

ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00  
e-mail: igcz@man.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

**Mutacje somatyczne i zmiany liczby kopii w raku podstawnokomórkowym skóry - ze szczególnym uwzględnieniem mutacji w niekodujących częściach genów i miRNomie**

autorstwa Pauliny Marii Nawrockiej-Muszyńskiej

wykonanej w Zakładzie Genetyki Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Promotor pracy

Prof. dr hab. Piotr Kozłowski

**Znaczenie podjętych badań**

Rak podstawnokomórkowy skóry (ang. *basal cell carcinoma*, BCC) to bardzo częsty nowotwór złośliwy o wciąż niewyjaśnionej etiologii. Znaczenie mutacji w regionach niekodujących oraz zmian liczby kopii genów, analizowanych w skali całego genomu, stanowią w tym nowotworze nowy obszar badawczy. Podjęte badania mają zatem charakter nowatorski i są istotne dla zrozumienia przyczyn powstawania tego nowotworu oraz potencjalnie dla rozwoju diagnostyki i terapii celowanych.

**Struktura rozprawy i ocena formalna**

Praca ma formę monografii, zawierającej się na 178 stronach (wraz z załącznikami) i obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji, których Doktorantka jest współautorką, wstęp, cele badań, wyniki, dyskusję, podsumowanie głównych wyników i wniosków, materiały i metody, wykaz skrótów, wykaz źródeł finansowania i bibliografię. Praca zawiera 45 rycin i 13 tabel.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, jednak zwraca uwagę fakt, że w pracy nie sformułowano hipotezy. Wynika to najpewniej z tego, że badania Doktorantki, jak większość badań z wykorzystaniem technik wysokoprzepustowych, mają charakter eksploracyjny. Takie badania określane są często terminem *fishing expedition*, któremu, zupełnie niesłusznie moim zdaniem, nadaje się niekiedy niezbyt pochlebny wydźwięk. Ich krytyka opiera się właśnie o to, że nie są to badania wywiedzione z hipotezy (*hypothesis driven*). Rzeczywiście w badaniach eksploracyjnych sformułowanie hipotezy bywa niełatwe, jednak nie niemożliwe. Naturalnie, hipoteza w takim badaniu musi mieć charakter ogólny i nie jest to niczym niewłaściwym. W tej pracy, przykładowo hipoteza mogłaby brzmieć: „*Somatyczne mutacje w regionach niekodujących genów kodujących białka, mutacje w genach miRNA oraz zmiany liczby kopii genów obejmują aberracje o potencjalnym znaczeniu dla patogenezy BCC.*”

**Ocena merytoryczna rozprawy**

**Wstęp**

Doktorantka w sposób zwięzły i klarowny opisała podstawowe zjawiska i terminy, istotne dla tematyki badań. Przedstawiła cechy komórek nowotworów złośliwych, zwróciła uwagę na znaczenie somatycznych mutacji i zmian liczby kopii genów oraz czynników epigenetycznych w rozwoju większości nowotworów oraz na różnice w liczbie mutacji somatycznych w zależności od typu nowotworu. Wyjaśniła pojęcie obciążenia mutacyjnego nowotworu (ang. *tumor mutation burden*),

pojęcie sygnatur mutacyjnych oraz scharakteryzowała mechanizmy związane z powstawaniem określonych sygnatur mutacyjnych. Jest to o tyle istotne, że rak podstawnocomórkowy skóry, należy do nowotworów o najwyższym obciążeniu mutacyjnym i wykazuje silną zależność od mutagennego działania promieniowania UV. Doktorantka omówiła pojęcia mutacji napędzających nowotworzenie, mutacji towarzyszących (ang. *driver and passenger mutations*), aktywację protoonkogenów oraz utratę funkcji genów supresorowych.

Część wstępu poświęcono omówieniu metod i wyzwań związanych z identyfikacją zmian somatycznych w regionach niekodujących genomu. Identyfikacją mutacji napędzających nowotworzenie, jest zadaniem nietrywialnym w przypadku mutacji w kodującej części genomu, a tym bardziej trudnym w przypadku mutacji w regionach niekodujących. Problem stanowi przede wszystkim trudność z określeniem konsekwencji mutacji w regionach niekodujących oraz brak odpowiednich narzędzi bioinformatycznych i statystycznych dedykowanych analizie funkcjonalności mutacji w regionach niekodujących. Doktorantka zarysowała aktualny stan wiedzy na temat występowania mutacji w rejonach niekodujących w różnych typach nowotworów, zaznaczając, że są to nieliczne prace. Warto podkreślić, że wśród nich są artykuły dotyczące mutacji w genie MIR142, opublikowane przez grupę Prof. Piotra Kozłowskiego, promotora pracy, a Doktorantka jest trzecią autorką jednej z tych prac.

We wstępie Doktorantka precyzuje, że jej badania dotyczą niekodujących regionów genów, które kodują białka (promotory genów, regiony 5'UTR, introny, regiony 3'UTR) oraz genów kodujących miRNA, charakteryzuje te regiony i omawia potencjalne efekty mutacji w tych regionach. Omawia metody wykrywania mutacji somatycznych i zwraca uwagę na dwa międzynarodowe projekty istotne dla poznania genetyki nowotworów: The Cancer Genome Atlas (TCGA) oraz International Cancer Genome Consortium (ICGC).

Oddzielną część wstępu poświęcono charakterystyce raka podstawnocomórkowego skóry. Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat jego epidemiologii, etiologii i klasyfikacji oraz na temat genów kodujących białka i ścieżek sygnałowych najczęściej ulegających deregulacji w tym nowotworze oraz na temat roli zaburzeń ekspresji miRNA.

Podsumowując, Doktorantka umiejętnie dobrała zakres prezentowane. Wstęp, zawierający się na 23 stronach, ma logiczną konstrukcję, jest dobrze skomponowany i wyważony pod względem szczegółowości omawianych treści.

### **Cele**

Cele pracy zostały jasno sformułowane, z podziałem na:

- cel główny – charakterystyka mutacji somatycznych w wybranych niekodujących częściach genomu oraz
- cel dodatkowy – charakterystyka mutacji w regionach kodujących białka, jako rodzaj walidacji,

Sformułowano także 6 celów szczegółowych, obejmujących: 1/ sekwencjonowanie typu WES (ang. *whole exome sequencing*); 2/ sekwencjonowanie całego miRNomu (ang. *Whole miRNome Sequencing*; WMS); 3/ charakterystykę mutacji w wybranych regionach niekodujących; 4/ identyfikację genów powtarzalnie ulegających mutacjom oraz potencjalnych mutacji napędzających; 5/ całogenomową analizę zmian liczby kopii genów; 6/ wstępną analizę funkcjonalną wybranych mutacji somatycznych.

Cele są ambitne i mają prowadzić do pierwszej tak szeroko zakrojonej analizy zmian somatycznych w wybranych regionach niekodujących w tym nowotworze.

### **Wyniki**

Wyniki opisano na 60 stronach, z podziałem na trzy główne rozdziały, zawierających łącznie kilkanaście podrozdziałów.

Do najważniejszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę należą w mojej ocenie:

- 1/ identyfikacja i szczegółowa charakterystyka mutacji w genach kodujących białka (w regionach kodujących i wybranych regionach niekodujących), uwzględniająca liczbę i udział procentowy mutacji, średnią wartość częstości allelu alternatywnego, liczbę i udział procentowy mutacji typu SBS i DBS oraz liczbę zidentyfikowanych gorących punktów mutacji;
- 2/ wykazanie, że wartość TMB w BCC znacznie przewyższa wartość tego parametru we wszystkich porównywanych typach nowotworów;
- 3/ zidentyfikowanie nieraportowanych dotąd w żadnym nowotworze gorących punktów mutacji w regionach kodujących genów *TNFAIP2* i *EZH2* oraz w 3'UTR genu *BAD* i w 5'UTR genu *DHODH*;
- 4/ wskazanie genów najczęściej ulegających mutacjom w BCC, w tym genów nigdy wcześniej nie raportowanych jako geny często mutowane w tym nowotworze;
- 6/ wskazanie genów potencjalnie napędzających rozwój BCC;
- 7/ identyfikacja regionów istotnie wzbogaconych w zmiany liczby kopii genów, w tym o potencjale napędzającym;
- 8/ identyfikacja i szczegółowa charakterystyka mutacji w genach miRNA, z uwzględnieniem lokalizacji mutacji w poszczególnych subregionach prekursorów miRNA oraz identyfikacja genu miRNA często mutowanego w BCC (MIR3928) i wykonanie modelowania 3D dla oceny efektów mutacji na strukturę prekursora miRNA;
- 11/ wykazanie zmiany w puli genów potencjalnie regulowanych przez miRNA w przypadku mutacji dotyczących rejonu źródłowego (*seed*);
- 10/ wykazanie, że mutacje w regionach kodujących i w badanych regionach niekodujących wykazują charakterystykę typową dla nowotworów związanych z ekspozycją na promieniowanie słoneczne.

Co ważne, niemal wszystkie mutacje zidentyfikowane metodą NGS wybrane do walidacji metodą sekwencjonowania Sangera zostały potwierdzone, a zmiany liczby kopii genów zwalidowano z użyciem samodzielnie opracowanego testu wykorzystującego metodę MLPA.

Szczególnie dla mnie ciekawym elementem pracy jest część poświęcona identyfikacji genów, których mutacje i zmiany liczby kopii mają potencjalny charakter napędzający rozwój BCC. Cenne jest zestawianie uzyskanych wyników z danymi dotyczącymi innych nowotworów, dostępnymi w bazie TCGA, co jest istotne dla oceny potencjału napędzającego mutacji oraz nadaje szerszy kontekst badaniom Doktorantki.

## **Dyskusja**

Dyskusja zawiera się na 10 stronach i stanowi zwarte omówienie najważniejszych rezultatów pracy. Najwięcej uwagi Doktorantka poświęca genom, które zidentyfikowała jako najczęściej mutowane w BCC, zawierające gorące punkty mutacji oraz w przypadku których wykazała potencjał napędzający. Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat genów *BAD* i *CHCHD2* (zaangażowanych w regulację apoptozy) oraz genu *DHODH*, dla którego w analizie porównawczej z danymi z TCGA Doktorantka wykazała, że mutacje w 5'UTR tego genu są specyficzne wyłącznie dla BCC i nie były jak dotąd raportowane w żadnym innym nowotworze. Spośród zmian liczby kopii, Doktorantka najwięcej uwagi poświęca delecjom i amplifikacjom ramion chromosomu 9, zwracając uwagę na potencjalne znaczenie tych drugich dla wrażliwości na leki celowane (w tym przeciwciała anty PD-1, np. niwolumab). Podkreśla, że identyfikacja zmian liczby kopii genów może być potencjalnie pomocna w kwalifikacji pacjentów do leczenia celowanego molekularnie. Doktorantka omawia również najważniejsze wyniki analizy mutacji w genach miRNA, zachowując przy tym odpowiednią ostrożność w ich interpretacji. Zwraca uwagę na trudność jednoznacznego wnioskowania wobec stosunkowo niewielkiej liczby mutacji wykrytych w genach miRNA i relatywnie niedużej liczby badanych próbek. Czynniki te utrudniają określenie, czy mutacje te mogą mieć charakter napędzający.

Na uwagę zasługuje część dyskusji dotycząca mutacji w sekwencji kodującej genów *FLG* i *FLG2*, kodujących profilagrynę, istotną dla właściwego funkcjonowania warstwy rogowej naskórka. Mutacje

w tych genach były dotąd sporadycznie obserwowane w BCC i uważane za mutacje pasażerskie. Mutacje germinalne są natomiast częste w populacji kaukaskiej i wykazano ich związek z chorobami skóry, alergiami pokarmowymi i astmą. Jednak wysoka częstość mutacji niesynonimicznych w tych genach stwierdzona przez Doktorantkę u pacjentów z BCC może wskazywać na niedostrzegany dotąd funkcjonalny charakter tych zmian i ich znaczenie dla rozwoju tego nowotworu.

W podsumowaniu dyskusji, Doktorantka wykazuje się dobrze pojętym krytycyzmem wobec swojej pracy i wskazuje ograniczenia przeprowadzonych badań. Wśród nich wymienia relatywnie niewielką liczbę badanych próbek, w większości opisowy charakter przeprowadzonych badań i konieczność dalszych analiz funkcjonalnych dla potwierdzenia znaczenia wykrytych mutacji dla rozwoju BCC. Tego typu ograniczenia są jednak w pełni zrozumiałe, biorąc pod uwagę nowatorski i jak to określono – wstępny charakter przeprowadzonych analiz. W mojej ocenie, praca dostarczyła znacznej ilości nowych danych i oryginalnych obserwacji na temat najczęściej mutowanych genów i zmian liczby kopii genów, a uzyskane wyniki stanowią cenne dla środowiska naukowego zasoby i dobry punkt wyjścia do dalszych pogłębionych analiz.

**Główne wyniki i wnioski** podsumowano w dziewięciu punktach. W mojej ocenie wszystkie założone w pracy cele zostały osiągnięte.

**Materiały i metody** są przedstawione wyczerpująco, klarownie i nie budzą moich wątpliwości.

#### **Uwagi dodatkowe**

1. W przypadku wszystkich genów opisywanych w pracy brakuje rozwinięcia symboli do pełnych nazw genów. Symbole te nie zostały również rozwinięte na liście skrótów.
2. Opisując geny, w których wykryto gorące punkty mutacji, Doktorantka skupiła się na opisie tylko tych genów, których funkcja w BCC lub innych nowotworach została dotąd najlepiej poznana. Przy tej liczbie genów (43), być może warto byłoby przyrzeć się również genom mniej poznanym.
3. W tekście pojawia się kilka nieprecyzyjnych sformułowań, np.:

str 13

„Kolejną grupę genów uczestniczących w onkogenezie stanowią geny supresorowe, kodujące białka hamujące proces kancerogenezy, m.in. przez inhibicję proliferacji komórek czy blokadę przejścia uszkodzonej komórki na ścieżkę apoptozy...”. Zdanie to może sugerować, że geny supresorowe kodują białka powodujące blokadę apoptozy, podczas gdy intencją Doktorantki było zapewne wyrażenie, że mutacje w genach supresorowych hamują onkogenezę poprzez m.in. pozytywną regulację apoptozy, a mutacje prowadzące do utraty funkcji genów supresorowych powodują m.in. blokadę apoptozy.

Str 63

„PTPRD katalizuje defosforylację wybranych białek prowadząc do zwiększenia aktywności onkogenów, m.in. STAT3.” Tymczasem STAT3 ulega aktywacji wskutek fosforylacji przez kinazy, a PTPRD jest fosfatazą i prowadzi do jego defosforylacji. Do aktywacji onkogenów, w tym STAT3, prowadzą mutacje inaktywujące PTPRD.

4. Na schemacie biogenezy miRNA (Rycina 2) przydałoby się zaznaczenie faktu transkrypcji pri-miRNA z sekwencji genomowej przy udziale polimerazy RNA II, gdyż stanowi to niewątpliwie etap biogenezy miRNA.
5. Tabela 5 (str 62) jest niejasna. Kolumny 3 i 4 tabeli posiadają ten sam nagłówek; w kolumnie 5, zgodnie z nagłówkiem, powinna być podana liczba i udział procentowy, podczas gdy w tabeli w tej kolumnie znajduje się tylko jedna wartość.

Uwagi te jednak nie zmieniają jednak mojego ogólnego dobrego wrażenia o tej pracy doktorskiej.

### **Podsumowanie**

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej jest wartościowym opracowaniem naukowym ważnego i w znacznej mierze niezbadanego problemu badawczego, dotyczącego poznania aberracji genetycznych w regionach niekodujących i ich potencjalnego związku z rozwojem raka podstawnokomórkowego skóry. Przygotowana rozprawa doktorska świadczy o tym, że Doktorantka wykazuje się ogólną wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań, opanowała szereg technik badawczych i metod analitycznych, potrafi prowadzić badania naukowe oraz sprawnie prezentować i dyskutować ich wyniki.

Stwierdzam, że przedstawiona mi 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 Pauliny Nawrockiej-Muszyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



dr hab. n med. Małgorzata Dawidowska