

Prof. dr hab. Jerzy Bal
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

Recenzja pracy doktorskiej mgr Sebastiana Zięby pt. „Analiza panelu mutacji somatycznych wybranych genów w płaskonabłonkowym raku sromu”.

Płaskonabłonkowy rak sromu (VSCC) jest rzadkim nowotworem ginekologicznym. Szacuje się, że wśród nowotworów złośliwych narządu rodowego występuje z częstością nie większą niż 5%. Zasadniczo wyróżnia się dwie postaci tego nowotworu: związaną i nie związaną z infekcją wirusem brodawczaka (HPV). Czynniki ryzyka, symptomatologia jak i patomorfologia zarówno stanów przedrakowych jak i samego raka sromu są dość dobrze poznane. Tylko nieliczne informacje dotyczą genetycznych uwarunkowań powstawania i przebiegu tego typu nowotworu. Z tego względu wybór tematu pracy doktorskiej wydaje się jak najbardziej uzasadniony.

Doktorant postawił przed sobą bardzo ambitne cele. Są nimi identyfikacja mutacji prowadzących do karcynogenezy oraz mutacji zwiększających ryzyko progresji zmian przedrakowych w płaskonabłonkowym raku sromu. Celem było również wskazanie, na podstawie przeprowadzonych badań, potencjalnych leków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii chorych na VSCC. Celami szczegółowymi była analiza mutacji somatycznych wybranych genów w zmianach przednowotworowych raka sromu zarówno w przypadkach infekcji wirusem HPV (śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia, HSL), niezależnych od tych infekcji (środnabłonkowa neoplazja typu zróżnicowanego, dVIN i liszaj twardzinowy, LS) oraz w guzach samego nowotworu. Co ważne w tym punkcie jako metodę analizy DNA i identyfikacji mutacji wybrano sekwencjonowanie następnej generacji. Kolejnym celem była ocena korelacji wykrytych wariantów genowych a infekcją wirusem brodawczaka (hrHPV). *Last but not least* mgr S. Zięba założył poznanie szlaków biologicznych, w których uczestniczą białka kodowane w genach, w których zidentyfikowano mutacje.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie trzech wieloautorskich prac opublikowanych w latach 2018-2020 w czasopismach o wysokim stopniu oddziaływania (łączny IF = 13,116). W wszystkich publikacjach mgr S. Zięba jest pierwszym autorem. Praca w *Gynecologic Oncology* (2018) i publikacja w *International Journal of Molecular Sciences* (2020) mają charakter eksperymentalny. Praca *Gynecol Oncol* z 2020 r. stanowi swoiste podsumowanie osiągniętych wyników i wiedzy z zakresu molekularnych uwarunkowań płaskonabłonkowego raka sromu.

Przedstawienie rozprawy doktorskiej w formie opublikowanych wyników badań, w recenzowanych czasopismach naukowych, ułatwia ale jednocześnie utrudnia przedstawienie własnej oceny. Recenzja może mieć bowiem jedynie charakter odniesienia się do, jak wspomniano, opublikowanych rezultatów, a nie jak w przypadku klasycznej rozprawy doktorskiej gdzie ocenie podlega całość rozprawy, ze wszystkimi jej elementami od

merytorycznych po edytorskie. W rozprawie obok załączonych publikacji znajduje się co prawda krótki wstęp, podsumowanie wyników, jak też dodatkowo każdej publikacji towarzyszy stosowne streszczenie niemniej przyjęta, nie kwestionowana, zgodna z obowiązującymi przepisami forma rozprawy doktorskiej, jak wspomniano, utrudnia indywidualną ocenę zarówno osiągniętych wyników jak i osobistego wkładu doktoranta w przygotowanie rozprawy.

Praca doktorska mgr S. Zięby poświęcona jest identyfikacji i analizie somatycznych markerów genetycznych w płaskonabłonkowym raku sromu. Pacjenci rekrutowali się z dwóch ośrodków polskich i jednego z Królestwa Niderlandów. Ocena kliniczna, badania cytologiczne, histologiczne były prowadzone zarówno w Polsce jak i w Niderlandach. Przy genotypowaniu HPV wykorzystano testy komercyjne. Identyfikację mutacji somatycznych, prowadzono metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Stosowano tzw. sekwencjonowanie panelowe na bazie zestawu umożliwiającego wykrycie wariantów w 50 wybranych genach supresorowych i onkogenach. Przebadano 38 próbek w zmianach przednowotworowych HSL hrHPV(+) i odpowiednio 19 dVIN i 20 LS w zmianach hrHPV(-) oraz w 91 przypadkach guzów VSCC (hrHPV(+)) i hrHPV(-). Wśród zidentyfikowanych mutacji przeważały mutacje w genie *TP53* odpowiednio w HSIL (24%), w dVIN (53%) i VSCC (61%). Drugim genem co do częstości występowania mutacji był *CDKN2A*. O ile mutacje w tym genie wykryto w zmianach dVIN (42%) i guzach VSCC (43%) to nie zidentyfikowano ich w HSIL. Żadnych mutacji nie wykryto w zmianach LS. Łącznie, oprócz wymienionych, warianty patogenne zidentyfikowano w 11 różnych genach hrHPV(+) i 7 w hrHPV(-). Po raz pierwszy na listę zmutowanych genów w VSCC wpisano *MACF1*, *NBPF1* i *MSH6*. W wspomnianych dwóch pracach eksperymentalnych, w badanym materiale, zidentyfikowano łącznie pod 300 zmian określonych jako polimorfizmy, nie znalazłem jednak informacji, w których zmianach przednowotworowych czy guzach występowały. Jak rozumiem nie kojarzono występowania tych zmian z ewentualną patogennością ze względu na wysoką częstość występowania.

Badania molekularne, identyfikacja mutacji, były prowadzone z wykorzystaniem metody NGS. Jak podkreśla mgr S. Zięba, metoda ta daje szansę przebadania dużo większej liczby genów i mutacji szczególnie gdy porównuje się ją z możliwościami klasycznego sekwencjonowania DNA metodą Sangera. Trzeba się też zgodzić, że zastosowana analiza panelowa ogranicza możliwość identyfikacji mutacji jedynie do zestawu zawartych w panelu genów co rzutuje na otrzymane w pracach wyniki. Niewątpliwie badanie cooeksomowe (WES) może przynieść nowe informacje, głównie poszerzenie spektrum analizowanych genów ale trzeba pamiętać też o ograniczeniach samej metody NGS (np. problemy z identyfikacją delecji).

Wykonane badania molekularne umożliwiają doktorantowi sformułowanie kilku wniosków ale też i pytań, na które być może w dalszych badaniach będzie trzeba szukać odpowiedzi.

Nie wydaje się ulegać wątpliwości, co wynika również z wcześniejszych badań, że wśród zmian somatycznych mutacje w genie *TP53* mogą być kluczowym markerem we wczesnym etapie karcynogenezy raka sromu. Są to mutacje występujące najczęściej, nie wydaje się jednak aby był to, z punktu widzenia genetycznego, jedyny czynnik o czym może świadczyć nie wykrycie mutacji w *TP53* w 39% spośród badanych próbek. Autor zidentyfikował mutacje łącznie w 11 różnych genach ale jak sam podaje, w innych badaniach w VSCC stwierdzono obecność mutacji w 66 genach. Zasadne natomiast wydaje się łączenie obecności mutacji w *TP53* z wczesnymi zmianami karcynogenezy. Częstość występowania mutacji w tym genie może również wskazywać na większe ryzyko progresji zmian nowotworowych w dVIN w porównaniu do HSIL. Podobny efekt jak się wydaje można przypisać patogennym wariantom genu *CDKN2A*. Do przedyskutowania pozostaje w tym miejscu możliwa rola genetycznych wariantów gremialnych nie badanych w recenzowanych pracach.

Przedstawiając prowadzone w różnych zespołach badania nad molekularną patologią raka sromu mgr S. Zięba wskazuje na różnice w częstości i typach wykrywanych mutacji. Rak sromu jest rzadko stwierdzanym nowotworem co zapewne ogranicza w dużym stopniu liczbę badanych pacjentek. Czy z punktu widzenia dotychczas zgromadzonych informacji i ograniczonej analizy mutacji można wyciągać wnioski o nowych podtypach VSCC trudno jednoznacznie powiedzieć.

Niewyjaśniona pozostaje rola liszaju twardzinowego jako zmiany prekursorowej VSCC. Nie wykrycie mutacji nie wyklucza jednak genetycznego podłoża występowania LS może bowiem wynikać np. z ograniczonej paneli liczby badanych genów.

Zastanawia, w tym kontekście, również rola infekcji HPV, która przy dość zbliżonym profilu zmian genetycznych w hrHPV(+) i hrHPV(-) sprowadza się *de facto* do indukowania określonych typów zmian przednowotworowych. Sama patogenność HPV (głównie HPV16) w występowaniu raka sromu też nie jest przecież jednoznaczna. Dyskusyjne wydaje się być łączenie roli infekcji HPV z obecnością mutacji w genie *PIK3CA* (aktywność enzymu APOBEC3). Obecność mutacji w tym genie wykryto bowiem także w hrHPV(-).

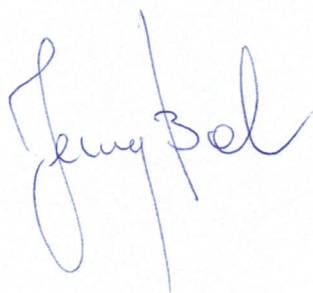
Spektrum wykrywanych mutacji somatycznych wskazuje na możliwe zaangażowanie kilkunastu szlaków biologicznych w indukowaniu i przebiegu raka sromu. Analiza *in silico* jak też wykonane badanie *in vitro*, w których wykazano cytotoksyczne działanie rapamycyna, everolimus czy AZD214 wobec komórek VSCC wskazuje, zdaniem mgr S. Zięby, na szlak PI3K/AKT/mTOR jako jeden z głównych w karcynogenezie zarówno hrHPV(+) jak i hrHPV(-). Jak wiadomo kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i seryno-troninowe odpowiadają za regulację proliferacji, metabolizmu, różnicowania i przeżywania komórek. Nadekspresję tych białek, spowodowaną mutacjami w kodujących je genach opisano też dla innych znanych transformacji nowotworowych. Paradoksalnie skoncentrowanie się głównie na tym szlaku jako wiodącym w karcynogenezie raka sromu, wynikające ze spektrum zidentyfikowanych mutacji, może być pokłosiem zastosowanego w NGS panelu genów. Zgromadzone dowody

uprawdopodobniają tą hipotezę. Konsekwentnie, w pracach składających się na doktorat, mgr S. Zięba wskazał na szeroką gamę inhibitorów szlaku PI3K/AKT/mTOR, znanych jak też pozostających na różnych etapach badań klinicznych, które w skumulowanym działaniu mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii raka sromu.

Swoją pracę mgr S. Zięba wpisuje się w badania nad podłożem i patologią molekularną płaskonabłonkowego raka sromu. Podjął się niełatwego zadania ale fakt opublikowania wyników w wysoko impaktowych czasopismach świadczy o ich wartości. W rozprawie wykazano przydatność metody sekwencjonowania następnej generacji w identyfikacji mutacji jak i w zastosowaniach o charakterze diagnostycznym a co warto podkreślić szereg analiz tego typu mgr S. Zięba wykonał samodzielnie. W publikacjach zidentyfikowano i opisano spektrum mutacji somatycznych występujących w raku sromu. Wykazano znaczącą rolę mutacji w genie *TP53* w inicjacji karcynogenezy tego nowotworu, w tym również, niezależnej od infekcji HPV. W pracach przedstawiono także wyniki wskazujące warianty genetyczne, które odpowiadają za większe ryzyko progresji nowotworu. Bardzo interesującym wynikiem jest, jak się wydaje, wykazanie odmiennej od dVIN etiologii powstawania przednowotworowego liszaju twardzinowego. Doktorant wykazał na wiodącą rolę enzymów szlaku PI3K/AKT/mTOR w karcynogenezie raka sromu co przełożył na możliwe zastosowania terapeutyczne inhibitorów hamujących lub blokujących ekspresję aktywności białek kodowanych w genach z tego szlaku.

Jak wspomniano publikacjom stanowiącym podstawę rozprawy towarzyszą streszczenia i omówienia. Warto podkreślić, że obok kwestii merytorycznych wszystkie zaprezentowane ryciny i schematy są przemyślane i świetnie ilustrują poruszaną tematykę. Cała rozprawa jest przygotowana bez zarzutu.

Na podstawie powyższej recenzji wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie mgr Sebastiana Zięby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Warszawa 3.12.2020