

Gdańsk, 19 września 2022 roku

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Kuleszy-Szewczyk zatytułowanej
„Analiza ekspresji genów zależnych od p53 w rakach jajnika”.

Rak jajnika to jeden z najczęstszych nowotworów występujących u kobiet. Chociaż pięcioletni względny wskaźnik przeżywalności wzrósł na przestrzeni ostatnich lat, nowotwór ten nadal jest częstą przyczyną śmierci pacjentek onkologicznych.

Powszechnie wiadomo, że prawidłowa aktywność białka TP53 jest niezmiennie istotna dla poprawnego funkcjonowania komórek człowieka. Białko to bierze udział w regulacji transkrypcji wielu genów oraz działa poprzez bezpośrednie interakcje z różnymi białkami. TP53 odgrywa istotną rolę w procesach naprawy DNA, regulacji cyklu komórkowego czy też apoptozie. U pacjentek z rakiem jajnika bardzo często identyfikowane są różnorodne warianty genetyczne w obrębie sekwencji kodującej genu *TP53*. Przy czym, różne zmiany na poziomie DNA mogą odmiennie wpływać zarówno na ekspresję jak i aktywność białka kodowanego przez ten gen.

Zatem analiza częstości występowania i rodzaju mutacji w genie *TP53*, a także identyfikacja zależności pomiędzy określonym wariantem genetycznym a poziomem ekspresji i aktywności kodowanego białka może dostarczyć nowych informacji dotyczących udziału TP53 w patogenezie raka jajnika. Ponadto, analiza wpływu białka TP53 na ekspresję innych genów może pozwolić na identyfikację nowych markerów molekularnych o znaczeniu zarówno prognostycznym jak i predykcyjnym dla tej grupy pacjentek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Magdaleny Kuleszy-Szewczyk jest obszerna, liczy 182 strony. Składa się z wykazu stosowanych skrótów, wstępu, opisu celów pracy, materiału i zastosowanej metodyki, wyników, dyskusji i wniosków, a także streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwa. Ponadto, zamieszczony jest spis diagramów, rycin, tabel i wykresów, których jest odpowiednio trzy, 13, 17 i 14. Piśmiennictwo to aż 262 pozycje obejmujące również prace opublikowane w ostatnich latach.

We wstępie pracy Autorka omówiła epidemiologię, etiologię, klasyfikację oraz obowiązujące schematy leczenia pacjentek z rakiem jajnika, w tym te oparte o wykorzystanie inhibitorów PARP. W sposób szczegółowy mgr Magdalena Kulesza-Szewczyk przedstawiła informacje dotyczące struktury i regulacji ekspresji genu *TP53*, oraz wariantów genetycznych wykrytych w obrębie tego genu. Autorka opisała również wyniki wcześniejszych badań dotyczących aktywności białka TP53 oraz jego udziału w regulacji transkrypcji innych genów, których produkty białkowe są

zaangażowane w procesy śmierci komórki, cyklu komórkowego czy naprawy DNA. Informacje te ułatwiają zrozumienie teoretycznych założeń pracy oraz uzasadniają celowość podjętych badań.

Celem badań mgr Magdaleny Kuleszy-Szewczyk było zbadanie zależności pomiędzy statusem genu *TP53* a kodowanym białkiem oraz ekspresji genów zależnych od białka *TP53* w komórkach raka jajnika. Ponadto, praca miała na celu określenie znaczenia klinicznego poziomu ekspresji wybranych genów oraz ewentualną identyfikację nowych markerów molekularnych w grupie pacjentek z rakiem jajnika. Do badań użyto archiwalny materiał tkankowy pochodzący z biorepozytorium Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego oraz Szpitala Bródnowskiego. Projekt badawczy został zatwierdzony przez Komitet Bioetyki Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. W pracy została przedstawiona szczegółowa charakterystyka kliniczna pacjentek oraz histologiczna badanych guzów obejmująca stopień zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histologicznego, a także typ histologiczny guzów. W materiale tkankowym włączonym do badań przeprowadzono również ocenę ekspresji białka *TP53* za pomocą badania immunohistochemicznego oraz diagnostykę molekularną polegającą na identyfikacji wariantów w eksonach 4-11 genu *TP53*. Wspomniane analizy zostały wykonane w ramach rutynowych aktywności diagnostycznych prowadzonych w Zakładzie Patologii Molekularnej COI (NIO-PIB) w latach 2000-2015.

Ostatecznie do analiz zakwalifikowano 135 przypadków raka jajnika pochodzenia nabłonkowego. Przeprowadzono analizę polegającą na korelacji obecności wariantu w genie *TP53* z ekspresją produktu białkowego. Kolejnym etapem analiz było określenie częstości występowania i rodzaju wariantów w genie *TP53* w badanych guzach jajnika. Głównym celem przedstawionej pracy było jednak określenie ewentualnego wpływu różnych form białka *TP53* na poziom ekspresji aż 31 genów regulujących między innymi cykl komórkowy, apoptozę oraz naprawę DNA. Ekspresję wybranych genów oceniono w 134 guzach za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz znakowanych fluorescencyjnie sond TaqMan, przy czym dla każdego guza wykonano trzy powtórzenia reakcji. Ekspresję znormalizowano przy użyciu trzech genów referencyjnych *GUSB*, *PPIA* oraz *HPRT1*. Wielowariantową analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem modelu regresji Cox'a przy ocenie całkowitego przeżycia oraz z użyciem regresji logistycznej przy ocenie wrażliwości na leczenie. W analizie zależności ekspresji badanego genu od statusu *p53* użyto testów Kruskala-Wallisa oraz Manna-Whitneya. Zmiany w poziomie ekspresji badanych genów były skorelowane z kliniczno-patologicznymi danymi. Przedstawiono metodyka jest prawidłowa i pozwoliła na realizację zaplanowanych działań naukowych.

Analizując ekspresję białka *TP53* badane guzy podzielono na dwie podgrupy: A - guzy, w których stwierdzono akumulację *TP53* (pozytywny odczyn w 10% komórek)

oraz B - guzy bez akumulacji TP53. Do podgrup tych zakwalifikowano odpowiednio 86 (64%) i 49 (36%) guzów. Następnie w obydwu grupach określono warianty w genie *TP53*, zależnie od przewidywanego wpływu danej zmiany na produkt białkowy. Do wariantów zmieniających białko (ZB) zostały zakwalifikowane substytucje oraz delecje i insercje niezmieniające ramkę odczytu, natomiast do wariantów eliminujących białko (EB) włączono warianty typu stop kodon, powodujące zmianę ramki odczytu oraz zmiany intronowe. W badanej grupie, zgodnie z oczekiwaniami, stwierdzono obecność wariantu w genie *TP53* w zdecydowanej większości badanych guzów ($n=114$; 84%). Porównanie wyników immunohistopatologicznych z molekularnymi wykazało, że w 84 (74%) przypadkach obserwowano akumulację białka i jednoczesną obecność wariantu genetycznego. Natomiast w 30 (26%) stwierdzono obecność wariantu genetycznego przy braku akumulacji białka TP53. Przeprowadzone badania, zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami innych zespołów, wykazały że istnieje związek pomiędzy akumulacją białka TP53 a obecnością wariantów „ZB”, podczas gdy białko TP53 gromadziło się tylko w 8 (19%) przypadkach guzów z mutacją „EB”. Przeprowadzone analizy wykazały również, że najczęściej obserwowane były substytucje, następnie delecje, duplikacje oraz insercje. W trzech przypadkach zaobserwowano współwystępowanie dwóch wariantów w genie *TP53*. Najczęściej wykryte warianty były zlokalizowane w eksonie 5, następnie 7, 8, 4, 6, 10 oraz 9 genu *TP53*.

Następnie przedstawiono kluczowe dla pracy wyniki dotyczące wpływu różnych wariantów białka TP53 na poziom ekspresji wybranych genów. Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja genów *KIF23*, *CCNE1*, *PLK1*, których produkty białkowe są związane z cyklem komórkowym, była istotnie statystycznie wyższa w guzach w których wykryto wariant w genie *TP53*. Jednocześnie w grupie guzów bez mutacji zaobserwowano niższą ekspresję genu *CDKN1A*. Badania dotyczące ekspresji genów, których produkty białkowe są zaangażowane w proces apoptozy, wykazały natomiast obniżoną ekspresję *TP73*, *TCEA3*, *TP53INP1*, *AIFM2*, *PIDD1* i *BBC3* w guzach bez akumulacji białka TP53. Jednocześnie, w guzach z mutacją w genie *TP53*, ekspresja trzech genów *TP73*, *PIDD3* oraz *BBC3* była istotnie niższa w porównaniu do nowotworów, w których nie stwierdzono obecności wariantu w genie *TP53*. W niniejszej pracy analizowano również ekspresję genów, których produkty białkowe biorą udział w naprawie DNA. Badania wykazały obniżoną ekspresję genu *DDB2* w tkankach nowotworowych, w których stwierdzono akumulację TP53 oraz w grupie guzów z wariantem w genie *TP53*.

Przeprowadzono również szereg analiz mających na celu określenie zależności pomiędzy rodzajem wykrytego wariantu w genie *TP53* a poziomem ekspresji wybranych genów. Ostatnia część pracy poświęcona jest analizie związku pomiędzy ekspresją wybranych genów a parametrami klinicznymi takimi jak: czas całkowity

przeżycia, czas wolny od choroby, odpowiedź pacjentek na leczenie, czy też szansy na uzyskanie całkowitej remisji choroby.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że w tkance nowotworowej raka jajnika bardzo często identyfikowane są mutacje w genie *TP53*, a warianty powodujące zmianę aminokwasu lub przesunięcie ramki odczytu prowadzą do akumulacji kodowanego białka. Dane dotyczące częstości występowania i rodzaju wariantów w genie *TP53* nie zaskakują i są zgodne z danymi opublikowanymi przez inne zespoły badawcze. Wykazano również, szereg zależności pomiędzy obecnością mutacji lub akumulacją białka *TP53* a ekspresją wybranych genów. Ponadto, stwierdzono że ze złym rokowaniem koreluje wysoka ekspresja genów *E2F7*, *CDK2* oraz *AIFM2*, *TCEA3* a także *GADD45A* których produkty białkowe biorą udział w procesie regulacji cyklu komórkowego, apoptozy oraz naprawy DNA. Wymagane są jednak kolejne badania, które potwierdzą wartość rokowniczą tych markerów. Wyniki swoich badań mgr Magdalena Kulesza-Szewczyk analizowała szeroko w oparciu o wykorzystane przez siebie piśmiennictwo. Wyniki prac zostały sformułowane w postaci trzech obszernych wniosków, z których każdy składa się z podpunktów.

Przedstawiona do recenzji praca posiada kilka ograniczeń, o których należy wspomnieć:

1. W niniejszym badaniu nie przeprowadzono analizy mającej na celu identyfikację wariantów w eksonach 2 oraz 3 genu *TP53*. W obrębie tych eksonów, zgodnie z informacjami zawartymi w ogólnodostępnych bazach danych oraz wynikami badań własnych recenzenta, stwierdzono obecność wariantów patogennych. Pomimo, że częstość występowania wariantów w tych eksonach nie jest wysoka, niepełna analiza sekwencji kodującej ma negatywny wpływ nie tylko na przedstawione wyniki dotyczące częstości występowania oraz rodzajów mutacji w genie *TP53* w grupie pacjentek z rakiem jajnika, ale również na analizy dotyczące związku pomiędzy obecnością poszczególnych wariantów genetycznych a akumulacją białka czy też wpływu *TP53* na ekspresję innych badanych genów.
2. We wstępie umieszczono rycinę przedstawiającą „Rozmieszczenie mutacji w genie *TP53*” (Rysunek 7, str. 43). Ilustracja została opracowana na podstawie pracy z 2001 roku. Biorąc pod uwagę ogromny rozwój biologii molekularnej na przestrzeni ostatnich lat, który miał olbrzymi wpływ między innymi na pozyskiwanie informacji dotyczących częstości występowania i rodzajów wariantów w różnych genach, zdecydowanie lepszym rozwiązaniem jest odwoływanie się do aktualnych i ogólnodostępnych baz danych, takich jak np. Cosmic (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) lub dedykowana baza *TP53* (<https://tp53.isb-cgc.org/>). Informacje zawarte w aktualnych bazach danych niejednokrotnie wymuszają rozszerzanie analiz

molekularnych (np. o analizie eksonów 2 i 3 genu *TP53*), nawet w badaniach retrospektywnych.

3. W pracy nie przedstawiono szczegółowych informacji dotyczących sposobu klasyfikacji wykrytych wariantów w genie *TP53* w badanej grupie pacjentek z rakiem jajnika. Doktorantka nie przeprowadziła klasyfikacji wariantów genetycznych zgodnie z wytycznymi ACMG opublikowanymi w 2017 roku (PMID: 27993330), które służą do klasyfikacji wariantów somatycznych i są coraz częściej stosowane przez zespoły badawcze. W pracy nie znajduję również odnośników do publikacji Kato i wsp. (PMID: 12826609) oraz Giacomelli i wsp. (PMID: 30224644), które są kluczowe i bardzo pomocne w analizie wariantów identyfikowanych w genie *TP53*. Obecnie szczegółowe określenie kryteriów klasyfikacji zidentyfikowanych wariantów genetycznych jest kluczowe i niezbędne do przeprowadzenia dalszych analiz.
4. Doktorantka stosuje skrót „p53” jako nazwę białka. Zgodnie z aktualnymi rekomendacjami nazwy genów i białek ludzkich piszemy dużymi literami, przy czym dla odróżnienia genu od białka, nazwy tych pierwszych piszemy kursywą. Zatem gen to *TP53* a białko TP53. W tym zakresie mogą okazać się pomocne informacje zawarte na stronach <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK995/> oraz <https://www.genenames.org/>.

Pozostałe uwagi mają charakter uwag edytorskich.

1. Zatasowano błędny zapis dla współwystępujących wariantów genetycznych w genie *TP53*. Jest on prawidłowy dla wariantów germinalnych, natomiast badając tkankę nowotworową nie jesteśmy w stanie określić czy obydwa wykryte warianty znajdują się na różnych allelach, czy też nawet zostały zidentyfikowane w tej samej komórce.
2. W pracy zastosowano skrót sek, który nie jest zgodny z układem Jednostek Miar SI. Sekunda to s.
3. W piśmiennictwie nie przedstawiono aktualnego adresu do bazy TP53 (<https://tp53.isb-cgc.org/>), która jest kluczowa dla analiz danych dotyczących genu *TP53*.
4. Duża liczba wykresów i tabel umieszczonych w głównym tekście rozprawy doktorskiej. Część z nich jest zbędna, gdyż de facto pokazuje te same (np. tabela 12 str. 97 oraz wykres str. 98) lub nieistotne informacje.

Te krytyczne uwagi nie wpływają jednak znacznie na ostateczną, pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kuleszy-Szewczyk. Zastosowana metodyka była prawidłowa i pozwoliła na realizację zadań badawczych

przedstawionych w rozprawie a uzyskane wyniki należy uznać za wartościowe i oryginalne. Wartym podkreślenia jest fakt, że część wyników została już opublikowana w indeksowanym piśmie o zasięgu międzynarodowym.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Magdaleny Kuleszy-Szewczyk oceniam pozytywnie. Praca spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Niniejszym wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Dąb