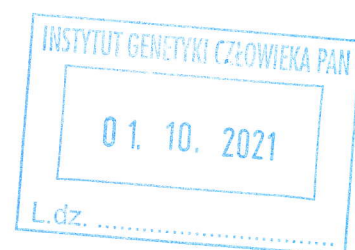


Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych pod tytułem:

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

autorstwa

mgr Ewy Byzia



Płaskonabłonkowy rak krtani (LSCC) stanowi duży problem kliniczny ze względu na stosunkowo wysoką częstość występowania oraz brak skutecznego leczenia. W dobie rosnącego znaczenia terapii personalizowanej nowotworów, w tym LSCC, istotne jest poznawanie molekularnych aspektów powstawania i ewolucji choroby oraz genetycznych uwarunkowań zwiększających ryzyko zachorowania. W tym kontekście podjęcie przez Kandydatkę tematu związanego z rolą uszkodzeń genów *DIAPH2*, *DIAPH3* i *PCDH17* w LSCC należy uznać za celowe i ważne.

Trzeba podkreślić, że wybór konkretnych trzech genów (*DIAPH2*, *DIAPH3* i *PCDH17*) był dobrze uzasadniony ponieważ wynikał z wcześniej opublikowanych danych uzyskanych przez promotora Kandydatki wraz z zespołem z użyciem całogenomowych analiz technikami mikromacierzowymi.

Szczegółowe cele pracy obejmowały identyfikację wariantów w obrębie badanych genów w DNA z linii LSCC oraz z guzów, analizy metylacji regionów okołopromotorowych, analizy ekspresji mikroRNA mogących regulować ww. geny, a także, w przypadku *PCDH17*, analizy ekspresji na poziomie białka w tkance guzów. Istotnym elementem Pracy było potwierdzenie znaczenia stwierdzonej hipermetylacji regionu okołopromotorowego genu *PCDH17* w badaniach funkcjonalnych opartych na hamowaniu metylacji DNA w liniach komórkowych przy użyciu decytabiny.

Materiałem do badań było 18 nowotworowych linii komórkowych, DNA ze 108 guzów LSCC oraz 125 skrawków guzów zatopionych w bloczkach parafinowych. W zależności od potrzeby wykorzystywano też odpowiednie kontrole m.in. 145 prób DNA wyizolowanego z krwi obwodowej od anonimowych zdrowych mężczyzn, DNA z wymazów z jamy ustnej 10 zdrowych dawców oraz całkowity RNA z wycinka prawidłowego nabłonka krtani. Wykorzystanie wszystkich materiałów zostało zatwierdzone przez odpowiednie komisje bioetyczne.

W Pracy Kandydatka wykorzystwała szeroki wachlarz nowoczesnych metod. Poza standardowymi technikami jak izolacja DNA/RNA, synteza cDNA, sekwencjonowanie metodą Sangera, ilościowy PCR (także w czasie rzeczywistym) wykorzystywała sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), pirosekwencjonowanie (w celu oceny metylacji) oraz mikromacierze tkankowe (analiza immunohistochemiczna). Dodatkowo,

istotna część Pracy wymagała technik hodowli komórek *in vitro*. Opanowanie tylu różnorodnych technik laboratoryjnych jest niewątpliwie silną stroną Pracy i dowodzi znakomitego przygotowania warsztatowego Kandydatki. Zwraca też uwagę techniczna staranność analiz – np. w trakcie sekwencjonowania NGS amplikony z pokryciem poniżej 20-krotnym analizowano dodatkowo metodę Sangera.

Najciekawszy, wg. mnie, wynik Pracy dotyczy hipermetylacji regionu promotora *PCDH17*. Wyrażna hipermetylacja w stosunku do prób kontrolnych została stwierdzona we wszystkich badanych liniach komórkowych oraz w 95% guzów nowotworowych. Znaczenie hipermetylacji *PCDH17* dla inaktywacji genu w badanych liniach komórkowych potwierdzono poprzez wykazanie przywrócenia ekspresji *PCDH17* w wyniku inhibicji metylacji DNA z zastosowaniem decytabiny. Powyższe obserwacje wskazujące na znaczenie obniżenia ekspresji *PCDH17* w LSCC są też interesujące w kontekście stwierdzonej w Pracy wysokiej ujemnej korelacji między nadekspresją pewnych mikroRNA a ekspresją mRNA *PCDH17* oraz stosunkowo częstej uracie ekspresji białka *PCDH17* w badaniu metodą immunohistochemiczną (IHC). Pomimo podkreślanego przez Autorkę (Dyskusja) ograniczenia wynikającego z faktu, że materiał biologiczny wykorzystany w eksperymentach IHC nie pozwolił na analizę metylacji DNA na tych samych próbach uważam, że powyżej opisane wyniki są przekonujące, oryginalne i potencjalnie ważne z punktu widzenia kliniki oraz nauk podstawowych.

Kolejnym interesujący wynik dotyczy mutacji genu *DIAPH2*. W szczególności, Autorka wykazała delecję eksonu 23 genu *DIAPH2* z jednoczesną insercją fragmentu intronu 23 (c.3116_3240delins35) w jednej z badanych linii komórkowych. Autorka szeroko dyskutuje możliwy patogenny charakter zmiany. Przytaczane argumenty są przekonujące a ostateczne potwierdzenie znajduje się w niezależnej od niniejszej rozprawy publikacji pokazującej, że ww. delecja zwiększa potencjał metastatyczny w modelu komórek HEK-293T modyfikowanych met. CRISPR/Cas9 (Carcinogenesis 2019 40:1251. doi: 10.1093/carcin/bgz035). Dodatkowo, Autorka wykryła 4 kolejne mutacje *DIAPH2* w materiale z guzów, 3 z tych mutacji pochodziły z guzów przerzutujących. Analiza statystyczna uzyskanych danych połączonych z dodatkowymi danymi z cBioPortal wykazała, że mutacje genu *DIAPH2* występują częściej w grupie pacjentów z guzami przerzutującymi do węzłów chłonnych (N+) w stosunku do grupy z guzami nieprzerzutującymi, co stanowi kolejną ważną i nową obserwację Autorki.

Analizy sekwencji genu *DIAPH2* wykazały też częstsze występowanie genotypu rs20374 A wśród pacjentów w porównaniu do populacji europejskiej, co mogło sugerować powiązanie tego wariantu z podniesionym ryzykiem LSCC. Należy jednak podkreślić, że przed wyciągnięciem takiego wniosku Autorka zdecydowała się przebadać genotypy rs20374 w populacji Polski. Wyniki wskazały, że w Polsce warianty rs20374 mają inny rozkład niż w populacji ogólnoeuropejskiej. W szczególności wariant A jest częstszy, co prawdopodobnie tłumaczy obserwacje u pacjentów. Chciałbym podkreślić, że decyzja o poszerzeniu analiz na populację polską wiązała się znacznym nakładem pracy i jej podjęcie dowodzi dojrzałości naukowej Autorki.

Rozprawa liczy 167 stron. Ma typowy układ z podziałem na wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski, dyskusję i listę piśmiennictwa. Dodatkowo Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, listę skrótów, spis rycin i tabel oraz suplement. Poszczególne części Pracy spełniają swoją rolę, całość wyводу jest jasna, bez zbędnych powtórzeń. Lista cytowanego piśmiennictwa liczy 351 pozycji, które są dobrze dobrane i właściwie przywoływane.

Poniżej lista uwag oraz zauważonych drobnych błędów stylistycznych/gramatycznych etc..

1 Uwagi

Str. 47 (Metody) „W celu określenia ekspresji genów *DIAPH2*, *DIAPH3* oraz *PCDH17* w 10 liniach komórkowych, 5 guzach krtani oraz 3 próbach kontrolnych wykorzystano dane z mikromacierzy ekspresyjnych (Affymetrix U133 Plus 2.0) uzyskane podczas realizacji wcześniejszego projektu [79].” (High resolution ArrayCGH and expression profiling identifies *PTPRD* and *PCDH17/PCDH68* as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 50: 154-166).

Czy nie ma w tej sytuacji konfliktu ze stwierdzeniem na str. 38 wskazującym, że wcześniejsze wyniki były punktem wyjścia do prac opisanych w Rozprawie? Zob.: „analiza przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej Affymetrix U133 Plus 2.0 wskazała na istotne obniżenie ekspresji genu *PCDH17* we wszystkich liniach komórkowych”. Jest to także podkreślone na str. 38 w sekcji „Uzasadnienie podjęcia badań” : „ analiza przy zastosowaniu

mikromacierzy ekspresyjnej Affymetrix U133 Plus 2.0 wskazała na istotne obniżenie ekspresji genu *PCDH17* we wszystkich liniach komórkowych oraz genu *DIAPH2* w liniach LSCC oraz w materiale z guzów w porównaniu z próbami kontrolnymi [79].”

Str. 89 (Tabela S5). Przedstawiona analiza rozkładu genotypów polimorfizmu rs20374 genu *DIAPH2* nie uwzględnia faktu, że gen jest na chr X. Analiza częstości wariantów w takich przypadkach powinna uwzględniać płeć osób z porównywanych grup, przynajmniej powinno to być omówione.

Str. 92 „(rs111260336 i rs150023947) określane są jako zmiany kancerogenne (FATHMM) (Rycina 24, Tabela S5).” Programy typu FATHM zazwyczaj określają prawdopodobieństwo, że zmiana zaburza funkcję białka. Ciekawe byłoby omówienie, co może być podstawą sugestii, że w ww. przypadkach patogenność przekłada się akurat na kancerogenność.

Str. 113 Rycina 47 – nie jest jasne co odzwierciedla test Fishera. W szczególności, czy na wartość *p* (graniczną pod względem znamienności), poza brakiem w kontroli próbek bez ekspresji *PCDH17*, ma także wpływ brak w grupie kontrolnej próbek o wysokiej ekspresji tego genu?

Drobne błędy

Str. 4 Streszczenie „Wskazano również na większą częstość genotypu A|A rs111260336 w populacji polskiej w stosunku do europejskiej populacji kaukaskiej.” - lektura pracy wskazuje, że to stwierdzenie powinno się odnosić raczej do rs20374.

Str. 4 Streszczenie WGA – brak rozwinięcia

Str. 14 „Wskazuje się na występowanie delecji w chromosomie 13q oraz przyrost materiału genetycznego w obrębie 8p i 20q” – zdanie niejasne.

Str. 15 „Efektem tego są często wtórne ogniska choroby oraz krótki 5-letni czas przeżycia..” niefortunne sformułowanie

Str. 15 „Aktywowane przez niego szlaki sygnałowe [...] uczestniczą w procesach istotnych dla progresji nowotworu: proliferacja komórek, stymulacja angiogenezy i migracji komórek, hamowanie apoptozy” – błąd gramatyczny

Str.17 „SNP - ang. *single nucleotide polymorphism*)” – obecnie dominuje termin SNV – *single nucleotide variant*.

Str. 41 „Na użycie prób DNA do badań została wydana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.” Brak numeru zgody, niespójność z wcześniej przytaczanymi zgodami - zgoda Komisji Bioetycznej (numer: 904/06, 164/10 i 828/12) przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu., zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (numer: KB 417/2010).

Str. 41 „całkowite RNA” - całkowity RNA, podobnie str 60 „Wyizolowane DNA” - Wyizolowany DNA

Str. 75 Rycina 14. Pokazane wyniki wskazują na obniżoną metylację *DIAPH2* w stosunku do prób kontrolnych. Jest to oczywiście zgodne ze stwierdzeniem Autorki „nie zaobserwowano wzrostu poziomu metylacji DNA regionu okolopromotorowego w liniach komórkowych w porównaniu z materiałem kontrolnym (W1-W10),” ale moim zdaniem obserwacja powinna być, przynajmniej krótko, wspomniana/skomentowana, także jeśli różnice (trendy?) były jednak nieznamiennie statystycznie.

Str. 83 „Nie stwierdzono natomiast obecności polimorfizmów w obrębie genu *DIAPH2* w liniach komórkowych LSCC.” – nie jest jasne znaczenie terminu polimorfizm (używanego także w innych miejscach Pracy). Wariant niepatogeny? Wariant znany? Wariant częsty? Jak częsty? W jakiej populacji?

Str. 88 Ryc 21. Opis tego typu danych, poza wartością p, powinien zawierać parametr szacujący siłę powiązania, np. iloraz szans (OR, odds ratio).

Str. 96 „W przypadku linii UT-SCC-11 poziom metylacji DNA komórek inkubowanych w 0,1 μ M DAC uległ obniżeniu o 31,2% w stosunku do komórek kontrolnych, a w komórkach traktowanych 0,3 μ M DAC odpowiednio o 31,1%. W linii komórkowej UT-SCC-29 wykazano z kolei obniżenie metylacji DNA o 31,4% po inkubacji w 0,1 μ M DAC oraz 9,1% w 0,3 μ M DAC w stosunku do prób kontrolnych.” – nie jest jasne czy ww. opis odnosi się do metylacji LINE-1 czy PCDH17.

Str. 99 Rycina 30. Nie jest jasne co oznacza ścieżka na żelu opisana OK (w panelu B ścieżka zawiera produkt na poziomie PCDH19).

Str. 104 „Analiza korelacji ekspresji powyższych miRNA oraz badanych genów przy zastosowaniu współczynnika korelacji rang Spearmana wykazała wysoką lub bardzo wysoką

korelację ujemną między ekspresją trzech mikroRNA, odpowiedzialnych za regulację potranskrypcyjną PCDH17, a ekspresją tego genu. Zależność tę stwierdzono zarówno w liniach komórkowych LSCC (n=7), jak i grupie linii komórkowych i guzów (n=12). Wyniki zestawiono w Tabeli 23 oraz na rycinach (Ryciny 36-44).” W tekście oraz tabeli i rycinach brakuje wartości p, bezpośrednio dokumentującej znamienność statystyczną obserwacji.

Str. 117 „częste mutacje i delecje opisane w niniejszej pracy w obrębie genu *DIAPH2* zdają się świadczyć o znaczeniu obserwowanych uszkodzeń tego genu w patogenezie LSCC.”

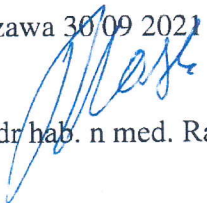
Określenie „częste” powinno być doprecyzowane.

Str. 139 niepełne cytowanie (własnej) pracy: “*DIAPH2* alterations increase cellular motility and may contribute to the metastatic potential of laryngeal squamous cell carcinoma”

Podsumowując, pomimo wyżej opisanych (drobnych) uwag uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska autorstwa

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’ spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 30/09/2021


Prof. dr hab. n med. Rafał Płoski