



Gdańsk, 26 września 2020

Instytut Biotechnologii Medycznej i
Onkologii Doświadczalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1
80-210 Gdańsk
tel. 58 349 15 85
rafal.sadej@gumed.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej lek. Romana Dubiańskiego zatytułowanej:
„Analiza funkcji jądrowej receptora HER2 w HER2-dodatnim raku piersi”
wykonanej w Narodowym Instytucie Onkologii w Warszawie**

Rak piersi (BCa) to najczęstszy nowotwór złośliwy u kobiet, prowadzący globalnie do ponad 620 tysięcy zgonów rocznie (dane WHO, 2018). Nadekspresję HER2 (ERBB2) obserwuje się w 20-25% przypadków choroby, a cecha ta związana jest to z gorszym rokowaniem pacjentek. Przełomem w leczeniu chorych z HER2-dodatnim rakiem piersi było wprowadzenie terapii spersonalizowanych, celujących w aktywność HER2 i oddziałujących z nim członków rodziny ERBB. W 1998 FDA zaakceptowało trastuzumab jako lek pierwszego wyboru dla pacjentów z HER2-dodatnim rakiem piersi, a kolejne lata przynosiły zatwierdzenie lapatinibu, pertuzumabu, neratinibu, koniugatów trastuzumabu z emtanzyną czy derukstekanem. Pomimo niezaprzeczalnego postępu w terapii tej choroby w zasadzie u wszystkich pacjentek z czasem wykształca się oporność na stosowane leczenie celowane. Mechanizm tego procesu jest bardzo złożony i obejmuje między innymi bezpośrednie zaburzenia funkcji HER2. Stąd też dogłębne poznanie regulacji aktywności tego receptora jest podstawą udoskonalenia schematów terapii czy rozwoju nowej klasy leków celujących w HER2.

Praca doktorska lek. Romana Dubiańskiego dotyczy poznania jądrowej funkcji HER2 oraz udziału zlokalizowanego tu receptora w odpowiedzi komórek raka piersi na trastuzumab. Autor skupił się na białkach oddziałujących z HER2 w obrębie jądra komórkowego, badał jego ewentualne wiązanie do chromatyny i analizował ekspresję genów w komórkach opornych na trastuzumab. Biorąc pod uwagę powyższe informacje stwierdzić należy, że zagadnienia realizowane w pracy doktorskiej lek. Romana Dubiańskiego są aktualne, istotne z punktu widzenia poznawczego i posiadają potencjalny wymiar aplikacyjny.

Praca doktorska została zrealizowana pod opieką merytoryczną dr. hab. Elżbiety Sarnowskiej, prof. NIO-PIB i dr Agnieszki Jagiełło-Gruszczyńskiej, które posiadają znaczący dorobek w obrębie szeroko pojętej biologii molekularnej komórki nowotworowej z uwzględnieniem aspektów klinicznych raka piersi.

Recenzowana rozprawa to napisany po polsku maszynopis liczący 65 stron, o strukturze standardowej dla prac doktorskich z obszaru nauk doświadczalnych tj. streszczenie, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja i spis literatury. Pomimo braku wydzielonej sekcji 'Podsumowanie wyników' Autor w ostatnim punkcie rozdziału „Wyniki” podsumowuje rezultaty wykonanych doświadczeń i zamieszcza rycinę przedstawiającą proponowany model regulacji genów przez jądrową frakcję HER2. Ponadto rozdział dyskusja zakończony jest zwięzłymi wnioskami co w sposób naturalny zamyka pracę. Manuskrypt napisany jest bardzo dobrze, język jest fachowy i logiczny, a ilość zauważonych przeze mnie błędów językowych jest znikoma. Wszystkie zagadnienia opisane są syntetycznie ale wyczerpująco, co ma odzwierciedlenie w stosunkowo niewielkiej objętości pracy i w moim przekonaniu stanowi atut opracowania.

Oceniając stronę redakcyjną pracy mam kilka drobnych uwag do wykazu zastosowanych skrótów. W zamieszczonym wykazie BRCA1 i BRCA2 przetłumaczone zostały jako „gen supresorowy zlokalizowany na chromosomie” odpowiednio „17” i „13”. Tymczasem skrót BRCA1/2 pochodzi od angielskiego „*breast cancer type 1/2 susceptibility gene*”. Według mojej wiedzy nie istnieje powszechnie przyjęta polska nazwa tych genów. Ponadto, zgodnie z nomenklaturą HUGO, nazwy genów, w przeciwieństwie do nazw białek, pisze się kursywą. Podobnie nazwa białka STAT3 została przetłumaczona jako „czynniki transkrypcyjny”, tymczasem akronim ten pochodzi od angielskiego „*signal transducer and activator of transcription*”. PgR z kolei to nazwa genu kodującego receptor progesteronu, dla białka zarezerwowano natomiast skrót PR.

Wstęp rozprawy podzielony jest na dwie zasadnicze części. Pierwsza poświęcona jest budowie i aktywności receptora HER2. Druga część opisuje HER2-dodatni rak piersi, jego częstotliwość, schematy terapeutyczne i mechanizm działania stosowanych leków. Ten rozdział napisany jest dobrze i dostarcza koniecznej wiedzy, potrzebnej do zrozumienia dalszych części rozprawy. Mimo to, Autorowi nie udało się uniknąć kilku, moim zdaniem, nietrafionych sformułowań. Na stronie 11 napisano „przekazywanie sygnału zostaje zainicjowane poprzez dimeryzację receptora oraz transmodulację innych receptorów z rodziny EGFR”. Termin „transmodulacja” wydaje się nietrafiony i mógłby zostać zastąpiony bardziej precyzyjnym określeniem „transaktywacja”. Na stronie 12 znajduje się zdanie „Ze wszystkich

heterodimerów rodziny HER heterodimer HER2-HER3 jest uważany za najsilniejszy”. Wyrażenie „najbardziej onkogenny” w tym przypadku wydawałoby się trafniejszym. Na tej samej stronie fragment „Informacje są przekazywane za pomocą specjalnych ścieżek sygnałowych” sugeruje, że w komórce mamy również niespecjalne kaskady sygnalizacyjne. Prawdopodobnie termin „swoiste” czy „specyficzne” ścieżki sygnałowe byłyby bardziej fachowy. W sekcji „Wstęp” znajdują się również dwa schematy z odpowiednio nadanym tytułem. Autor mógł pokusić się o dodanie krótkiej legendy/opisu tych schematów, co z pewnością ułatwiłoby ich zrozumienie.

Po wstępie jasno i dość szczegółowo sprecyzowane są cele pracy. W punkcie 4 Autor podaje jako cel „Analiza wpływu oporności na trastuzumab na regulację ekspresji genów”. Wydaje mi się, że można było sprecyzować jakiej grupy genów, bo przecież nie wszystkich.

Rozdziały „Materiały” i „Metody” są wyczerpujące i zawierają wszystkie informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. W sekcjach tych znajdują się drobne nieścisłości. Przykładowo w tabeli 2 umieszczono charakterystykę zastosowanych przeciwciał. Jako gospodarza przeciwciał kontrolnych IgG wskazano „anty-królika”, co jest oczywistym przeoczeniem. W opisie wyprowadzenia linii SKBR3 odpornej na trastuzumab znalazło się sformułowanie „Jako linie kontrolną, wrażliwą na trastuzumab używano czystej linii SKBR3”. Domyślam się, że zastosowano tu linię „dziką”, co prawdopodobnie jest trafniejszym określeniem. W opisie immunoprecypitacji chromatyny jako liczbę zastosowanych komórek podano 2.5×10^{-6} i jest to niewątpliwie pomyłka edytorska.

W rozdziale „Wyniki” Autor weryfikuje lokalizację jądrową HER2 w tkance i liniach komórkowych oraz wskazuje na interakcję HER2 z podjednostkami kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF. Za pomocą immunoprecypitacji chromatyny potwierdzone zostało również wiązanie HER2 wraz z kompleksem SWI/SNF do DNA w obrębie *loci* genów *FKB1* i *BRCA1*. Geny te zaangażowane są odpowiednio w regulację metabolizmu cukrów oraz naprawę uszkodzeń DNA. Prosiłbym Autora o uzasadnienie ich wyboru w kontekście wiązania się tu HER2 oraz kompleksu SWI/SNF. W pracy znajduje się uzasadnienie dotyczące *locus FBP1*, ale nie wyjaśniono jakim kryterium kierowano się badając wiązanie HER2/SWI/SNF do genu *BRCA1*. Czy otrzymane wyniki znajdują jakieś odzwierciedlenie kliniczne w kontekście relatywnie niskiej częstotliwości raków HER2-dodatnich u pacjentek z mutacją *BRCA*?

W dalszej części na podstawie danych dostępnych publicznie (brakuje tej informacji w sekcji „Wyniki”), porównujących profil ekspresji genów w linii komórkowej BT474 wrażliwej na trastuzumab i jej wariantie opornym, wytypowano enzymy metabolizmu glukozy i kwasów

tłuszczowych oraz badano ich profil ekspresji w komórkach SKBR3 traktowanych tym lekiem. Wykazano również, że trastuzumab indukuje ekspresję genów kodujących podjednostki kompleksu remodelującego chromatynę. Wydaje się więc, że z jednej strony HER2 wiąże się z podjednostkami kompleksu SWI/SNF, z drugiej zaś przeciwciała anty-HER2, blokujące przecież jego aktywność, indukują ekspresję genów kodujących podjednostki tego kompleksu. Zależność HER2-SWI/SNF wydaje się więc stosunkowo złożona. Prosiłbym Autora o komentarz w tej kwestii. Jakie jest odniesienie tych relacji do metabolizmu glukozy i oporności komórek na leki anty-HER2?

W kolejnym etapie wyprecypitowano HER2 z ekstraktu jądrowego komórek SKBR3 i przy pomocy spektrometrii mas podjęto próbę identyfikacji oddziałujących z nim białek. Porównano również białka koprecypitowane z HER2 z białkami oddziałującymi z BRM tj. podjednostką kompleksu SWI/SNF. Następnie analizowano ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm tłuszczów i aktywność kinazy AMPK, regulującej stan metaboliczny komórki w linii odpornej na trastuzumab. W końcowej części wyników, korzystając z publicznie dostępnych analiz transkryptomu oraz dostępnych danych literaturowych dowiedziono, że geny HER2-zależne kontrolowane są bezpośrednio przez kompleks SWI/SNF.

Rozdział „Wyniki” przygotowany jest starannie, wszystkie eksperymenty są dobrze zaplanowane a ich dokumentacja jest rzetelna. Pozytywnie oceniam dostrzegalną dużą ostrożność Autora w interpretacji wyników, choć przykładowo stwierdzenie na stronie 50 „Uzyskany wynik sugeruje, że w komórkach opornych na trastuzumab dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu AMPK i w związku z tym do przeprogramowania metabolizmu komórkowego” wydaje się być nieco zbyt daleko idące. Aktywność kinazy aktywowanej przez AMP nie jest przecież jedynym regulatorem metabolizmu komórki. Obniżona aktywność AMPK zaobserwowana w komórkach raka piersi opornych na trastuzumab wysoce prawdopodobnie zaburza metabolizm komórkowy, choć w pracy nie wykazano bezpośrednich dowodów na taki proces. Ponadto, mimo dużej staranności przygotowanej pracy Autorowi nie udało się uniknąć kilku niewielkich błędów edytorskich w części „Wyniki”. We wszystkich doświadczeniach typu Western Blotting nazwy białek, których detekcję przeprowadzano, poprzedzone są symbolem „ α ”. Przyznam się, że pierwszy raz spotykam się z takim oznaczeniem. W rycinie 6 tytuł osi Y to „Fold enrichment”. Dla wykresów znajdujących się na rycinach 6, 7, 8, 9 i 10 brakuje mi informacji statystycznych. Co reprezentują sobą słupki błędów (odchylenie standardowe, czy odchylenie standardowe średniej)? Które słupki były ze sobą porównywane i jaka jest wartość „p”? Brakuje mi również informacji o ilości powtórzeń danego doświadczenia.

Rozdział „Dyskusja” jest bardzo ciekawy. Napisany jest on z dużą lekkością. Oczywiście jest dojrzałość naukowa i duże rozeznanie Autora w tematyce. Bardzo podobał mi się fragment oraz adekwatna rycina opisujące relację SWI/SNF/HER2/AMPK w kontekście oporności pacjentek na terapię anty-HER2. Interesująca jest również, wynikająca z pracy sugestia zastosowania nowych potencjalnych schematów terapeutycznych opartych o leki anty-HER2 i modulatory metabolizmu. Na końcu tego rozdziału znajduje się zestawienie wniosków, naturalnie zamykające pracę. Spis literatury liczy 88 pozycji bezpośrednio związanych z pracą. Znaczna większość cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dziesięcioleciu.

Chciałbym podkreślić, że wypunktowane przeze mnie nieścisłości czy błędy redakcyjne w żaden sposób nie wpływają na wysoką wartość naukową dysertacji. Aktualność problemu, ilość i złożoność zastosowanych technik oraz swada z jaką Autor opisuje swój projekt doktorski i otrzymane wyniki sprawiła, że lektura pracy była dla mnie dużą przyjemnością.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej lek. Romana Dubiańskiego zatytułowanej: „Analiza funkcji jądrowej receptora HER2 w HER2-dodatnim raku piersi” jest jednoznacznie pozytywna, a rozprawa w pełni spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę więc o dopuszczenie przez Radę Naukową Centrum Onkologii - Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie Pana Romana Dubiańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.

dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed

