

Gliwice, 2.06.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej

Przedstawiona mi do recenzji 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” zawiera części typowe dla rozpraw doktorskich tj.: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, główne wnioski oraz bibliografię. We wstępie doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące procesu nowotworzenia, uwzględniając zaproponowane przez Hanahan’a i Weinberg’a cechy charakterystyczne komórek nowotworowych oraz skupiła się na mutacjach, ilości i typach, wykrywanych w komórkach nowotworowych. Opisała również znaczenie mutacji dla procesu nowotworzenia, rolę mutacji w regionach kodujących, niekodujących oraz regulatorowych oraz metody wykrywania mutacji. Ostatnią część wstępu stanowi opis raka podstawnokomórkowego, danych epidemiologicznych, czynników genetycznych i środowiskowych modyfikujących ryzyko zachorowania na BCC. Sporą część wstępu poświęciła na opis mutacji do tej pory zidentyfikowanych w BCC.

Doktorantka zajęła się w swojej pracy analizą mutacji somatycznych w raku podstawnokomórkowym w porównaniu do tkanki prawidłowej i wykorzystała do tego celu sekwencjonowanie nowej generacji całego eksomu oraz zastosowała technikę opracowaną w Zakładzie Genetyki Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej – sekwencjonowanie całego miRNomu. Rozwój technik sekwencjonowania nowej generacji umożliwił sekwencjonowanie całych genomów nowotworowych, a co za tym idzie identyfikację

dziesiątków tysięcy mutacji. Znaczenie większości z nich dla procesu nowotworowego, progresji nowotworu oraz rozsiewu do odległych narządów jest nieznane. Wygenerowane w trakcie sekwencjonowania dane posłużyły do przeprowadzenia kompleksowej analizy wszystkich mutacji występujących w sekwencjonowanych próbkach. Jednocześnie doktorantka porównała otrzymane wyniki z bazą danych The Cancer Genome Atlas. Szczególne znaczenie ma analiza mutacji w częściach niekodujących i regulatorowych genomu, bo o ich roli w procesie nowotworzenia wiadomo najmniej. Do tej pory w większości analiz wykorzystywano część kodującą genomu i mutacje niesynonimiczne, które modyfikowały białko kodowane przez badany gen.

Materiał badawczy stanowiło 27 par próbek (nowotwór oraz zdrowa tkanka) od pacjentów z BCC, w tym 22 z podtypem guzkowym i 5 z podtypem powierzchniowym.

Po uzyskaniu wyników sekwencjonowania doktorantka przeprowadziła charakterystykę mutacji w regionach niekodujących oraz eksonach kodujących białka z wyszczególnieniem typów mutacji, lokalizacji mutacji w poszczególnych regionach, oszacowania obciążenia nowotworu mutacjami, a także analizą sygnatur nowotworowych, identyfikacją genów, w których szczególnie często znajduje się mutacje – gorących punktów mutacji, jak również regionów niekodujących, w których mutacje są czynnikiem potencjalnie napędzającym rozwój raka podstawnokomórkowego. Doktorantka przeprowadziła również analizę zmian liczby kopii wykazując istnienie szeregu regionów o podwyższonej częstości zmian liczby kopii. Do najważniejszych należą delecje długiego ramienia chromosomu 9 i częste duplikacje krótkiego ramienia chromosomu 9. Region ten zawiera geny PDL1 oraz PDL2, których podwyższona ekspresja w komórkach nowotworowych jest wykorzystywana do immunoterapii celowanej. Terapia ta jest niezwykle skuteczna w leczeniu czerniaka. W ten

sposób doktorantka wykazała również występowanie charakterystycznych zmian strukturalnych w raku podstawnokomórkowym skóry.

Doktorantka ocenia znalezione przez siebie mutacje przypisując je do kategorii „mutacje typu driver” – na podstawie częstości występowania oraz „mutacje typu passenger”. Przedstawiła również analizę sygnatur mutacyjnych i znalazła sygnaturę charakterystyczną dla raka podstawnokomórkowego. To są nowoczesne podejścia do próby oceny znaczenia zidentyfikowanych mutacji dla rozwoju rak podstawnokomórkowego.

Ważnym wynikiem jest znalezienie specyficznej dla raka płaskonabłonkowego sygnatury mutacyjnej (zamiany pary zasad C>T) sugerującej związek tego nowotworu z ekspozycją na promieniowanie UV. Istotnym wynikiem jest również identyfikacja mutacji w genach ważnych dla procesu nowotworzenia: TP53, PTCH1, MYCN oraz genów z rodziny NOTCH, będących potwierdzeniem wcześniej przeprowadzonych analiz. BCC jest nowotworem skóry, więc ten wynik wskazuje na konieczność ochrony przed światłem słonecznym jako profilaktyki przeciwko BCC. Raka podstawnokomórkowego w znakomitej większości przypadków diagnozuje się we wczesnym etapie rozwoju i wtedy jego leczenie polega na jego całkowitym usunięciu chirurgicznym. Natomiast dla stadiów bardziej zaawansowanych oraz w stadium rozsiewu nie ma żadnych schematów chemioterapii ani skutecznej terapii. Poznanie więc biologii tego nowotworu może mieć duże znaczenie dla opracowania skutecznej terapii.

Unikalnym elementem tej rozprawy doktorskiej jest przeprowadzenie sekwencjonowania genów miRNA. Doktorantka określiła częstość występowania mutacji, jak również ich miejsce występowania w genach miRNA, co wskazuje na ich rolę w modyfikacji funkcjonowania tych genów, w których znaleziono mutacje. Doktorantka wykryła 171 mutacji zlokalizowanych w 155 genach miRNA w 22 próbkach (81,5%) BCC. Analiza często

zmutowanych genów wykazała, że jeden gen MIR3928 był często zmutowany w BCC w 4 próbkach. Gen ten pełni funkcję zarówno supresorową, jak i onkogenną.

Doktorantka bardzo krytycznie podchodzi do uzyskanych przez siebie wyników stwierdzając, że zostały uzyskane na niewielkiej liczbie próbek oraz wymagają dalszych analiz funkcjonalnych, które pozwolą określić właściwości molekularne oraz znaczenie kliniczne wykrytych mutacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Mgr Pauliny Muszyńskiej – Nawrockiej pt. „Mutacje somatyczne i zmiany liczby kopii w raku podstawnokomórkowym skóry – ze szczególnym uwzględnieniem mutacji w niekodujących częściach genów i miRNomie” 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 Pani Mgr Pauliny Muszyńskiej – Nawrockiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Wnioskuję również do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Mgr Pauliny Muszyńskiej-Nawrockiej. Część wyników tej rozprawy została opublikowana w *Frontiers of Oncology* o IF = 5,738. Ponadto doktorantka przedstawiła bardzo obszerną analizę mutacji wykrytych podczas maszynowego sekwencjonowania.


Prof. dr hab. Ewa Grzybowska