

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr. Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej pt. „Mutacje somatyczne i zmiany liczby kopii w raku podstawnokomórkowym skóry - ze szczególnym uwzględnieniem mutacji w niekodujących częściach genów i miRNomie " w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze , dyscyplina nauki biologiczne.

### **Ocena formalna.**

Rozprawa doktorska Pani mgr. Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej pt. „Mutacje somatyczne i zmiany liczby kopii w raku podstawnokomórkowym skóry - ze szczególnym uwzględnieniem mutacji w niekodujących częściach genów i miRNomie " została wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Piotr Kozłowski, promotorem pomocniczym dr Paulina Gałka-Marciniak.

Rozprawa liczy 178 stron, gdzie w poszczególnych rozdziałach zamieszczono kolejno: streszczenie, wykaz publikacji których wyniki stanowią znaczną część rozprawy doktorskiej, wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, główne wyniki i wnioski, materiał i metody, bibliografia. Dodatkowo doktorantka umieściła notę informacyjną, z której dowiadujemy o źródłach finansowania badań. Mam drobne zastrzeżenie co do umieszczenia rozdziału materiał i metody na końcu pracy, nie ma to jednak wpływu na ocenę merytoryczną recenzowanej dysertacji.

Artykuł, którego wyniki stanowią znaczną część rozprawy doktorskiej (Profile of basal cell carcinoma mutations and copy number alterations - focus on gene-associated noncoding variants. *Front Oncol.* 2021 Nov 25;11:752579), został opublikowany w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania ( impact factor=5.36). Doktorantka jest pierwszym, a promotor ostatnim autorem. Taki układ współautorstwa wskazuje na istotne role tych dwóch osób w prezentowanej pracy. Mam drobne zastrzeżenie co do braku załączenia zgody oświadczenia pozostałych współautorów pracy oraz zgody na użycie tych publikacji do rozprawy.

### **Ocena merytoryczna**

Rak podstawnokomórkowy skóry (ang. basal cell carcinoma; BCC) jest najbardziej powszechnym nowotworem człowieka. Głównymi czynnikami ryzyka są: ekspozycja na promieniowanie UV, wiek, jasny fenotyp. Podobnie jak w pozostałych nowotworach, patomechanizm karcynogenezy BCC jest nie do końca poznany. Zdecydowana większość badaczy podłoża molekularnego nowotworów skupia się na częściach kodujących genów. Celem niniejszej pracy była wstępna charakterystyka mutacji somatycznych w niekodujących elementach genów kodujących białka (5'UTR, fragmenty 3'UTR , fragmenty intronów) oraz w genach miRNA. W pracy poddano analizie genotypowania 27 par próbek DNA wyizolowanych z BCC oraz z odpowiadających im tkanek normalnych. Zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji całego eksomu (ang. Whole Exome Sequencing; WES)

oraz unikalną, zaprojektowanej w Zakładzie Genetyki Molekularnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, procedurę sekwencjonowania całego miRNomu (ang. Whole miRNome Sequencing; WMS). W wyniku przeprowadzonych analiz molekularnych łącznie zostało wykrytych ponad 80 tysięcy mutacji somatycznych z czego ponad połowa występowała w regionach niekodujących, w których częstość mutacji była zbliżona do tej w regionach kodujących. Najczęstszą sygnaturą mutacyjną, występującą we wszystkich próbkach, była sygnatura 7, co potwierdza, że głównym czynnikiem mutagennym w BCC jest promieniowanie słoneczne. Autorka wskazuje na zmiany w genach BAD, DHODH oraz CHCHD2 jako potencjalnie napędzające karcynogenezę BCC. Wśród mutacji niekodujących 171 zostało wykrytych w genach miRNA, w tym w różnych funkcjonalnych elementach tych genów, kluczowych dla biogenezy i funkcjonowania cząsteczek miRNA. Najczęściej mutowanym genem miRNA był MIR3928 o dobrze udokumentowanej funkcji w nowotworzeniu. Wygenerowane dane pozwoliły również na przeprowadzenie pierwszej kompleksowej analizy zmian liczby kopii w BCC, w wyniku której, między innymi, zostały zidentyfikowane częste delecje długiego ramienia chromosomu 9 (chr9q), obejmującego kluczowy dla BCC gen supresorowy PTCH1 oraz częste duplikacje krótkiego ramienia chromosomu 9 (chr9p) zawierającego gen JAK2 oraz geny ligandów PD-L1 oraz PD-L2 będących kluczowymi elementami punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej. Wśród genów najczęściej mutowanych w sekwencjach kodujących zidentyfikowano takie geny jak PTCH1, TP53, MYCN czy geny NOTCH.

Na podstawie uzyskanych wyników autorka przedstawiła 9 wniosków

1. Wykorzystanie standardowego systemu WES, poza identyfikacją mutacji w częściach kodujących genów, pozwala na wykrycie znacznej ilości nowotworowych mutacji somatycznych w niekodujących częściach genów. Globalna częstość mutacji w regionach niekodujących zbliżona jest do częstości mutacji w regionach kodujących.
2. BCC charakteryzuje się najwyższym obciążeniem mutacyjnym wśród nowotworów
3. Analiza typów mutacji wskazuje, że najczęstszą sygnaturą mutacyjną (najsilniej związaną z analizowanymi próbkami BCC) jest sygnatura 7.
4. Analiza mutacji w regionach niekodujących wykazała istnienie regionów o podwyższonej częstości mutacji, regionów zawierające gorące miejsca mutacji oraz regionów, w których mutacje wskazują ich duży potencjał jako elementów napędzających dla rozwoju BCC. Do najciekawszych takich regionów należą 3'UTR genu BAD, 5'UTR (sekwencja Kozak) genu DHODH oraz 5'UTR genu CHCHD2.
5. Analiza mutacji w sekwencjach kodujących potwierdziła dużą zgodność z wcześniejszymi wynikami sekwencjonowania tych regionów w BCC, zidentyfikowano między innymi częste mutacje i/lub napędzający charakter takich genów jak PTCH1, TP53, MYCN czy geny z rodziny NOTCH. Ta duża zgodność z wcześniejszymi wynikami potwierdza poprawność przeprowadzonej analizy a tym samym wiarygodność uzyskanych wyników.



6. Przeprowadzenie sekwencjonowania genów miRNA pozwoliło na wykrycie znacznej liczby mutacji somatycznych w genach miRNA w BCC. Średnia liczba mutacji w genach miRNA wynosiła 6,3 mutacje na próbkę BCC, a wykryte mutacje występowały we wszystkich subregionach genów miRNA, w tym w elementach funkcjonalnych takich jak region źródłowy, co wskazuje, że mutacje somatyczne w genach miRNA mogą zakłócać/uszkadzać funkcjonowanie tych genów. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na małą liczbę analizowanych próbek i w konsekwencji małą liczbę wykrytych mutacji nie możliwe jest na tym etapie wyciąganie wniosków o konsekwencjach czy to molekularnych czy klinicznych tych mutacji. Sugeruje to konieczność kontynuowania podobnych badań w większych grupach próbek.

7. Z wyjątkiem nieco wyższego poziomu przypisania sygnatury mutacyjnej do sygnatury 7 w próbkach typu guzkowego, przeprowadzona analiza nie wskazuje na żadne istotne molekularne różnice między podtypem guzkowym i powierzchniowym BCC.

8. Przeprowadzona kompleksowa analiza zmian liczby kopii wskazała na istnienie licznych regionów o podwyższonej częstości zmian liczby kopii, zarówno lokalnych jak i zmian obejmujących całe ramiona chromosomów. Do najważniejszych wykrytych zmian należą częste delecje długiego ramienia chromosomu 9 i częste duplikacje krótkiego ramienia chromosomu 9 zawierające odpowiednio gen PTCH1 oraz geny JAK2, PDL1 i PDL2, które mogą mieć duże znaczenie dla rozwoju BCC

9. Analizy przeprowadzone w zakresie mutacji niekodujących miały charakter wstępny (pionierski) i zostały wykonane na relatywnie niewielkiej grupie próbek, dlatego uzyskane wyniki, na tym etapie, nie pozwalają na wyciąganie głębszych konkluzji, czy to o znaczeniu molekularnym czy klinicznym wykrytych mutacji. Uzyskane wyniki wymagają weryfikacji w większych grupach próbek i w odpowiednich testach funkcjonalnych. Przeprowadzona analiza, jest jednak pierwszym krokiem w analizie sekwencji niekodujących w BCC, silnie wskazującym potencjał funkcjonalny zmienności somatycznej w tych regionach i konieczność dalszej bardziej dogłębnej analizy mutacji niekodujących w BCC i w innych nowotworach.

Temat pracy realizowanej przez doktorantkę uważam za dobrze dobrany i jednocześnie niezwykle ambitny, zważywszy na bardzo skromny arsenał środków służących do analiz patogenności zmian znajdujących się w częściach nie kodujących genomu. Warsztat badawczy obejmujący najnowsze techniki sekwencjonowania jak i analizy baz danych oraz in-silico jest imponujący. Technika WES charakteryzują się sporym ryzykiem generowania wyników zarówno fałszywie ujemnych jak i dodatnich. Dlatego uzasadnione jest potwierdzanie uzyskanych danych w wybranych próbkach za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera, co też doktorantka wykonała. Trochę niedosytu budzi mała liczba badanych raków podstawnokomórkowych. Nie znalazłem również charakterystyki badanej grupy (głównie takich danych jak wiek, liczba mężczyzn/kobiet i, typy histologiczne BCC) - zwłaszcza jeśli doktorantka formułuje wniosek dotyczący molekularnych różnic między podtypem guzkowym i powierzchniowym BCC. Z wyjątkiem tegoż wniosku uważam, że przedstawione wyniki uprawniają autorkę do postawienia pozostałych konkluzji.

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam kilka pozostałych uwag, nie wpływających na wartość rozprawy:

1) Wniosek nr 9 wydaje się być niezbyt przejrzyste sformułowany. Doktorantka twierdzi, że uzyskane wyniki nie pozwalają na wyciąganie głębszych konkluzji- czy to o znaczeniu molekularnym czy klinicznym wykrytych mutacji- następnie zaś sugeruje, że uzyskane dane silnie wskazują na potencjał funkcjonalny zmienności somatycznej w badanych regionach DNA.

2) W streszczeniu zabrakło podsumowania wyników i wniosków.


3) We wstępie doktorantka wymienia zmiany przednowotworowe, na podłożu których może rozwinąć się BCC. Należałoby dodać, że najczęściej nowotwór ten pojawia się de novo.

4) We wstępie autorka wymienia odmiany BCC. Brakuje postaci barwnikowej BCC

4) Znaleziono kilka drobnych powtórzeń językowych, na przykład : ... z czego ponad połowa występowała w regionach niekodujących, w których częstość mutacji była zbliżona do tej w regionach kodujących.”

**Podsumowując** uważam, że w przedstawionej rozprawie doktorantka prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Wartość tych badań potwierdza poziom czasopisma, gdzie wyniki tych prac opublikowano. Rozprawa doktorska jest wynikiem intensywnej pracy przez lata i to nie tylko doktoranta, ale całego zespołu profesora Kozłowskiego. Dalsze badania prowadzone w tak dobrze przygotowanym zespole z ogromnym zapleczem zapewne przyczynią się do rozwoju wiedzy w tym zakresie. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplinie nauki biologiczne. Proponuję również o wyróżnienie rozprawy nagrodą summa cum laude.

Szczecin, 18.04.2023

  
Prof. dr hab. n med. Tadeusz Dębniak