

Akceptuję  
H. J.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr 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”.**

Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi to grupa chorób nowotworowych, która ciągle stanowi wyzwanie dla terapii zwłaszcza z powodu niewielu dostępnych markerów molekularnych oraz celów dla terapii ukierunkowanych molekularnie. Raki wywodzące się z gardła dolnego są najgorzej rokującą grupą nowotworów tego rejonu, a zarazem są najsłabiej poznaną na poziomie badań molekularnych. W związku z powyższym temat pracy doktorskiej jaki wybrał Doktorant jest wielce uzasadniony. Celem niniejszej pracy było poznanie podłoża molekularnego 23 próbek raków gardła dolnego i 25 próbek raków krtani z wykorzystaniem NGS (WES i panele genowe). Profile mutacji uzyskane przez Doktoranta są podobne do już opublikowanych. Mutacje najczęściej występowały w *TP53*, *FAT1*, *NOTCH1*, *KMT2C*, *CDKN2A* i *KMT2D*, natomiast najczęstszymi zmianami liczby kopii były amplifikacje *CCND1* oraz delecje *CDKN2A/B*. Istotnym praktycznym odkryciem jest fakt, że w 75% analizowanych guzów uzyskanie wyników pozwalają na zaproponowanie potencjalnej terapii ukierunkowanej molekularnie blokującej szlaki związane z regulacją cyklu komórkowego, naprawą DNA, MAPK i PI3K. Doktorant wykorzystał również już opublikowane dane (67 raków gardła dolnego i 595 innych raków głowy i szyi) dla porównania profili mutacji 18 analizowanych genów i nie wykrył, żadnych znaczących różnic pomiędzy tymi dwoma grupami z wyjątkiem *CASP8* i *HRAS*. Wykryta przez Doktoranta wysoka częstość mutacji inaktywujących w genie *KMT2C* w badanych próbkach oraz brak wiedzy na temat roli tych mutacji w badanych nowotworach zachęciła Doktoranta do dodatkowych bardzo nowoczesnych badań, z wykorzystaniem modelu komórkowego (linia FaDu wyprowadzona z przypadku raka gardła dolnego) poprzez wprowadzanie mutacji w genie *KMT2C* z wykorzystaniem metody CRISPR-Cas9. Doktorant wykazał, że obecność mutacji w genie *KMT2C* zwiększa zdolność tworzenia kolonii oraz tempo proliferacji komórek, co wskazuje na jego właściwości supresorowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 87 stron oraz jedna strona zawierająca zgodę komisji bioetycznej. Ma budowę typową dla tego typu prac. Tekst uzupełniają oraz wzbogacają 12 tabel i 18 rycin. Piśmiennictwo liczy 166 pozycji!

## **Streszczenie**

W streszczeniu doktorant używa skrótów RTK/RAS/ERK i PI3K, które nie mają wytłumaczenia w wykazie skrótów. Jest oczywiście RTK. Zamiast RTK/RAS/ERK powinien być używany skrót MAPK (Kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinases) i wytłumaczony w wykazie skrótów. RTK aktywuje dwa główne szlaki w komórce (MAPK i PIK3) w nowotworzeniu.

## **WYKAZ SKRÓTÓW**

Powinien być dodany skrót MAPK i wytłumaczony

## **WSTĘP**

Wstęp rozpoczyna bardzo dobry i zwięzły opis stosowanych metod w leczeniu nowotworów głowy i szyi tj. leczenia chirurgicznego, chemioterapii i radioterapii. Doktorant sygnalizuje również, że wybór schematu leczenia również zależy mocno od spodziewanej jakości życia chorego po przeprowadzonym leczeniu. Następnie Doktorant omawia epidemiologię badanych w dysertacji nowotworów. I tak średnie 5-letnie przeżycia w Europie Północnej w porównaniu do Wschodniej jest prawie dwukrotnie wyższe (46,5% vs. 26,7%). Dodatkowo o czym wspomina Doktorant zachorowania na nowotwory głowy i szyi wiążą się również z najwyższym odsetkiem samobójstw spowodowanych obniżeniem jakości życia samą chorobą oraz konsekwencją leczenia. Podrozdział kończy opis częstości występowania oraz 5-letnich przeżyć w zależności od lokalizacji nowotworu. Raki gardła dolnego są jednym z najrzadziej rozpoznawanych ale niestety charakteryzuje, że najniższy odsetek 5-letnich przeżyć.

W kolejnym podrozdziale Doktorant omawia czynniki ryzyka mające wpływ na zachorowania na nowotwory głowy i szyi takie jak spożywanie alkoholu, palenie papierosów oraz zwiększający się wpływ infekcji HPV ze względu na zmiany obyczajowe. W innych rejonach świata (część Azji oraz Pacyfiku) żucie betelu czy infekcja EBV ma również wpływ na zwiększoną częstość raków głowy i szyi. Również Doktorant sygnalizuje wpływ azbestu, pyłów drzewnych, niektórych związków chemicznych, izotopów mających wpływ na zachorowania na te nowotwory. Następnie Doktorant płynnie przechodzi do omówienia markerów molekularnych. Na wstępie zaznacza brak molekularnych markerów dla stratyfikacji i leczenia nowotworów tego regionu. Wyjątek stanowi infekcja HPV, która stanowi czynnik

ryzyka zachorowania ale również marker dobrej prognozy raków ustnej części gardła. Raki ustnej części gardła powstałe na bazie infekcji HPV mają odmienny profil mutacji (np. bardzo rzadko występują mutacje w TP53). Status HPV w innych lokalizacjach regionu głowy i szyi nie ma takiego znaczenia prognostycznego w wyniku rzadszego nawet 5x występowania infekcji tym wirusem. Doktorant słusznie zauważa, że samo wykrycie obecności materiału genetycznego HPV nie świadczy o roli infekcji w rozwoju danego nowotworu, który może stymulować inny karcynogen. W związku z tym stosuje się metody IHC wykrywające białka wirusa jak np. p16 jako ekwiwalent infekcji HPV. Wymienia również intensywnie badany EGFR, czy PD-L1 z TMB jako marker dla immunoterapii (inhibitory punktów kontrolnych).

Doktorant zwięźle omawia leczenie, które opiera się o chirurgię, radioterapię oraz chemioterapię, głównie opartą o związki platyny oraz terapię celowaną anty-EGFR (cetuksymab). Dalej przedstawia wyniki badań klinicznych innych leków ukierunkowanych molekularnie na inne RTK, o składniki szlaków MAPK, PI3K oraz regulatory cyklu komórkowego (np. CDK4/6) o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów głowy i szyi. Omawia również dopuszczoną przez FDA immunoterapię (anty -PD-1L/PD-1) oraz możliwość zastosowania tkankowo agnostycznego leczenia, czyli inhibitorów TRK. Podrozdział kończy konkluzja o potrzebie poszukiwania molekularnych markerów w podtypach raka głowy i szyi dla lepszej stratyfikacji dla terapii celowanych oraz poszukiwania nowych celów.

W kolejnym akapicie Doktorant wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z profilami mutacji guzów rozwijających się w regionie głowy i szyi uzyskanymi dzięki wprowadzeniu techniki NGS. Podsumowuje, że zmiany w rakach głowy i szyi dotyczą głównie inaktywacji genów supresorowych w szlakach MAPK, PI3K, Wnt/beta-kateniny. Następnie kolejno omawia geny kodujące białka regulujące cykl komórkowy (*TP53*, *CDKN2A*, *CCND1*) oraz częstości mutacji w ww. genach z zależności od obecności infekcji HPV. Potem Doktorant opisuje zaburzenia działania szlaku sygnalizacyjnego Notch w raku głowy i szyi. Dyskutuje różne typy mutacji w genie *NOTCH* (14-19%) obecnych w chorobach hematologicznych w porównaniu do raków głowy i szyi konkludując, że w białaczkach produkt białkowy genu *NOTCH* pełni rolę onkogenu a w przypadku raków odgrywa rolę suppresora nowotworowego. Rolę białka NOTCH w kancerogenezie raka głowy i szyi również potwierdza obecność mutacji w *FBXW7* u 5% chorych, który odpowiada za degradację wewnątrzkomórkowej domeny NOTCH. Generalnie zaburzenia funkcjonowania szlaku NOTCH obserwuje się w 2/3 raków głowy i szyi co skłoniło Doktoranta do słusznej konkluzji dotyczącej rozwijania badań nad deregulacją aktywności tego szlaku jak potencjalnych form terapii.

Dalej Doktorant przechodzi do omówienia roli białka FAT1. Mutacje oraz CNV w genie *FAT1* występują w około 30% raków głowy i szyi, który ma działa jako supresor, uczestniczący m.in. w regulacji sygnalizacji przez szlaki Wnt/ $\beta$ -kateniny (degraduje  $\beta$ -kateninę) oraz Hippo (aktywacja Hippo powoduje hamowanie białek YAP1 i TAZ). Doktorant wskazuje również, że utrata FAT1 aktywuje EMT co wzmacnia zdolność do inwazji oraz tworzenia przerzutów odległych. Doktorant opisuje również białko AJUBA, które ma podobne funkcje do FAT1 regulując szlaki WNT i Hippo. W kolejnym akapicie Doktorant przeprowadza syntezę wyżej opisanych zmian z wykorzystaniem portalu CBioPortal, która prowadzi do wniosku, że szlak Wnt/ $\beta$ -kateniny ulega zaburzeniom w 37,3% nowotworów.

W następnym podrozdziale Doktorant opisuje deregulacje szlaku PI3K/Akt/mTOR będącą głównie rezultatem mutacji i amplifikacji genu *PIK3CA*. Następnie Doktorant omawia aktywację receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK – EGFR, HER2 i inne) oraz omówienie szlaku MAPK w postaci deregulacji białek RAS, BRAF czy ERK2. Łącznie wg. analizy Doktoranta zaburzenia na poziomie RTK i MAPK występują w około 50% chorych na raka głowy i szyi.

W kolejnym podrozdziale Doktorant na bazie TCGA z wykorzystaniem portalu cBioPortal analizuje częstość mutacji w genach kodujących białka uczestniczące w naprawie DNA. Sumarycznie około 9,5% przypadków ma mutacje w następujących genach: *ATM*, *CHEK2*, *BRCA2*, *MRE11*, *MSH3*, *MLH1* i *RAD50*. Obecność mutacji Doktorant wiąże za potencjalnym zastosowaniem PARPi terapii tych nowotworów.

Następnie Doktorant szczegółowo opisuje mutacje w genach odpowiedzialnych za regulację epigenetyczną. Zwłaszcza wskazuje na duże znaczenie mutacji występujących w genach metylotransferaz *KMT2A*, *KMT2B*, *EZH2* i *SETD2*. Szczegółowo opisuje wpływ mutacji w ww. genach mających związek z ryzykiem rozwoju dziedzicznych zespołów jak np. Zespół Kabuki związany z ze zmianami w genie *KMT2D* jak również chorób nowotworowych (także w rakach płaskonabłonkowych) w przypadku obecności mutacji somatycznych. Trzeba tutaj nadmienić, że zawiłość epigenetyki w nowotworzeniu dobrze ilustruje zgrabne zdanie zredagowane przez Doktoranta „*Aktywność metylotransferaz histonów w warunkach fizjologicznych podlega więc ścisłej regulacji, a spektrum konsekwencji zaburzenia tej równowagi jest bardzo szerokie, pomimo że między poszczególnymi metylotransferazami występuje homologia, podobieństwo strukturalne i istotna redundancja funkcjonalna (81).*” Dalej wskazuje na duże znaczenie mutacji genu *NSD1* (metylotransferaza histonu H3 uczestnicząca w mono- i dimetylacji lizyny 36) występujących w 10% przypadków raków głowy i szyi. Mutacje w *NSD1* wraz z mutacjami w genie kodującym H3 mają znaczenie w

tworzeniu charakterystycznego profilu hypometylacji DNA. Powoduje to powstawanie globalnych zmian ekspresji w genomie nowotworowym.

Doktorant wskazuje na słabiej poznaną rolę mutacji w genach metylotransferaz *KMT2D* (*MLL2*) i *KMT2C* (*MLL3*) w raku głowy i szyi. Białka *KMT2C* i *KMT2D* odpowiadają głównie za monometylację H3K4 (H3K4me1). Doktorant wskazuje, na różnorodne funkcje ww. białek oraz przytacza wyniki badań wykonanych na liniach komórkowych wywodzących się z raków głowy i szyi, które wskazują na większą wrażliwość komórek z mutacjami *KMT2D* na inhibitory kinaz Aurora. Doktorant artykułuje, że tego typu zaawansowanych badań podstawowych nie wykonano dla *KMT2C* na komórkach nowotworowych wywodzących się z raków głowy i szyi. Następnie Doktorant omawia różnice profili genetycznych w guzach HPV+ i HPV-. Mutacje w następujących genach: *TP53*, *CDKN2A*, *KMT2D*, *NSD1*, *DDR2*, *CUL3* dominują w grupie HPV-, a w genach *DDX3X*, *FGFR2*, *FGFR3*, *NF1*, *KRAS* były charakterystyczne dla HPV+. Dalej Doktorant wskazuje na duże delecje i amplifikacje genów regulujących cykl komórkowy (*CDKN2A* i *CCND1*), odmienną częstość mutacji w RTK (*EGFR*, *HER2*, *FGFR1-3*) oraz w genach naprawy DNA pomiędzy rakami HPV+ a HPV-. Zauważa, że w grupie HPV+ obserwuje się obecność sygnatury mutacyjnej APOBEC, związanej z indukcją deaminazy cytydyny (substytucjami C > G i C > T w sekwencjach trinukleotydowych TpCpN). Natomiast w rakach HPV+ występuje sygnatura mutacyjna związana z paleniem tytoniu (substytucja C>T). Konkluduje, że różnice pomiędzy guzami o różnym statusie infekcji mogą być wykorzystane w przyszłości jako racjonalna podstawa dla terapii celowanych. W następnym rozdziale Doktorant zwięźle omawia podtypy molekularne (podstawny, mezenchymalny, klasyczny) raków głowy i szyi wyróżnione na podstawie wysokoprzepustowych badań ekspresji genów. Wskazuje, że dalsze badania wyróżniły jeszcze podtyp atypowy, oraz mezenchymalny – HPV+ oraz klasyczny-HPV+. Doktorant wskazuje, że typy mogą mieć znaczenie predykcyjne dla immunoterapii (np. podtyp mezenchymalny). Na koniec rozdziału Doktorant zauważa, że raki głowy i szyi to bardzo heterogenna grupa nowotworów pod względem molekularnym, która zależy od miejsca pochodzenia nowotworu (jama ustna, krtań, gardło).

W końcowej części wstępu Doktorant krytycznie omawia obecny stan wiedzy dotyczący raków głowy i szyi. Wskazuje na bardzo dużą dysproporcję intensyfikacji badań wielkoskalowych dotyczących nowotworów wywodzących się z różnych lokalizacji tego regionu oraz o różnym statusie HPV, w tym małej grupy zanalizowanych raków wywodzących się z gardła dolnego. Wstęp Doktorant kończy stwierdzeniem, że wielopoziomowa

różnorodność (lokalizacja guza pierwotnego oraz status HPV) wskazują na potrzebę kontynuacji badań oraz uzasadniają podjęcie przedstawianych w niniejszej dysertacji badań.

Ogólnie rzecz ujmując Wstęp jest napisany dobrze i logicznie wprowadza czytelnika w zagadnienie i świadczy o kompleksowej znajomości zagadnienia przez Doktoranta. Jednakże sumaryczna objętość tego rozdziału mogłaby być o 30% mniejsza. Dodatkowo odczuwa się brak ryciny schematycznej obejmującej wszystkie wymienione szlaki oraz zaburzenia dla śledzenia toku rozumowania Doktoranta oraz wzajemne relacje szlaków.

## **CEL PRACY**

Cel pracy doktorskiej jest bardzo jasno przedstawiony w postaci czterech punktów.

## **MATERIAŁ I METODY**

Materiał badawczy został pozyskany w oparciu o akceptacje odpowiedniej dla UM komisji bioetycznej. Materiał gromadzono świeży (badanie śródoperacyjne lub biopsja) z wyjątkiem jednego przypadku, w którym użyto materiału z bloczka. Od 13 chorych zgromadzono również próbkę krwi obwodowej jako kontrolę. Dane kliniczne oraz histopatologiczne zgromadzonego materiału Doktorant przedstawia w postaci tabeli. Następnie Doktorant szczegółowo opisuje metodykę postępowania z materiałem, izolacji DNA. W następnym podrozdziale opisuje metodykę detekcji DNA HPV. Brak jest niestety informacji czy w reakcji stosowano kontrolę pozytywną (próbki izolatu DNA z tkanki nowotworowej zawierającą DNA HPV) w celu wykluczenia wyników FP. Kolejno opisuje metodykę genotypowania mutacji TERT. W dalszej części rozdziału Doktorant szczegółowo omawia metodologię oraz analizę danych NGS, oraz pozyskiwanie danych zewnętrznych.

Na następnych stronach Doktorant szczegółowo opisuje hodowle linii komórkowych (FaDu i HEK293T) wykorzystanych do badań in vitro z udziałem techniki CRISPR. Nowoczesną technikę CRISPR Doktorant zastosował do indukowania mutacji w egzonach 3 i 12 genu *KMT2C*. Następnie Doktorant prowadzi czytelnika przez badanie klonogenności oraz badania szybkości syntezy DNA w zmodyfikowanych techniką CRISPR (mutacje w *KMT2C*) komórkach FaDu. Rozdział metodologii kończy opis badania wrażliwości zmodyfikowanych komórek FaDu na cisplatynę oraz opis metodologii wykorzystanej do analizy wyników z eksperymentów in vitro.

Metodologia jest napisana bardzo dokładnie i logicznie co świadczy o poprawnie zaplanowanej i przeprowadzonej pracy laboratoryjnej oraz obrazuje bardzo duży wysiłek Doktoranta włożony w wykonanie niniejszej pracy. W tym przypadku również Doktorant mógł rozważyć przygotowanie schematycznej ryciny przedstawiającej uwzględnione dane z NGS i podjętych badań oraz analiz, zwłaszcza że został wykorzystany cały wachlarz technik i programów komputerowych.

## WYNIKI

Doktorant na początku opisuje mutacje wykryte w 37 genach najczęściej zmutowanych w rakach głowy i szyi. W 32 genach wykryto mutacje patogenne lub prawdopodobnie patogenne, a najczęściej były obecne *TP53*, *FAT1*, *NOTCH1*, *KMT2C*, *CDKN2A* i *KMT2D*. Wszystkie ww. geny ulegały mutacjom inaktywującym w tym najczęściej *TP53*, który w większości przypadków wykazywał bialleliczną inaktywację (mutacje + LOH). Co ciekawe bialleliczną delecję w genie *CDKN2A* obserwowano u ponad 20% chorych.

W ostatnim zdaniu pierwszego akapitu jest obecna jedna drobna literówka powinna być litera „o” zamiast „u” „mogącej świadczyć u wystąpieniu duplikacji bez zmiany”

Następnie Doktorant omawia wyniki zmian liczby kopii porównując swoją kohortę (WUM) z kohortą TCGA. Generalnie Doktorant stwierdza na podstawie wyników, że następujące geny często podlegały zmianom liczby kopii (amplifikacje: *ERBB2*, *BIRC2/3*, *EGFR* i *CCND1* oraz delecje: *CDKN2A*, *FAT1* i *PTEN*). Wśród zamplifikowanych genów jest gen *ERBB2* kodujący receptor HER2. Potwierdzenie ekspresji białka HER2 metodą IHC na preparatach FFPE byłoby ciekawym dodatkiem z potencjałem terapeutycznym (Trastuzumab, TKI HER2, czy intensywnie prowadzone badania nad terapią CART anty HER2 (Cancer Res (2019) 79 (13\_Supplement): 574. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-574>)

Doktorant następnie opisuje zmiany genetyczne (mutacje kilkunukleotydowe + CNV) w genach odpowiedzialnych za naprawę DNA.

W ostatnim akapicie Doktorant zauważa obecność mutacji w genach często mutowanych w chorobach hematologicznych (*CREBBP*, *ASXL1*, *TET2*). Dwa geny tj. *ASXL1* oraz *TET2* to geny związane z klonalną hematopoezą. Nasuwa się pytanie czy był w tych przypadkach obfity naciek limfoidalny? Jaka była AF ww. mutacji?

Uzyskane wyniki następnie Doktorant analizował pod względem potencjalnego znaczenia klinicznego. Wśród badanej kohorty dwa przypadki (4%) wykazywały amplifikacje genu *ERBB2*. Potencjalne implikacje terapeutyczne wskazano powyżej.

W kolejnym podrozdziale Doktorant omawia mutacje o małej skali wykryte w 18 genach które najczęściej ulegają mutacjom w rakach głowy i szyi. Przygotowuje porównanie mutacji występujących w rakach gardła dolnego w porównaniu do innych lokalizacji. I tak w genach *CASP8* oraz *HRAS* mutacje występują bardzo rzadko lub w wcale w rakach gardła dolnego w porównaniu do innych lokalizacji. Dodatkowo Doktorant wykorzystując tylko dane z WUM wykrył znacznie zwiększoną częstość mutacji w *KMT2C* (9; 18,8%). Analizując dane innych badaczy wraz z danymi WUM Doktorant ustalił częstość mutacji patogennych w genie *KMT2C* na poziomie 8,7% (48/551) chorych, przy czym u 3,4% (19/551) stwierdzono mutacje o charakterze potencjalnie skracającym białko. Dodatkowo analiza Doktoranta pokazała, że mutacje *KMT2C* były także 3x częstsze w raku gardła niż w pozostałych nowotworach głowy i szyi ( $p = 0,0038$ ).

Następnie Doktorant przedstawia wyniki dotyczące genotypowania niemodyfikowanej CRISPR linii FaDu (HPV-) co potwierdza brak obecności mutacji w genie *KMT2C*, ale za to obecność typowych dla raków głowy i szyi mutacji np. amplifikacji *CCND1*, głębokich delecji *AJUBA* i *SMAD4*, mutacji *TP53*, *CDKN2A*, *FAT1*, *SYNE1*, *ERBB3*, *VHL* czy *RAF1*. Dalej Doktorant opisuje wyniki sekwencjonowania linii komórkowej FaDu modyfikowanej CRISPR w celu uzyskania mutacji w genie *KMT2C*. Doktorant uzyskał linie komórkowe zawierające mutacje w *KMT2C* (sg2 i sg4, z mutacjami w egzonach 3 i 12 *KMT2C*, a także linię kontrolną sgNTC) i co ważne nie stwierdził niespecyficznych mutacji małej skali. Świadczy to o poprawnie zaprojektowanym i przeprowadzonym przez Doktoranta eksperymencie z wykorzystaniem techniki CRISPR. Linie sg2 i sg4 oraz pochodne charakteryzowała zwiększona zdolność do tworzenia kolonii oraz wzmożonej syntezy DNA. Doktorant zaobserwował, również różnice we wrażliwości na działanie cisplatyny względem sgNTC różnych linii klonów.

W podsumowaniu - wyniki badań przedstawiono szczegółowo. Dodatkowo tekst jest bardzo bogato ilustrowany licznymi tabelami, rycinami oraz wykresami. Odzwierciedla to ogrom pracy włożony przez Doktoranta w prezentacje wyników.



## DYSKUSJA

Dyskurs naukowy jest prowadzony poprawnie. Doktorant sprawnie i płynnie dyskutuje swoje wyniki z cytowanym piśmiennictwem. Świadczy to o jej dobrej znajomości diskutowanego tematu co potwierdza duża liczba cytowanego piśmiennictwa.

Doktorant na początku przeprowadza zgrabną dyskusję dotyczącą mutacji w genie *TP53*, które były najczęściej występującymi mutacjami w kohorcie WUM (45,8% (22/48)). W populacji chorych na raka gardła dolnego w połączonych kohortach mutacje skracające występowały u 43,3% (29/67) chorych ogółem i 51,8% (29/56) chorych z mutacjami *TP53*, co według Doktoranta może mieć wpływ na gorsze rokowanie w tej grupie chorych. Na tej podstawie Doktorant wysnuwa wniosek o potencjalnej użyteczności oceny statusu genu *TP53* dla stratyfikacji chorych do różnych grup ryzyka.

W dalszej dyskusji Doktorant umiejętnie i logicznie przewiduje możliwy brak skuteczności zastosowania inhibitorów CDK4/6 w raku głowy i szyi u pacjentów z mutacjami *CDKN2A* lub *CCND1* ale z obecną mutacją *FAT1*, która może stać się czynnikiem niekorzystnej prognozy i braku odpowiedzi na tego typu leczenie. Następnie Doktorant wskazuje na aktywację RTK oraz szlaków MAPK i PI3K, co może być wskazówką dla rozpoczęcia badań klinicznych z wykorzystaniem inhibitorów EGFR, FGFR, PIK3CA, BRAF, MEK czy innych białek. Dalej Doktorant wskazuje na podstawie wykrytych mutacji genu *KDM6A* na możliwość zastosowania inhibitorów metylotransferazy H3K27, EZH2, np. tazemetostat w leczeniu raków głowy i szyi (wg. TCGA 5% mutacji). W następnym akapicie Doktorant dyskutuje znaczenie mutacji w genach *ARIDA*, *BRCA1* i *BRCA2* jako potencjalnych markerów na zastosowanie PARPi w raku głowy i szyi. Doktorant zauważa, że uzyskane przez niego wyniki (analiza 18 genów w 67 próbkach HPV-) potwierdzają już dostępne dane o występujących różnicach między rakami krtani i gardła (dolna i ustna część gardła) a rakami jamy ustnej z wyjątkiem mutacji w genach *HRAS* i *CASP8*.

W następnej części dyskusji Doktorant dyskutuje znaczenie mutacji w promotorze genu i słusznie wskazuje na potrzebę rozszerzenia badań o zmiany CNV oraz ekspresję białka TERT w rakach głowy i szyi. W następnym akapicie Doktorant wskazuje na potrzebę kontynuowania badań wielkoskalowych, ale na większych i bardziej jednorodnych zbiorach próbek nowotworowych umiejętnie cytując piśmiennictwo.

W drugiej części dyskusji Doktorant omawia mutacje oraz CNV genów metylotransferaz histonów wykryte w genach *KMT2C*, *KMT2D* i *NSD1*. Uzyskane wyniki wskazują na funkcjonowanie genu *KMT2C* jako supresora nowotworowego co jest zgodne

z rolą tego genu w innych nowotworach hematologicznych oraz litych (reguluje różnicowanie, tempo proliferacji i tworzenia kolonii, regulacje naprawy uszkodzeń DNA, reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za adhezję, polarność i różnicowanie komórek). Doktorant przytacza dane gdzie utrata *KMT2C* skutkuje upośledzeniem naprawy DNA, zwiększonym TMB (i potencjalną podatnością na inhibitory PD-1/PD-L1) oraz zwiększoną wrażliwością na olaparib i cisplatynę. W swoim dyskursie Doktorant słusznie wskazuje na zróżnicowany wpływ różnych typów mutacji (delecje, insercje, mutacje zmiany sensu, CNV) na funkcjonowanie *KMT2C* jako supresora lub onkogenu. Następnie Doktorant logicznie przechodzi do eksperymentów indukowania mutacji w genie *KMT2C* w linii FaDu z wykorzystaniem techniki CRISPR. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują, że mutacje w genie *KMT2C* w komórkach gardła dolnego powodują wzrost ich proliferacji oraz większy potencjał do tworzenia kolonii. Jak dyskutuje Doktorant, jego obserwacje są zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi raków przełyku oraz raka piersi. Doktorant krytycznie odnosi się to swoich wyników dotyczących wpływu cisplatyny na żywotność komórek FaDu z indukowanymi mutacjami w *KMT2C*, które nie przyniosły jednoznacznych odpowiedzi. Podpierając się literaturą Doktorant dochodzi do wniosku, że wpływ mutacji w *KMT2C* na naprawę DNA może być zależny od kontekstu molekularnego w różnych modelach badawczych.

Doktorant krytycznie odnosi się do całości swoich wyników stwierdzając, że analizowana grupa raków gardła (dane swoje oraz wcześniej opublikowane przez innych) nie pozwoliła na wykrycie wielu różnic w profilach genetycznych, które odzwierciedlałyby gorszy przebieg kliniczny raków gardła dolnego. Doktorant podaje niejednorodność danych (pochodziły z sekwencjonowania próbek raka gardła dolnego z wykorzystaniem różnych paneli genowych) jako jedną z przyczyn analizy bardzo małej liczby genów i braku wykrycia ww. charakterystycznego profilu dla badanej lokalizacji. Wreszcie Doktorant zauważa, że brak innych linii wywodzących się z gardła dolnego nie pozwolił na weryfikację uzyskanych wyników na modelu alternatywnym. Umiarkowany wpływ mutacji w *KMT2C* na proliferację tłumaczy dewiacją genetyczną linii komórkowej w porównaniu do stopniowej kancerogenezy u chorego lub zależnym od stadium procesu kancerogenezy.

Na koniec słusznie zauważa, że uzyskanie wyniki są przyczynkiem dla rozważenia badań klinicznych z wykorzystaniem obecnie dostępnej terapii celowanej chorych na raka gardła dolnego. Głównym odkryciem niniejszej pracy jest antyonkogenne działanie geny *KMT2C* w raku głowy i szyi.

Pewien niedosyt pozostawia niejednorodność danych z sekwencjonowania wykorzystanych do analizy co miało wpływ na brak odkrycia specyficznych dla badanego

nowotworu profilu mutacji lub nawet nowych celów dla terapii ukierunkowanych molekularnie. Jednym z tematów przyszłych badań mogłaby być analiza z wykorzystaniem sekwencjonowania przynajmniej egzomowego lub nawet sekwencjonowanie pojedynczych komórek wykonane na statystycznie uzasadnionej liczbie próbek tkankowych dobrze scharakteryzowanego klinicznie raka gardła dolnego.

## WNIOSKI

Wnioski w sposób wyczerpujący odpowiadają na założone cele i świadczą o poprawnej konstrukcji całej pracy. Prace uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim.

Resumując należy podkreślić, że całość badań została dobrze zaplanowana i profesjonalnie przeprowadzona. Świadczy to o dobrej organizacji pracy w tym współpracy (NGS i początkowa analiza danych) oraz dobrym “warsztacie naukowym” Doktoranta. Dla realizacji zamierzonych celów Doktorant zastosował zaawansowane metody bioinformatyczne do szczegółowej adnotacji oraz opisu wyników w tym graficznego przedstawienia. Dodatkowo zastosował zaawansowane metody *in vitro* (technika CRISPR) oraz metody hodowli wraz z oceną właściwości biologicznych zmodyfikowanych linii komórkowych. Wyniki zostały przedstawione za pomocą licznych ilustracji, tabel i wykresów. Temat pracy badawczej jest wielce uzasadniony, ponieważ raki głowy i szyi to nowotwory, w których w przypadku zaawansowanego stadium stosuje się leczenie skojarzone. Wynika to z ograniczeń anatomicznych chirurgii i lokalizacji ważnych organów dla funkcjonowania również społecznego chorego. Sytuacji nie poprawia duży brak terapii ukierunkowanych molekularnie w związku z powyższym podjęty temat przez Doktoranta ma duże znaczenie dla grupy chorych leczonych z powodu nowotworów głowy i szyi.

**W mojej ocenie rozprawa doktorska Pana mgr inż. Marcina Machnickiego spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż Marcina Machnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**„Rozprawa doktorska 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 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)”.**