

Zespół Kliniczno-Badawczy Epigenetyki Człowieka

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Monika Puzianowska-Kuźnicka

Tel: (48 22) 6086591

Fax: (48 22) 6086410

e-mail: mpuzianowska@imdik.pan.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Michała Kalemby
pt. „Związek polimorfizmów jednonukleotydowych w *locus FOXE1*
z rakiem brodawkowatym tarczycy”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa powstała pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Barbary Jarząb w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej gliwickiego oddziału Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. Celem opisanych w rozprawie badań było sprawdzenie, czy w kohorcie polskich chorych cierpiących na raka brodawkowatego tarczycy istnieje związek pomiędzy siedmioma kandydackimi polimorfizmami w *locus* genu *FOXE1* a tym rakiem oraz różnymi stopniami jego klinicznego zaawansowania, na potrzeby pracy podzielonego na dwie fazy: mikroraka oraz zaawansowanej, klinicznie jawnej choroby. W badaniach wykorzystano materiał genetyczny pochodzący łącznie od 1883 pacjentów i 886 zdrowych, niespokrewnionych kontroli. Zebranie tak obfitego materiału było możliwe dzięki wieloletniemu zaangażowaniu zespołu prowadzonego przez prof. Barbarę Jarząb w badania nad patogenezą raków tarczycy, na którym to polu zespół ma imponujące osiągnięcia. Doświadczenia wykonano stosując rutynowe metody biologii molekularnej oraz analizy statystycznej. W analizie wzięto pod uwagę jako zmienne zakłócające płeć oraz wiek w chwili rozpoznania choroby jako surogat wieku, w którym doszło do nowotworzenia. W analizach jednoczynnikowych nie wykazano zależnych od płci różnic w rozkładzie genotypów badanych polimorfizmów, ani różnic w rozkładzie pomiędzy osobami z rakiem rozpoznanym przed i po 45 roku życia, które przetrwałyby

korektę Bonferroniego. Nie wykazano też różnic w rozkładzie genotypów i haplotypów „ochronnego” i „ryzykownego”, które zostały opracowane przez Doktoranta na podstawie wyników badań poszczególnych polimorfizmów, pomiędzy pacjentami z mikrorakami i grupą kontrolną. Natomiast porównanie rozkładu genotypów i haplotypów u osób z rakiem klinicznie jawnym i u osób zdrowych wykazało istnienie różnic, które pozostały znamienne po korekcie Bonferroniego. Różnice te dotyczyły polimorfizmów rs1877431, rs10983700, rs965513, rs1867277 i rs1443434, jak również obydwu haplotypów. Ponadto, znamienne różniły się rozkłady genotypów polimorfizmów rs1877431, rs10983700 i rs965513 pomiędzy pacjentami z mikrorakiem i rakiem klinicznie jawnym, ale częstości haplotypów „ochronnego” i „ryzykownego” były w tych grupach podobne. Analizę uzupełniono wykonaniem wieloczynnikowych regresji logistycznych z uwzględnieniem genotypów, wieku i płci. W analizie dotyczącej mikroraka i grupy kontrolnej, jedynie wiek pozostał niezależnym czynnikiem ryzyka. W przypadku raka klinicznie jawnego i grupy kontrolnej, niezależnym czynnikiem ryzyka były genotypy CT i TT polimorfizmu rs10983700, a porównanie dwóch stadiów zaawansowania raka jako niezależny czynnik ryzyka ujawniło genotypy AG i AA polimorfizmu rs1877431. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorant wyciągnął wniosek, że predyspozycja genetyczna do mikroraka brodawkowego tarczycy jest inna niż predyspozycja do raka klinicznie jawnego, a polimorfizmy rs1877431, rs10983700 i rs965513 mogą mieć związek z progresją choroby od stadium mikroraka do choroby jawnej klinicznie.

Rozprawa doktorska ma układ typowy. We **Wstępie** Doktorant opisuje podział raków tarczycy w zależności od typu histopatologicznego, podaje szczegółową klasyfikację rozpoznań cytologicznych, tryb postępowania po pierwszej biopsji i wskazania do kolejnej biopsji, podaje zasady klasyfikacji guzów według skali TNM i omawia metody terapii. Następnie opisuje problem predyspozycji genetycznych do raka tarczycy wskazując geny, których odmiany polimorficzne mogą zwiększać ryzyko zachorowania. Doktorant słusznie zaznacza przy tym, że nowotwory tarczycy w większości przypadków powstają wskutek współdziałania licznych czynników genetycznych i środowiskowych. W

ostatniej części Wstępu opisany jest gen *FOXE1* i jego *locus* oraz funkcja kodowanego przez ten gen białka. W mojej ocenie Wstęp jest najłagodniejszą częścią rozprawy. Biorąc pod uwagę temat i cel pracy, za niepotrzebne uważam spore jej części, w tym Tabelę 2 i Tabelę 3. Co więcej, Doktorant tabelę tę, oraz Tabelę 4, zacytował z publikacji Jarząb i wsp. „Diagnostyka i leczenie raka tarczycy – rekomendacje polskie” wydanej drukiem w Endokrynologii Polskiej w 2010 roku (pozycja 10 na liście piśmiennictwa, w spisie omyłkowo nie podano nazwy pisma), podczas, gdy istnieje nowsze opracowanie „Guidelines of Polish National Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma 2018 update”, opublikowane również w Endokrynologii Polskiej, ale w 2018 roku (tom 69, str. 34-74). Ponadto, w mojej opinii zbędne są: Tabela 1, bo opis podziału raków znajduje się również w pierwszym akapicie Wstępu, Tabela 5, która powtarza dane z tekstu zamieszczonego tuż przed nią, jak również Rycina 3, gdyż schemat syntezy hormonów tarczycy nie jest kluczowy w odniesieniu do tematu pracy oraz Rycina 4, bo opis również znajduje się w tekście.

Z drugiej strony, właśnie ze względu na temat pracy, czyli badanie molekularnych czynników ryzyka wystąpienia raka brodawkowatego tarczycy, zamiast wyżej wymienionych części widziałabym opis wydarzeń molekularnych o udowodnionym związku z tym rakiem, czyli informacje na temat rearanżacji, mutacji, zaburzeń epigenetycznych, itp. Wreszcie, w mojej opinii brakuje we wstępie informacji, dlaczego te konkretnie polimorfizmy wybrano do analizy. Informacja taka znajduje się w Dyskusji, ale to już na etapie Wstępu czytelnik powinien zostać przekonany, że ich wyboru dokonano na podstawie sugestyjnych danych literaturowych, a nie przypadkowo.

We Wstępie znalazło się też kilka błędów. Nieprecyzyjne jest sformułowanie „agresywność nowotworu” na str. 17, która przez Doktoranta wprowadzona została do stopnia zaawansowania klinicznego (rozmiar guza i przerzuty), podczas gdy o agresywności guza decydują cechy histopatologiczne i, jak już wiemy, cechy molekularne. W podrozdziale „Predyspozycja genetyczna do raka tarczycy”, str. 20, Doktorant podał wprost za Wikipedią ([https://pl.wikipedia.org/wiki/Penetracja_\(genetyka\)](https://pl.wikipedia.org/wiki/Penetracja_(genetyka))) nie najlepszą definicję „penetracji”: „penetracja wyrażana jest jako stosunek liczby osobników

posiadających cechę warunkowaną przez dany gen do całkowitej liczby osobników posiadających ten gen. Penetracja genu może być pełna, gdy dany gen przejawia się fenotypowo...”. Obecnie uważamy, że penetracja w genetyce oznacza stosunek osób posiadających daną odmianę genu, nie gen, które jednocześnie prezentują konkretny fenotyp związany z tą odmianą, w odniesieniu do wszystkich nosicieli tej odmiany. Nieprecyzyjnym uproszczeniem jest też sformułowanie ze str. 26, że „białko FOXE1 współdziała z nukleosomami”.

Cel pracy jest poprawnie sformułowany.

Materiał jest poprawnie opisany, choć nadal nie jest dla mnie jasne, dlaczego liczebność grup w badaniach niektórych polimorfizmów była znacząco niższa niż innych. Czy brakujące próbki zgromadzono na późniejszych etapach pracy i nie uzupełniono wcześniej wykonanych analiz niektórych polimorfizmów o te właśnie próbki? Czy wyniki wyszły niekonkluzywnie i zostały usunięte z analizy? Czy wreszcie świadomie ograniczono liczbę próbek i jakie były kryteria wyboru? Brak jest też informacji, czy różnica w medianie wieku pomiędzy pacjentami z rakiem i grupą kontrolną była znamienna.

Metody są opisane bardzo dokładnie i klarownie. Do tej części pracy mam jedynie niewielkie uwagi, np. przy opisie warunków wirowania lepiej jest podawać wartość g , a nie liczbę obrotów na minutę, bo w tym drugim przypadku trzeba podać również rodzaj rotora i jego promień, by można było wyliczyć g . W Tabeli 8 przy polimorfizmie rs1877431 podano, że mamy do czynienia z podstawieniem C>T, podczas gdy jest to A>G. Wreszcie, czytając opis reakcji PCR na str. 38 można błędnie odnieść wrażenie, że aktywacja polimerazy DNA jest elementem każdego z 40 cykli, podczas gdy jest ona jednorazowa.

Wyniki są również szczegółowo i jasno opisane. Wykonano wszelkie zaplanowane analizy. Pierwsza uwaga odnosząca się do tej części pracy dotyczy nomenklatury. Dlaczego Doktorant od początku używa sformułowań „allel ryzyka”? Badając odmiany polimorficzne raczej posługujemy się pojęciem „typ dziki” i „odmiana polimorficzna”. Rzadszy allel nie zawsze jest „ryzykowny”, bo może zmniejszać ryzyko wystąpienia danej patologii. Jediną sytuacją

uzasadniającą użycie od początku sformułowania „allel ryzyka” jest taka, gdy już wcześniej wykazano, że dana odmiana faktycznie zwiększa ryzyko. Doktorant natomiast badał również polimorfizmy wcześniej nie analizowane w aspekcie raka brodawkowatego tarczycy i dopiero miał wykazać, które ich odmiany są „ryzykowne”. Druga uwaga dotyczy opisu wyników wieloczynnikowych regresji logistycznych. Nie uzasadniono, dlaczego do modeli wprowadzono jako zmienną jedynie wybrane polimorfizmy, np. w dziale 8.10.1. tylko polimorfizm rs10983700.

Podsumowanie wyników jest wyczerpujące i jasne. Mogłabym jedynie zaproponować rozbić punktu 2 na dwie części, pierwszą dotyczącą haplotypów i drugą dotyczącą analizy różnic w częstości genotypów w zależności od płci.

Pierwsza część **Dyskusji** jest bardzo szczegółowym przeglądem literatury. Niektóre fragmenty tej części mogłyby być przeniesione do Wstępu, gdzie byłyby uzasadnieniem, dlaczego analizie poddano te a nie inne polimorfizmy *locus FOXE1*. Kolejne części stanowią już rzeczywistą dyskusję. Niezwykle interesujące są fragmenty dotyczące mikroraka. Nie do końca zgadzam się z interpretacją, że polimorfizmy rs1867277 i rs1443434 nie są związane z wyższym stopniem zaawansowania choroby, bo wykazano przecież różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy zdrową tarczycą i tarczycą z rakiem brodawkowatym w stadium klinicznie jawnym. Podobną uwagę mam do interpretacji znaczenia haplotypów. Podoba mi się również część Dyskusji, w której opisano funkcjonowanie i rolę FOXE1 i wskazanie, że literatura nie jest w tym aspekcie spójna, na przykład jedni autorzy udowadniają, że FOXE1 hamuje proliferację komórek raka tarczycy, a inni, że to właśnie zahamowanie ekspresji FOXE1 ma taki skutek. Jedyny problem dostrzeżony przeze mnie w dyskusji to to, że Doktorant chyba myli ogon poliadenylowy (poliadeninowy) z ciągiem polialaninowym. Na str. 88 opisuje izoformy mRNA FOXE1 używając pojęcia ogon polialaninowy, a mRNA ma przecież na końcu 3' ogon poliadenylowy. Natomiast ciąg polialaninowy znajduje się mniej więcej w połowie białka FOXE1 i raczej powinien być nazwany właśnie ciągiem, a nie ogonem (str. 92).

Część merytoryczną rozprawy kończą **Wnioski** oraz **Streszczenia** w języku polskim i angielskim, do których nie mam uwag.

Podsumowując, w rakach tarczycy, podobnie jak w rakach sutka oraz prostaty, mamy często do czynienia z mikrorakami. Nie dysponujemy natomiast metodami pozwalającymi odróżnić mikroraki obarczone wysokim ryzykiem przejścia w stadium klinicznie jawne i zagrażające życiu od tych, które pozostaną w stadium utajonym. W związku z tym prawie zawsze stosujemy radykalne metody leczenia, które w części przypadków najprawdopodobniej nie są konieczne. Dlatego bardzo doceniam, że Promotor i Doktorant za jeden z celów pracy obrali próbę znalezienia markerów molekularnych, które mogą odróżnić od siebie mikroraki o różnym potencjale złośliwości. Chcę również podkreślić, że doceniam fakt, że lekarz-praktyk zajął się nie typowymi badaniami klinicznymi, ale badaniami molekularnymi.

Rozprawa doktorska lekarza Michała Kalemby zawiera oryginalne, wartościowe wyniki, które uzyskano stosując poprawną metodologię. Rozprawa całkowicie spełnia warunki ustawowe dotyczące oryginalności problemu naukowego, wiedzy Doktoranta oraz umiejętności prowadzenia badań. Dlatego pozwalam sobie **wnioskować do Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie lekarza Michała Kalemby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z poważaniem,



Warszawa, 21.10.2019