

RECENZJA PRACY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

magister Magdaleny Kulesza-Szewczyk

pt. „Analiza ekspresji genów zależnych od p53 w rakach jajnika ”

wykonanej pod kierunkiem

dr hab.n. med. Barbary Pieńkowskiej-Grela prof. Inst

w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki

Narodowego Instytutu Onkologii-Państwowego Instytutu Badawczego.

Rak jajnika jest istotną przyczyną zgonów z powodów nowotworowych w populacji kobiet, zwłaszcza rasy kaukaskiej. Polska znajduje się w czołówce krajów o największym współczynniku zachorowalności na raka jajnika (12,7/100tys mieszkańców; 4700 zachorowań w 2020), z szacowaną liczbą zgonów około 3000 pacjentek. Podstępny, bezobjawowy przebieg na wczesnych etapach choroby, brak efektywnych programów przesiewowych oraz trudna diagnostyka nawet zaawansowanych postaci nie sprzyjają poprawie wskaźników epidemiologicznych. Jednym z najważniejszych czynników ryzyka raka jajnika są predyspozycje dziedziczne, u 65-85% chorych związane z mutacjami w obrębie genów BRCA1/BRCA2, ale również MSH2 i MLH1 oraz TP53 i innych.

Magister Magdalena Kulesza-Szewczyk podjęła wartościowe wyzwanie badawcze stawiając za cel realizowanej pracy doktorskiej analizę statusu genu TP53 i jego produktu białka p53 w komórkach raka jajnika, również kontekście ekspresji i transkrypcji genów zależnych od TP53. Doktorantka zaplanowała analizę ich znaczenia klinicznego oraz potencjalnej wartości prognostycznej czy też predykcyjnej.

Praca doktorska ma układ klasyczny, składa się ze 149 stron tekstu wraz z piśmiennictwem. We *Wstępie* Doktorantka przedstawiła stan aktualnej wiedzy na temat epidemiologii, czynników ryzyka, obrazu klinicznego, diagnostyki i leczenia raka jajnika. Wnikliwej analizie poddała zwłaszcza rolę czynników genetycznych, a w szczególności genu TP53 i jego produktu, białka p53 w etiopatogenezie tego nowotworu. Bardzo szczegółowo, w

sposób wskazujący na dogłębną znajomość zagadnienia opisała typy i częstość mutacji genu TP53, a także fizjologię białka p53, w tym jego budowę i regulację stabilności. Doktorantka wiele uwag poświęciła analizie znaczenia mutacji TP53 i/lub akumulacji białka p53 dla patogenezy raka jajnika i innych nowotworów, a w szczególności skutków jego interakcji z innymi białkami regulatorowymi oraz wpływu na ekspresję i transkrypcję genów zależnych od p53 i regulujących procesy komórkowe, takie jak cykl komórkowy, apoptozę oraz naprawę DNA. Wskazała na fakt wysokiej częstości występowania szerokiego spektrum mutacji TP53 w raku jajnika, a więc i pośrednio na kliniczne znaczenie omawianych aberracji. W ten sposób Autorka bardzo dobrze opisała przesłanki do podjęcia pracy, uzasadniając celowość zaplanowanych badań.

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy statusem genu TP53 i statusem białka p53 w komórkach jajnika, a także ocena ich wpływu na poziom transkrypcji genów zależnych od p53 oraz klinicznego znaczenia ich ekspresji. Doktorantka podjęła również wyzwanie jakim była próba identyfikacji nowych markerów molekularnych o potencjalnym znaczeniu prognostycznym i/lub predykcyjnym.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka przedstawiła przyjęte kryteria kwalifikacji materiałów tkankowych pochodzących z 135 guzów nabłonkowatych jajnika. W tej grupie prawidłowa sekwencja TP53 analizowana metodą PCR i sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sanger'a w eksonach 4-11 była obecna jedynie w 18% przebadanych guzów (21/114), natomiast akumulacja białka p53 oceniana metodą immunohistochemiczną w 64% (86/135). Analizę molekularną 31 genów kodujących białka zależne od p53 przeprowadzono na poziomie DNA i RNA metodą ilościowej reakcji PCR oraz sekwencjonowania bezpośredniego. W rozdziale zawarto podkreślić charakterystykę badanej grupy - histopatologiczną i kliniczną. Doktorantka pozyskiwała materiały i dane z dwóch ośrodków: Centrum Onkologii-Instytutu w Warszawie oraz Szpitala Bródnowskiego w Warszawie.

Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem prawidłowo dobranych metod.

Autorka uzyskiwała interesujące z poznawczego punktu widzenia wyniki, które w sposób logiczny i wyczerpujący przedstawiła w 17 tabelach i na 14 wykresach.

W pierwszej części pracy Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała mutacje genu TP53 w badanym materiale nowotworowym, w tym większość (67%) zakwalifikowała jako zmieniające białko (typ ZB) (w tym 97% to substytucje w pojedynczych nukleotydach),

pozostałe jako eliminujące białko (typ EB) (33%) (przeważały zmiany ramki odczytu (55%). W analizowanym materiale dominowały jednonukleotydowe substytucje (77%), a wśród nich mutacje zmiany sensu (84%). Doktorantka potwierdziła też obecność delecji (14%), w większości typu *frameshift* (81%) oraz niewielką liczbę duplikacji (4%) typu *frameshift* i insercji (3%). Pogłębiona analiza genu *TP53* wykazała, że powyższe zmiany występowały zwłaszcza w eksonie 5 (33%) oraz 7 (25%), 8 (25%) i 6 (17%). 28% spośród wykrytych mutacji lokalizowało się w siedmiu kodonach: 175, 176, 220, 242, 248, 282 oraz 273.

Analiza wykazała istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy obecnością mutacji *TP53*, a akumulacją p53 w komórkach ($p < 0,001$), choć w 26% guzów nie potwierdzono akumulacji białka p53 pomimo obecności mutacji. Zjawisko akumulacji p53 obserwowano zwłaszcza w obecności mutacji o typie ZB (100%), dla typu EB jedynie w 21%. Znaczącą trudność w analizie przedstawionych wyników powoduje brak informacji, którym ze wymienionych w metodologii testów przeprowadzono badanie korelacji, brak również danych pozwalających ocenić ich siłę. Podano jedynie wartość liczbową znamienności statystycznych.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę związku mutacji *TP53* lub akumulacji białka p53 z ekspresją 31 genów zależnych. Autorka wykazała statystycznie istotne różnice dla poziomu mRNA niektórych genów regulujących cykl komórkowy: w powiązaniu ze statusem *TP53* dla *CDKN1A*, *KIF23*, *CCNE1*, oraz z akumulacją p53 dla *PLK1*; dla genów regulujących proces apoptozy, w powiązaniu ze statusem *TP53* dla *BBC3* oraz z akumulacją p53 dla *TP73*, *TCEA3*, *TP53INP1*, *AIFM2*, *PIDD1*; dla jednego spośród genów regulujących procesy naprawy DNA – *DDB2* zarówno w powiązaniu z akumulacją białka jak i mutacją genu *TP53*.

W ostatniej części pracy Doktorantka przedstawiła wyniki oceny znaczenia klinicznego ekspresji wytypowanych 31 genów zależnych dla przebiegu raka jajnika: czas całkowitego przeżycia (OS) oraz czas wolny od choroby (DFS). Wykazała związek ekspresji szeregu genów ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia (OS) w całej grupie poddanej analizie, w tym genów regulujących cykl komórkowy *E2F7*, *GPRC5A* i *KIF23*, genów regulujących proces apoptozy *AIFM2* i *TP73*, jednego genu z grupy regulujących procesy naprawy DNA *GADD4A5A* oraz genu *TNRC6A* wytypowanego w mikromacierzach ekspresyjnych (na podstawie wcześniejszych badań własnych zespołu). DFS negatywnie korelował ze zmianami ekspresji w genach regulujących cykl komórkowy *E2F7*, genach regulujących proces apoptozy *AIFM2* i *TCEA3*, genie regulującym procesy naprawy DNA *GADD4A5A* oraz genach *PRICKLE4* i *TNRC6A*.

Dodatkowo przeprowadziła analizę w podziale na podgrupy w zależności od obecności mutacji *TP53* oraz akumulacji p53 w komórkach nowotworowych, wskazując na potencjalne znaczenie prognostyczne w kontekście OS genów *CDK2* w podgrupie bez akumulacji p53 oraz *AIFM2* i *GADD4A5A* w podgrupie z akumulacją p53. W kontekście DFS przeprowadzone analizy wskazały na negatywną wartość wysokiej ekspresji genów *E2F7* i *AIFM2*.

Autorka pokusiła się również o analizę predykcyjnej wartości ekspresji badanych genów zależnych, podobnie jak poprzednio dla całej grupy jak i w podziale na podgrupy. Mam jednak wątpliwości, czy przeprowadzone analizy mają wartość kliniczną, skoro Autorka odnosiła się do wyników terapii *per se* (PS, CR), bez szczegółowych danych dotyczących zastosowanego leczenia w tym grup lekowych.

Pracę podsumowuje ciekawa *Dyskusja* świadcząca o umiejętności krytycznego odniesienia wyników własnych do dostępnych danych naukowych. Autorka oparł swoje rozważania na dobrze dobranym piśmiennictwie liczącym 262 aktualnych publikacji, w zdecydowanej większości aktualnych tekstów z publikatorów międzynarodowych. W tej części pracy Doktorantka bardzo szczegółowo analizowała wyniki własne w kontekście innych publikacji, umiejętnie podkreślając wartość poznawczą swojej pracy. Bardzo doceniam, iż w Swoich rozważaniach wskazała na sposób zabezpieczenia badanego materiału jako potencjalne źródło rozbieżności w wynikach publikowanych badań - ten element jest niestety często pomijany w dyskusjach naukowych. Wskazała też na podobną rolę wykorzystania, lub też nie, metod przesiewowych w badaniach fragmentów genu *TP53*. W kontekście analizy wartości prognostycznej Autorka dokładnie przeanalizowała dostępne dane odnoszące się do genów zidentyfikowanych w trakcie analiz statystycznych, słusznie skupiając się na tych dla których siła powiązania była matematycznie najwyższa ($p \geq 0,01$).

W oparciu o przedstawione wyniki Doktorantka sformułował 3 wniosków i 9 podpunktów bezpośrednio odnoszących się do Celów pracy. Część z nich wydaje się oczywista, jak wskazanie na wysoki odsetek guzów jajnika z mutacją *TP53* (wniosek 1.), równocześnie jednak wyniki analizy wpływu statusu mutacyjnego genu *TP53* i białka p53 na ekspresję niektórych genów zależnych (wniosek 2.) wnoszą ciekawy aspekt poznawczy. Co istotne Autorka wskazuje na „potencjalne” znaczenie rokownicze wskazanych markerów (Wniosek 3.), co potwierdza zrozumienie konieczności potwierdzenia uzyskanych wyników w znacząco liczniejszych grupach pacjentek. Wszystkie wnioski znajdują potwierdzenie w wynikach pracy.

Reasumując, praca doktorska magister Magdaleny Kulesza-Szewczyk podejmuje istotny problem poznawczy. Doktorantka prawidłowo sformułowała jej cele, jak również trafnie dobrała narzędzia badawcze. Wyniki przedstawiła i przedyskutowała w klarowny i wyczerpujący sposób. Na uznanie zasługuje zarówno koncepcja, jak i realizacja projektu badań. Należy podkreślić, że mocną stroną pracy jest staranna edycja, ale zwłaszcza forma literacka i stylistyczna tekstu (za co bardzo dziękuję!).

W moim przekonaniu przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Onkologii –Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 24. października 2022 r.

KIEROWNIK
Zakładu Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

Prof. dr hab. n. med.
Joanna Chrobotowska-Wynimko

