PCDH17 w liniach komórkowych LSCC oraz w guzach.

3.4. Zidentyfikowano delecję eksonu 23 w obrębie domeny FH2 białka DIAPH2 w 5 liniach komórkowych LSCC wyprowadzonych z przerzutów do węzłów chłonnych. Delecji eksonu 23 (125 nt) towarzyszyła insercja fragmentu intronu (35 nt).

3.5. W genie DIAPH3 znaleziono 2 niesynomiczne polimorfizmy SNP, z których jeden ma prawdopodobnie wpływ na strukturę i funkcję białka.

- 3.6. Sekwencjonowanie protokadheryny 17 (PCDH17) w liniach komórkowych LSCC wskazało 1 wariant sekwencji z mutacją G→T a w DNA wyodrębnionym z guzów 1 wariant z mutacją C→T.
- 3.7. Sekwencjonowanie 95 guzów nowotworowych pokazało 4 warianty sekwencji o charakterze hemizygotycznym. Trzy z nich występują w domenach funkcjonalnych białka DIAPH2. Analiza *in silico* wykazuje, że mutacje mogą mieć negatywny wpływ na strukturę i funkcję białka.
- 3.8. Inhibicja metylacji DNA w genie protokadheryny 17 w obecności deoxynukleozydu 5-azacytozyny (decytabiny) powoduje wzrost transkrypcji.
- 3.9. Stwierdzono podwyższoną ekspresję mikroRNA oraz zaproponowano ich wpływ na ekspresję genów DIAPH2 i PCDH17. Obserwowano zwiększoną ekspresję (2x) hsa-miR-9-5p w liniach i guzach LSCC w przypadku genu DIAPH2, a także hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-2-3p i hsa-miR-30A-3P w przypadku genu PCDH17. Wskazuje to na epigenetyczną regulację ekspresji PCDH17 na poziomie metylacji DNA oraz mikroRNA.
- 3.10. Analiza immunohistochemiczna guzów wykazała, że protokadheryna 17 występuje głównie w cytoplazmie a także w jądrze komórkowym.
- 3.11. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie zostały opublikowane w czasopismach: *Molecular Carcinogenesis* 57(7), 878-885 (2018) oraz *Carcinogenesis* 40, 1251-1259 (2019), w których p. Ewa Byzia jest pierwszym autorem.

4. Uwagi do rozprawy

- 4.1. W badaniach wykorzystano 18 linii komórkowych wyprowadzonych z LSCC, DNA ze 108 guzów nowotworowych oraz 125 skrawków z guzów zatopionych w bloczkach parafinowych. Czy warunki FFPE zapewniają trwałość materiału genetycznego?
- 4.2. Obniżonej ekspresji genu DIAPH2 nie towarzyszyły zmiany w poziomie metylacji regionu promotorowego w liniach komórkowych. Ta obserwacja stała się podstawą do zaniechania przez doktorantkę analizy poziomu metylacji DNA w materiale z guzów oraz wskazania na możliwość „innego” mechanizmu inaktywacji genu DIAPH2 w LSCC. Jaki mechanizm rozważano?
- 4.3. Stwierdzenie, że zmiana w sekwencji w linii UT-SCC-17 w obrębie domeny FH2 prowadzi prawdopodobnie do inaktywacji białka DIAPH2 oraz wskazuje na jego potencjalną rolę w tworzeniu przerzutów LSCC, wymaga dowodów eksperymentalnych.
- 4.4. Sugestia, że mutacja somatyczna K135R negatywnie wpływa na strukturę i funkcję białka DIAPH2 wymaga dodatkowego uzasadnienia.

- 4.5. Stwierdzenie, że zwiększona ekspresja mikroRNA związanych z genem protokadhedryny 17 daje możliwość ich wykorzystania jako biomarkerów oraz stworzenie terapii celowanej, należy rozwinąć i uzasadnić.
- 4.6. Sugestia wykorzystania mikroRNA jako markerów oraz opracowanie terapii celowanej są trafne pod warunkiem, że określony miRNA jest rzeczywiście udowodnionym dobrym znacznikiem danej choroby, w tym przypadku raka krtani oraz, że jest bardziej swoistym niż inne mikroRNA.
- 4.7. Stwierdzenie, że znaczenie wolnych rodników w powstawaniu zmian w materiale genetycznym polega na wywoływaniu uszkodzeń oksydacyjnych DNA oraz peroksydacji lipidów jest dużym uproszczeniem bardzo szerokiego zagadnienia (s. 14).
- 4.8. Stwierdzenie, że wpływ metylacji DNA na kancerogenezę może być wynikiem aktywacji sekwencji transpozonowych i retro sekwencji, które w warunkach normalnych są zmetylowane, wydaje się niezręczne.
- 4.9. Brak hipermetylacji genu DIAPH2 w liniach komórkowych stał się pochoinnie przesłanką dla zaniechania analizy metylacji DNA w guzach oraz propozycji nowego mechanizmu inaktywacji genu.
- 4.10. Wielokrotnie w pracy można znaleźć określenie „szkodliwy dla struktury i funkcji białka”, które jest niejasne.
- 4.11. W badanych liniach komórkowych oraz w guzach nowotworowych stwierdzono hipermetylację regionu promotorowego genu PCDH17, chociaż niższy poziom metylacji w guzach może być wynikiem obecności komórek zdrowych (s. 118). Mimo, że jest to prawdopodobne, to nie można wykluczyć globalnej demetylacji, którą obserwuje się powszechnie w guzach.
- 4.12. Stwierdzenie, że obniżenie metylacji w innych regionach genomu mogło mieć pośredni wpływ na aktywację transkrypcyjną PCDH17, jako, że decytabina jest czynnikiem o działaniu niespecyficznym, nie jest jasne. Charakteryzuje się on wysoką toksycznością
- 4.13. Przywoływane w pracy przesłanki literaturowe muszą być pokazane (s. 119, 120).
- 4.14. Nadekspresja mikroRNA 15b, 16-2 oraz 30a jest prawdopodobnie dodatkowym mechanizmem wyciszającym gen PCDH17. Jeśli tak jest, to należałoby pokazać te oddziaływania.
- 4.15. Informacje o strukturze i funkcjach produktów ekspresji genów DIAPH2, DIAPH3 oraz PCDH17 są ograniczone, chociaż ich sekwencje zawierają przesłanki funkcjonalne.

5. Wniosek końcowy

5.1. Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej mgr Ewy Byzia są bogatym i solidnym materiałem eksperymentalnym dotyczącym badań nowych białek i ich genów. Rozprawa stanowi także istotny wkład do poznania mechanizmów kancerogenezy a w szczególności pokazuje znaczenie epigenetyki w zrozumieniu nowotworów. Ponadto materiał zawarty w rozprawie stał się podstawą dwóch publikacji w recenzowanych czasopismach.

5.2. Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 21 kwietnia 2017 r. o zmianie ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz niektórych innych ustaw (Dz.U. 2017 poz. 859, USTAWA z dnia 21 kwietnia 2017 r. o zmianie ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz niektórych innych ustaw) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie p. mgr Ewy Byzia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

