

ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań  
tel. +48/61/657 91 00  
fax +48/61/823 32 35  
e-mail: igcz@man.poznan.pl

[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

dr hab. Maciej Giefing, prof. IGC PAN  
Kierownik Zakładu Genetyki Nowotworów  
e-mail: [maciej.giefing@igcz.poznan.pl](mailto:maciej.giefing@igcz.poznan.pl)

## RECENZJA

### **rozprawy doktorskiej mgra inż. Marcina Machnickiego pt. „Określenie profilu mutacji genetycznych w raku gardła dolnego i raku krtani przy użyciu sekwencjonowania wysokoprzepustowego oraz poszukiwanie nowych zmian o potencjalnym znaczeniu klinicznym”**

Celem rozprawy doktorskiej Pana mgra Marcina Machnickiego było po pierwsze scharakteryzowanie profilu jak i określenie częstości występowania zmian genetycznych w płaskonabłonkowym raku gardła dolnego. Otrzymany profil porównywano do lepiej scharakteryzowanych guzów krtani jak również szerzej, do płaskonabłonkowych guzów w innych lokalizacjach w obrębie głowy i szyi. Jako drugi zasadniczy cel rozprawy Doktorant obrał funkcjonalne wykazanie konsekwencji mutacji inaktywujących w genie *KMT2C* w HPV ujemnym modelu komórkowym raka gardła dolnego – FaDu. Doktorant stawia ciekawą hipotezę badawczą, mianowicie, że gen *KMT2C* jest dotychczas słabo poznanym w kontekście patogenezy płaskonabłonkowych raków gardła dolnego genem supresji nowotworowej. Hipoteza oparta jest o wyniki własne uzyskane w pierwszym etapie badań a także o liczne dane literaturowe potwierdzające znaczenie uszkodzeń tego genu w innych nowotworach. Rzeczywiście dotychczasowe wyniki badań wysokoprzepustowych guzów głowy i szyi innych lokalizacji niż gardło dolne sugerowały dużo niższą częstość uszkodzeń inaktywujących w obrębie tego genu. Odpowiednio 8% w połączonych cytowanych zbiorach obejmujących 595 chorych z guzem o innej lokalizacji w stosunku do 23% w przypadku guzów z lokalizacją w gardle dolnym. Tym samym podjęcie badań funkcjonalnych nad znaczeniem uszkodzeń genu *KMT2C* jest w pełni uzasadnione. Tego typu badania nie tylko poszerzają ogólną wiedzę z dziedziny genetyki nowotworów ale co istotne mogą dostarczyć nowych informacji o potencjalnym zastosowaniu w praktyce klinicznej. Wybór przedmiotu

badań jest też niewątpliwie trafny z przyczyn epidemiologicznych. Jak słusznie zauważa Doktorant, w grupie nowotworów głowy i szyi, guzy zlokalizowane w gardle dolnym cechują się najgorszym 5-letnim przeżyciem poniżej 25%. Szkoda jedynie, że Doktorant nie skupił się wyłącznie na analizie słabiej poznanych nowotworów gardła dolnego. Analiza celowana wybranego panelu genów w względnie małej grupie 25 pacjentów z rakiem krtani jest elementem odtwórczym tej rozprawy i nie wnosi nic do obecnego stanu wiedzy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy osiemdziesiąt osiem stron i posiada standardowy układ rozdziałów dla prac naukowych w tym wstęp dobrze charakteryzujący stan wiedzy a także założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i obszerny spis cytowanej literatury zawierający 166 pozycji. Ponadto rozprawa opatrzona jest w starannie przygotowany spis treści, wykaz skrótów a także spis rycin i tabel co znacznie ułatwia czytelnikowi nawigowanie po rozdziałach rozprawy. Chciałbym przez chwilę zatrzymać się na bibliografii podanej w rozprawie. Jest ona niewątpliwie aktualna, większość cytowanych publikacji została opublikowana w minionych kilku latach. Odniosłem jednak wrażenie, że jeśli chodzi o publikacje traktujące o zmianach genetycznych guzów głowy i szyi spis ten zawiera w ogromnej przewadze wyniki uzyskane w badaniach wysokoprzepustowych, pomijając tym samym liczne i bardzo znaczące wyniki dotyczące uszkodzeń genów w rakach głowy i szyi uzyskane przed wprowadzeniem tej techniki. W pewien sposób smutny jest także fakt, że młodzi adepci nauki nie dostrzegają osiągnięć polskich ośrodków naukowych w tym obszarze. Rozprawa nie zawiera ani jednego cytowania takich mistrzów jak Profesorowie Szyfterowie czy Profesor Sasiadek zajmujących się tą tematyką. Na kolejnych stronach recenzji omówię kolejno rozdziały rozprawy.

Wstęp rozprawy jest przygotowany bardzo precyzyjnie pod względem redakcyjnym i napisany dobrą polszczyzną. Autorowi udało się uniknąć literówek czy błędów stylistycznych co zasługuje na uznanie. W obszarze merytorycznym wstęp również jest przygotowany bardzo dobrze. Zwięźle przedstawia stan wiedzy i zachowuje dobrą równowagę pomiędzy opisaniem ogólnego tła choroby jak i bardziej precyzyjnego opisu zagadnień molekularnych, ściślej powiązanych z tematyką rozprawy takich jak patogenezę molekularną choroby czy znaczenie uszkodzeń metylotransferaz w rakach głowy i szyi. Do gustu przypadła mi także dobra charakterystyka podejść terapeutycznych wprowadzonych w minionych latach w oparciu o najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej jak i charakterystyka deregulowanych szlaków sygnałowych.

Jako dla osoby wywodzącej się z grupy molekularno-cytogenetycznej, we wstępie rozprawy, przy opisie genów zabrakło mi jednak kilku istotnych informacji takich jak

dokładnej pozycji fizycznej omawianego w danym miejscu genu zgodnie z bazą hg19 lub hg38 oraz informacji o lokalizacji chromosomowej badanego genu. Do drobnych uwag dotyczących tego rozdziału chciałbym wymienić ponadto nie uwzględnienie roli genów *PTPRD*, *PCDH17* czy *RBI* w opisie zmian molekularnych istotnych dla tej grupy nowotworów. Ponadto zwróciłem uwagę na nieścisłość w opisie nowych markerów na stronie 18 rozprawy, z którego wynika, że płynna biopsja ogranicza się jedynie do analizy krążących komórek nowotworowych co nie jest zgodne z prawdą. Podsumowując recenzję tej części rozprawy stwierdzam, że pomimo drobnych wymienionych uchybień jest ona napisana dobrze i odpowiednio spełnia swoją rolę jaką jest wprowadzenie czytelnika w zagadnienie i omówienie aktualnego stanu wiedzy.

Założenia i cele pracy są przedstawione w sposób zwięzły i klarowny. Nie mam uwag do tej części rozprawy z wyjątkiem zastrzeżenia o którym pisałem już wcześniej, że profil mutacji genetycznych guzów krtani jest znany blisko od dekady od czasu publikacji dużych zbiorów wyników analiz wysokoprzepustowych. Stąd elementy celu pierwszego dotyczące raka krtani uważam za odtwórcze.

Materiały i Metody. Zakres badań w ramach pracy doktorskiej obejmował analizę 23 guzów gardła dolnego oraz 25 guzów krtani. Obecność komórek nowotworowych w analizowanych próbkach została, zgodnie ze sztuką, potwierdzona przez histopatologa a lokalna komisja bioetyczna wydała stosowną zgodę na prowadzenie badań. Niestety tylko od 13 pacjentów uzyskano krew obwodową służącą jako kontrola co znacznie utrudniło określenie czy badane zmiany mają charakter germinalny czy somatyczny.

Omawiany rozdział zawiera szereg starannie przygotowanych tabel porządkujących przedstawiane dane. Ponadto, przeprowadzone procedury badawcze są precyzyjnie opisane, zgodnie z wymogami stawianymi tego typu rozprawom. Zabrakło mi jednak kilku informacji w tym bliższej charakterystyki pozycji fizycznej w genomie sekwencjonowanego fragmentu promotora genu *TERT* (strony 36-37 rozprawy), brakuje tu też odpowiedniej ryciny; jestem również ciekawy kto jest autorem skryptu w języku Python służącego do przygotowania ryciny 6A (strona 43), czy był nim Doktorant?; brakuje także informacji jakie było stosowane stężenie surowicy w hodowlach komórkowych (strona 46). Ponadto sama rycina 6 zamieszczona na stronie 43 rozprawy jest według mnie mało czytelna. Z wykresu nie wynika, które fragmenty genomu Doktorant uznał ostatecznie za LOH rozumianej jako duplikacji bez zmiany kopii. Czy stosowane podejście uwzględnia ploidię danej próbki, która może wprowadzać wyniki fałszywie dodatnie w określeniu LOH? Zawarty opis ryciny nie jest w tej kwestii pomocny. Wymienione uchybienia nie są jednak dużej wagi.

Przechodząc do omawiania części rozprawy poświęconej wynikom chciałbym podkreślić najciekawsze rezultaty części pierwszej rozprawy poświęconej poszukiwaniu mutacji w rakach krtani i gardła dolnego. Doktorant zidentyfikował istotne statystycznie różnice w częstości mutacji genów *CASP8*, *HRAS*, które w rakach gardła dolnego występowały istotnie rzadziej niż w innych lokalizacjach głowy i szyi oraz różnice w częstości mutacji genu *KMT2C*, które występowały istotnie częściej w rakach gardła dolnego. Tego typu wyniki przyczyniają się do lepszego poznania tła genetycznego podtypów nowotworów głowy i szyi, co wraz z rozwojem terapii celowanych daje nadzieję na lepsze dopasowanie terapii do pacjenta a mówiąc bardziej precyzyjnie, do profilu genetycznego danego guza. Omawiane wyniki są w bardzo przejrzysty i intuicyjny sposób zwizualizowane na rycinie 13B.

W dalszej części recenzowanej rozprawy znalazłem jednak poważne błędy w przygotowaniu jak i planowaniu eksperymentów w oparciu o technikę edycji genomu CRISPR/Cas9, które dotyczą zarówno rozdziału „Materiały i metody” jak i „Wyniki”. Rozprawa jest pozbawiona kluczowych etapów walidacji takich jak analiza elektroforetyczna oraz sekwencjonowanie plazmidu pLenti CRISPR v2 zawierającego wklonowane oligonukleotydy po wyizolowaniu plazmidu z bakterii *E. coli* (strona 47 rozprawy). Nie sprawdzono tym samym, czy otrzymane plazmidy nie posiadają mutacji mogących zaburzyć ich funkcjonowanie. Na żadnym etapie rozprawy nie sprawdzono także czy gen *KMT2C* w ogóle ulega ekspresji w linii komórkowej FaDu, w której przeprowadza się inaktywację. W przypadku braku ekspresji danego genu cała dalsza praca badawcza jest zwyczajnie pozbawiona sensu. Doktorant zdaje się nie zauważać konieczności sprawdzenia ekspresji genu na poziomie zarówno RNA jak i białka przed jak i po przeprowadzonej edycji genomu. W żaden sposób nie omawia również tej kwestii w dyskusji rozprawy. Skupienie się tylko na potwierdzeniu wprowadzonych zmian na poziomie DNA poprzez dodatkowe sekwencjonowanie Sangera czy NGS, jakkolwiek ciekawe, jest absolutnie niewystarczające. A i ta analiza jest niepełna ponieważ Doktorant nie zamieścił w rozprawie elektroferogramów z sekwencjonowania Sangera miejsca wprowadzonych zmian w linii FaDu. Elegancką procedurą w tego typu badaniach jest klonowanie danych produktów PCR i przedstawienie elektroferogramów obrazujących wszystkie wprowadzone zmiany. Co więcej, otwartym pozostaje pytanie czy edytowane komórki wykorzystane w badaniach funkcjonalnych posiadają mutację homo- czy heterozygotyczną genu *KMT2C*. Jest to tym istotniejsze, że nie przeprowadzono chociażby prostej analizy FISH, która wskazałaby liczbę kopii genu *KMT2C* w badanej linii komórkowej. Nie wiadomo także, czy zmiany wprowadzone „*in-frame*”, a

takie widnieją w klonach sg2-7, są zmianami rzeczywiście inaktywującymi. Omówione błędy są największą słabością recenzowanej rozprawy, które znacznie moim zdaniem umniejszają jej ocenę.

Niemniej jednak dalsze wyniki funkcjonalne przeprowadzone po domniemanej inaktywacji genu *KMT2C* są interesujące. Obserwowany kilkukrotny wzrost klonogenności komórek linii FaDu może rzeczywiście sugerować istotną funkcję supresorową badanego genu. Podobny wniosek można wysnuć analizując eksperyment badający tempo syntezy DNA. Jest to wynik o potencjalnie dużym znaczeniu dla zrozumienia biologii tej grupy nowotworów. Należy jednak pamiętać, że równie dobrze możemy mieć do czynienia z bliżej nie określonym efektem typu *off-target* lub tłem genetycznym danej linii komórkowej. Dlatego tego typu badania powinny być przeprowadzane na większej liczbie linii komórkowych i zawierać niezbędne etapy walidacji. Szkoda także, że Doktorant nie pokusił się o przeprowadzenie eksperymentu kontrolnego poprzez transdukcję edytowanej linii komórkowej konstruktem ekspresyjnym z genem *KMT2C*. Ponowne włączenie ekspresji badanego genu powinno, zakładając że hipoteza badawcza jest trafna, odwrócić efekt wzmożonej klonogenności udowadniając tym samym funkcję genu supresorowego *KMT2C*.

W recenzowanej rozprawie zabrakło także analizy poziomu metylacji DNA regionu okołopromotorowego badanego genu w rakach głowy i szyi zlokalizowanych w gardle dolnym i krtani. Doktorant kilkukrotnie zwraca uwagę na znaczenie tego mechanizmu inaktywacji genów w patomechanizmie dotyczącym *KMT2C* w nowotworach. Ponadto lokalizacja kilku wysp CpG w pobliżu TSS genu sugeruje udział mechanizmu epigenetycznego w jego regulacji. Tym bardziej nie podjęcie tego typu badań w trakcie realizacji pracy doktorskiej jest dla mnie niezrozumiałe. Do drobnych uwag zaliczam także nieściśle sformułowanie na stronie 61 rozprawy „(...) za pomocą techniki CRISPR-Cas9 wyindukowano mutacje insercji-delecji w N-końcowej części sekwencji kodującej ten gen.” Sekwencje kodujące nie posiadają sekwencji N-końcowych, mowa tu zapewne o końcu N białka kodowanego przez gen *KMT2C*. Chciałbym również podkreślić, że część rozprawy opisująca wyniki jest przygotowana niezwykle starannie pod względem redakcyjnym. Załączone ryciny są czytelne i dobrze obrazują wyniki eksperymentalne.

Całość rozprawy kończy dziewięć-stronnicowa dyskusja oraz wnioski. W dyskusji, Doktorant prawidłowo konfrontuje otrzymane wyniki z danymi literaturowymi. Szczególnie przypadł mi do gustu fragment na stronach 72 i 73 rozprawy traktujący o różnych niuansach funkcjonowania białka *KMT2C*. Bardzo ciekawe są także rozważania na temat konsekwencji mutacji *KMT2C* w zależności od lokalizacji mutacji w danej domenie funkcjonalnej białka.

Zgadzam się z doktorantem, że szerokie spektrum obserwowanych mutacji sugeruje występowanie swoistych klas mutacji mogących wywoływać różne efekty biologiczne w różnych nowotworach. Dobór literatury cytowanej w tej części rozprawy jest trafny a cytowane prace aktualne.

Wnioski płynące z przeprowadzonych badań zostały zebrane w czterech punktach, które dobrze korespondują założeniami i celami postawionymi na wstępie rozprawy. Ujmują one poprawnie uzyskane wyniki choć są sformułowane czasem zbyt ogólnie. Np. we wniosku nr 2 Doktorant podsumowuje, że „(...) stwierdzono liczne zmiany genetyczne możliwe do wykorzystania w klinice (...)”, natomiast we wniosku nr 3 „Wykorzystana w badaniu metodyka pozwoliła jednak na stwierdzenie pewnych różnic w częstości występowania niektórych zmian genetycznych.”. Sądzę że podanie konkretnych przykładów odpowiednio zmian genetycznych możliwych do wykorzystania w klinice czy wyliczenie zmian genetycznych różnicujących raki gardła dolnego od raków z innych lokalizacji znacznie wzbogaciłoby wnioski.

Podsumowując, mgr Marcin Machnicki przygotował dobrze zredagowaną rozprawę doktorską, opatrzoną z drobnymi wyjątkami bardzo dobrze przygotowanymi rycinami oraz, co istotne, opartą o badania przeprowadzone nowoczesnymi technikami laboratoryjnymi. Chciałbym podkreślić, że wyniki funkcjonalne uzyskane dla genu *KMT2C* mogą dostarczyć istotnych i nowatorskich informacji o znaczeniu tego genu w patogenezie płaskonabłonkowego raka gardła dolnego. Choć moim zdaniem, wniosek ten będzie uprawniony dopiero po wykazaniu, że model komórkowy, w tym przypadku linia FaDu rzeczywiście charakteryzuje się ekspresją badanego genu a przeprowadzona edycja genomu skutkuje jego inaktywacją. Tym samym, stwierdzam ponownie, że Doktorant nie ustrzegł się poważnych błędów, na etapie projektowania i planowania opisanych badań co znacznie obniża moją ocenę rozprawy.

Ważąc jednak zalety jak i wady rozprawy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgra Marcina Machnickiego spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Maciej Giefing

KIEROWNIK  
Zakładu Genetyki Nowotworów

prof. nadzw. dr hab. Maciej Giefing