



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Kierownik

Prof. dr hab. HANNA ROKITA

Kraków, 27 lutego 2019 r.

Recenzja

**pracy doktorskiej p. mgr Katarzyny Kujawy
pt „Zbadanie przydatności genów i białek POSTN, FN1, MFAP5 i CLASP1
jako potencjalnych markerów prognostycznych w raku jajnika”**

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy poszukiwania potencjalnych markerów prognostycznych w raku jajnika. Rak ten klasyfikowany jest wśród nowotworów jako siódmy na świecie pod względem zachorowalności i ósmy pod względem zgonów u kobiet. Na liście najbardziej powszechnych nowotworów zajmuje 18-te miejsce. Pięcioletni wskaźnik przeżycia dla chorych w dwóch najwyższych stopniach zaawansowania wynosi zaledwie 15%. Jego leczenie napotyka na wiele przeszkód wynikających nie tylko z późnej diagnozy, ale także braku wysoce czułych i swoistych markerów molekularnych. Z tego względu podjęte badania wpisują się w nurt nowoczesnego podejścia do leczenia tego raka.

Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią kontynuację wcześniejszych badań prowadzonych przez zespół promotorki rozprawy, p. prof. Katarzyny Lisowskiej, w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii w Gliwicach. Do analizy wybrano klinicznie homogeną grupę pacjentek mających podobne rokowania. W badaniach tych przy pomocy mikromacierzy DNA wykazano w dość licznej grupie ponad stu próbek raka jajnika, że nisko-zróżnicowane raki jajnika można podzielić na dwie grupy guzów o odmiennym profilu ekspresji. W przypadku raka jajnika duże różnice we wzorze ekspresji genów nie są zaskakujące, jeżeli wziąć pod uwagę heterogenne pochodzenie histologiczne tego guza. Dalsza analiza czasów przeżycia pacjentek pokazała, że znacząco krótszy czas przeżycia mają osoby z wyższą ekspresją wyodrębnionej jako sygnatura grupy genów, podczas gdy pacjentki z niższą ekspresją tych samych genów charakteryzowały się dłuższym czasem przeżycia. Z tego względu założono, że w zidentyfikowanej grupie genów mogą znajdować się geny o charakterze markerów prognostycznych.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6337
email:hanna.rokita@uj.edu.pl

Następnie wybrano cztery spośród tych genów do dalszej analizy wychodząc z założenia, że istnieje duże prawdopodobieństwo natrafienia na potencjalny marker prognostyczny.

Doktorantka podjęła się zweryfikowania wyników mikromacierzy DNA za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR w próbkach materiału od wyjściowej grupy pacjentek (58 próbek) oraz niezależnej grupy pacjentek (33 próbki, w sumie 91 próbek). Następnie zanalizowano poziom ekspresji wybranych genów metodą immunohistochemiczną, aby ocenić tą ekspresję na poziomie specyficznego białka w niezależnej grupie preparatów parafinowych raka jajnika. Te ostatnie wyniki poddano analizie statystycznej, aby ustalić związek poziomu oznaczanych białek z takimi cechami klinicznymi i molekularnymi jak: wiek zachorowania, wrażliwość na chemioterapię, stan kliniczny po chemioterapii, występowanie choroby resztkowej, lokalizacja guza, naciek zapalny, angioinwazja, czy aktywność mitotyczna i poziom białka P53.

Ocena formalna pracy

Zamieszczone w rozprawie wyniki zostały już opublikowane w postaci dwóch prac o sumarycznym współczynniku oddziaływania prawie 8, przy czym w obu publikacjach (z 2014 r. – IF = 4,416 i 2016 r. – IF = 3,282) promotorka rozprawy jest pierwszym autorem. Z kolei promotor pomocniczy rozprawy, p. dr Ewa Zembala-Nożyńska, nie tylko udostępniła tkanki kontrolne do reakcji IHC, ale także miała swój znaczący udział w wykonaniu tej części pracy, która polegała na ocenie preparatów guzów pod kątem cech klinicznych, patologicznych i molekularnych. Takie rozwiązanie było bardzo ważne ze względu na znane powszechnie trudności w określeniu cech klinicznych i biologicznych tych guzów.

W rozprawie zamieszczono wszystkie standardowe główne części pracy, tj. wstęp (22 strony), materiały i metody, wyniki oraz dyskusję a także streszczenie w języku polskim i angielskim, założenia i cele pracy, wykaz stosowanych skrótów i spis piśmiennictwa obejmujący 139 pozycji. Spis piśmiennictwa jest aktualny i prawidłowo dobrany. Warto podkreślić, że praca jest bardzo dobrze ilustrowana 43 rycinami i 32 tabelami. Część tych ilustracji została zebrana jako suplement na końcu pracy a niektóre ryciny, to zdjęcia mikroskopowe.

Praca jest napisana ładnym precyzyjnym językiem i bardzo dobrze zredagowana. Znalezione jedyne drobne uchybienia, jak to ze str. 58 w Ryc. 24, w której podano ekspresję genu FAP, podczas gdy w legendzie zaznaczono gen fibronektyny, *FN1*. Z kolei na Ryc. 20 (str. 50) przy dolnym zdjęciu nie podano, że jest to kontrola negatywna z komórek gruczołu piersiowego.

Ocena merytoryczna

We **wstępie** Doktorantka przedstawia epidemiologię i typy histologiczne raka jajnika, etiologię zachorowania na tego raka i jego pochodzenie histologiczne. Opisano także markery molekularne stosowane w diagnostyce i leczeniu raka jajnika oraz metody poszukiwania nowych markerów molekularnych. Następnie szczegółowo przedstawiono cztery wybrane, tytułowe geny: CLASP1, FN1, MFAP5 i POSTN. Na uwagę zasługuje bardzo dobry opis roli mikrośrodowiska w progresji raka jajnika i podkreślenie roli podścieliska guza jako dodatkowego źródła nowych markerów i celów terapeutycznych.

Rozdział „**Materiały i Metody**” jest napisany bardzo szczegółowo i dobrze odzwierciedla ogrom włożonej pracy doświadczalnej, choć poza opisami grup pacjentek i materiału do analizy ekspresji genów na poziomie RNA i materiału do analizy immunohistochemicznej metodyka pracy obejmowała w zasadzie dwie techniki: ilościowej RT-qPCR i immunohistochemii. Jak ważne, ale jednocześnie trudne dla biologa są zaawansowane analizy statystyczne świadczy zaangażowanie do części analiz specjalistów-informatyków. Procedura wyboru zestawu trzech genów kontrolnych do normalizacji wyników ilościowego PCR została opisana w taki sposób, że powinna służyć za wzór do naśladowania w innych tego typu opracowaniach.

Wyniki badań stanowią bardzo obszerny rozdział pracy. Dość duża grupa genów zidentyfikowana w doświadczeniu mikromacierzowym (96 genów), których ekspresja korelowała z czasem przeżycia chorych z rakiem surowiczym jajnika stanowiła podstawę wyboru piętnastu z tych genów do weryfikacji za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Poza kryterium jak największej zmiany poziomu ekspresji (dla 12 genów) wybrano dodatkowo 3 geny o udowodnionym związku z nowotworzeniem i jeden gen (*CLASP1*) wyłoniony wcześniej w analizie metodą regresji Coxa jako znamienne związane z czasem przeżycia pacjentek. Walidacja poziomu ekspresji tych 16-tu genów została przeprowadzona nie tylko na materiale od grupy pacjentek analizowanej w doświadczeniu mikromacierzowym, ale także na materiale od niezależnej grupy. Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) i czasu wolnego od choroby (DFS) w obu grupach pacjentek pozwoliła wyłonić osiem genów, których poziom ekspresji wykazał statystycznie znamiennej korelację z OS lub DSF w co najmniej w jednej grupie pacjentek.

Przeprowadzona następnie na preparatach parafinowych guza od 108 pacjentek analiza znaczenia prognostycznego cech klinicznych, patologicznych i molekularnych guza wykazała znaczenie prognostyczne takich cech jak obecność choroby resztkowej, angioinwazja – obecność zatorów komórek

nowotworowych w naczyniach, martwica oraz aktywność mitotyczna komórek guza.

Znaczna część badań dotyczyła analizy immunohistochemicznej (IHC) czterech białek wybranych na podstawie pozytywnej walidacji metodą RT-qPCR, dostępności specyficznych dla IHC przeciwciał oraz opublikowanych na temat danego białka lub braku danych. W ten sposób wyłoniono 4 tytułowe białka: CLASP1 – białko oddziałujące z końcem dodatnim mikrotubul, FN1 – fibronektynę, MFAP5 – białko związane z mikrofibrylami i POSTN – periostynę. Reakcję IHC przeprowadzono w serii preparatów z zastosowaniem odpowiednich kontroli (pozytywnych i negatywnych) a następnie zanalizowano korelację ocenionych odczynów z cechami kliniczno-patologicznymi i molekularnymi.

Dla białka CLASP1 odczyn immunohistochemiczny analizowano w komórkach nowotworowych, dla fibronektyny (FN1) w podścielisku guza a dla MFAP5 i POSTN oceniano ekspresję osobno i w komórkach nowotworowych, i w podścielisku guza. Poszukiwanie korelacji między obecnością badanych białek w guzie i innymi cechami kliniczno-patologicznymi i molekularnymi guza pozwoliło ustalić zależność: 1. pomiędzy silnym odczynem CLASP1 a obecnością zwapnień w guzie i wiekiem pacjentek powyżej 54 r.ż.; 2. pomiędzy silnym odczynem FN1 a lokalizacją anatomiczną guza, tj. miejscem przerzutu w strukturach otrzewnej oraz pomiędzy silnym odczynem FN1 a dużym natężeniem desmoplazji; 3. pomiędzy słabym odczynem dla MFAP5 a całkowitą lub częściową odpowiedzią na chemioterapię I linii oraz pomiędzy silnym odczynem dla MFAP5 w desmoplazji a dużym natężeniem desmoplazji oraz 4. zależność pomiędzy średnim i wysokim odczynem POSTN w desmoplazji a lokalizacją wycinka w otrzewnej, pozytywną między odczynem białka POSTN w desmoplazji a stopniem desmoplazji a także pomiędzy silnym odczynem POSTN w komórkach nowotworowych a obecnością zwapnień.

Kolejnym krokiem była ocena wartości prognostycznej czterech badanych białek. Statystycznie istotną różnicę całkowitego czasu przeżycia pacjentek z silniejszym odczynem danego białka w porównaniu do pacjentek ze słabym odczynem tego samego białka znaleziono jedynie dla fibronektyny (w podścielisku guza) i periostyny ale jedynie w desmoplazji a nie w komórkach nowotworowych. Tak więc silna ekspresja obu białek korelowała z krótszym całkowitym czasem przeżycia (OS). Ponadto obliczenie współczynnika korelacji Spearmana wskazało na umiarkowaną zależność pomiędzy poziomem ekspresji FN1 i POSTN w desmoplazji.

Dodatkowa analiza polegająca na wyznaczeniu modeli regresji jednoczynnikowej proporcjonalnego ryzyka Coxa potwierdziła znaczenie

prognostyczne ekspresji FN1, ekspresji POSTN, choroby resztkowej, angioinwazji oraz martwicy w odniesieniu do OS. Następnie cechy istotne statystycznie posłużyły do analizy wieloczynnikowej i wyznaczenia modelu z zastosowaniem metody krokowej eliminacji zmiennych, co pozwoliło stwierdzić niezależny wpływ choroby resztkowej, martwicy, angioinwazji oraz ekspresji FN1 w odniesieniu do OS. Z kolei niezależny wpływ na DFS miały angioinwazja, martwica oraz choroba resztkowa.

W podsumowaniu, udało się udowodnić, że fibronektyna jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w surowiczym raku jajnika względem całkowitego czasu przeżycia, choroby resztkowej, angioinwazji i martwicy a periostyna może mieć znaczenie prognostyczne. Dla pozostałych dwóch białek, CLASP1 i MFAP5, jednak nie wykazano znaczenia prognostycznego.

W **dyskusji** Doktorantka odniosła się do wszystkich istotnych aspektów pracy poczynając od wyboru materiału klinicznego, liczebności prób, sposobu weryfikacji wyjściowych danych mikromacierzowych i wyboru genów oraz metod weryfikacji. Omówiono także znaczenie prognostyczne innych cech klinicznych. Szczegółowo przedyskutowano obie główne metody weryfikacji markerów: RT-qPCR i IHC przytaczając dla porównania wyniki badań innych autorów. Ciekawie przedstawiono wyniki badań innych autorów nad wszystkimi czterema genami, w tym nad periostyną w raku piersi. Jest na pewno istotne dla przebiegu dalszych badań, że Doktorantka pomimo niepełnej walidacji nadal skłania się do kontynuacji badań m.in. nad białkiem CLASP1 ze względu na jego poznane oddziaływania z mikrotubułami będącymi celem terapii raka jajnika z użyciem taksanów. Doktorantka opisała plany kontynuacji badań nad rolą białka CLASP1 w badanych raku jajnika z zastosowaniem macierzy białkowych, co dobrze rokuje odnośnie prawidłowego wykorzystania wykonanych i opisanych już w rozprawie badań. Bardzo ciekawe także wydają się wspomniane jedynie niepublikowane dane uzyskane w liniach komórkowych z wyciszoną ekspresją tych genów i z ich nadekspresją.

Na zakończenie nasuwa się refleksja, że prawdopodobnie to grupy genów lub szlaki metaboliczne a nie pojedyncze geny a także nie poziom ekspresji tych genów a aktywności kodowanych przez nie białek i/lub interakcje z innymi białkami będą miały wartość prognostyczną.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. **mgr Katarzyny Kujawy** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z tego względu wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii - Instytut im. Marii

Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie p. mgr Katarzyny Kujawy do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Pani Kujawa jest współautorką pięciu publikacji oryginalnych i jednej pracy przeglądowej opublikowanej w Cancer Chemotherapy and Pharmacology w ubiegłym roku ściśle związanej z tematyką rozprawy doktorskiej, bo przedstawiającej postępy w terapii raka jajnika. Biorąc powyższe pod uwagę, ale przede wszystkim ze względu na wagę uzyskanych wyników, ich nowatorstwo i znakomite przedstawienie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Hanna Rokita