



Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
Katedra Analityki Klinicznej
ul. Dębinki 7, 80-210 Gdańsk
Tel. sekretariat +58 349-2782 lub -1182
Tel. + 58 349-2791
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Leszek Kalinowski
E-mail: leszek.kalinowski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 08.10.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Ducher-Hanaka

pt. „Ocena ekspresji genów warunkujących aktywność transdukcyjną wektorów rAAV”

Podjęte w rozprawie doktorskiej prace eksperymentalne wpisują się w nurt badań związanych z zastosowaniem terapii genowych z wykorzystaniem wirusów jako wektorów genetycznych dla potencjalnych próbek klinicznych u chorych onkologicznych. W związku z tym, że dotychczasowe metody leczenia przeciwnowotworowego - w tym stosowane od kilku już dekad rozmaicie aplikowane schematy chemioterapii, nie przynoszą znaczącego postępu w skuteczności zwalczania chorób w których jest wzmożony, niekontrolowany rozrost komórek, terapia genowa jest jedną z bardziej obiecujących obecnie strategii leczenia przeciwnowotworowego. U podłoża tej strategii jest fakt, że nowotwory odznaczają się dużą dynamiką zmian w genomie, które mają kluczowe znaczenie w patomechanizmach molekularnych tych chorób. Wybór rodzaju terapii genowej w pracy doktorskiej odzwierciedla obecny trend tego typu badań na świecie, bowiem wektory wirusowe są wykorzystywane w prawie 70% badań klinicznych związanych z terapią genową. Istotną część terapii genowych stanowią technologie z użyciem rekombinowanych form wirusów związanych z adenowirusami (*recombinant adeno-associated virus vector*; rAAV). Takimi też kryteriami posługiwała się w swoich założeniach badawczych Doktorantka. Wybór wydaje się bardzo słuszny, gdyż zaletami stosowania wektorów rAAV jest m.in. względnie wysoki stopień bezpieczeństwa biologicznego, niska immunogenność, szeroki tropizm tkankowy, a także możliwość transdukcji do komórek zarówno dzielących się jak i nie dzielących się. Nie mniej jednak, i ta metodologia terapii genowej wiąże się z pewnymi ograniczeniami do których należy m.in. nie wystarczający poziom transdukcji w wielu tkanach dla uzyskania należytego efektu. Stąd też, ważnym elementem oceny skuteczności i specyficzności leczenia terapią genową, w tym rAAV, jest ocena czynników warunkujących aktywność transdukcyjną stosowanych wektorów genowych. Warto również zaznaczyć, że atrakcyjność wyboru tematu pracy doktorskiej nie jest związana tylko z łączeniem terapii genowej jako metody prowadzącej do efektu *stricte* przeciwnowotworowego związanego ze zmniejszeniem ilości bądź całkowitym unicestwieniem komórek nowotworowych. Na skuteczność kliniczną terapii nowotworowej składa się wiele „indywidualnych” cech choroby nowotworowej, jak. np. podłoże mechanizmów molekularnych,

struktura morfologiczna guza nowotworowego, etc. Z tego powodu wynika niejednorodność chorych na nowotwory pod względem reakcji na podjęte leczenie i czas przeżycia. Istnieje więc niezaspokojona wciąż potrzeba ustalenia odpowiednich czynników prognostycznych, które mogą zapewnić konieczny postulat personalizacji terapii przeciwnowotworowej. Jednym ze sposobów tworzenia sygnatur molekularnych nowotworów jest badanie ekspresji wybranych genów dla zdobycia danych prognostycznych z wyszczególnieniem bardziej precyzyjnie podtypu nowotworu, co ostatecznie ma doprowadzić do dobrania „celowanego molekularnie leczenia” (*molecular targeted therapy*).

Celem pracy doktorskiej było zbadanie w komórkach nowotworowych o różnej lokalizacji ekspresji genów kodujących białka receptorowe należące do grupy proteoglikanów: gen *HSPG1* dla syndekanu 2 (*HSPG1*, *SDC2*), genu *HSPG2* dla perlakanu (*HSPG2*) i gen *AAVR* dla białka transbłonowego typu I – *AAVR* (*KIAA0319L*). Powyższe białka odgrywają istotną rolę w cyklu życiowym wirusa AAV, a ich ekspresja na powierzchni komórek istotnie implikuje skuteczność transdukcji wektorów genowych opartych o rAAV. Dzięki analizie porównawczej możliwa jest selekcja badanych nowotworów na podatność transdukcji rAAV.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Ducher-Hanaka ma typowy układ dla tego rodzaju opracowań, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są odpowiednio zachowane. Układ redakcyjny jak i forma edytorska nie budzą istotnych zastrzeżeń. Obszerna praca liczy 163 strony i składa się z 9 rozdziałów. Tekst został wzbogacony licznymi rycinami (rozdział 8) i tabelami (rozdział 9). Bardzo cennym dodatkiem jest podany na wstępie pracy szczegółowy opracowany wykaz skrótów. Wstęp rozprawy (rozdział 1) - poprzedzający zdefiniowanie celów (rozdział 2) - jest dobrym wprowadzeniem w tematykę badawczą, której dotyczy praca doktorska. Przejrzyście opisuje metody terapii genowej, daje przegląd wybranych prób klinicznych u chorych nowotworach z użyciem terapii genowej - szczególnie z użyciem rAAV, a także dokładnie wyjaśnia powody dla których podjęto badanie ekspresji wybranych genów w komórkach różnych typów nowotworów.

Na podstawie danych przedstawionych w rozdziale dotyczącym użytych materiałów i metodyki (rozdział 3) można stwierdzić, że projekt został skonstruowany właściwie. Opis metod daje możliwość powtórzenia postępowania analitycznego dla badań przeprowadzonych w rozprawie doktorskiej. Starannie opisano oznaczanie profilu ekspresji genów techniką Real-Time PCR przy użyciu sond molekularnych TaqMan z wykorzystaniem tkanek pozyskanych od pacjentów z guzów nowotworowych usuniętych chirurgicznie w trakcie rutynowych procedur klinicznych i komórek nowotworowych hodowanych *in vitro* uprzednio nabytych komercyjnie.

Rozdział dotyczący analizy otrzymanych rezultatów (rozdział 4) potwierdza sprawność Doktorantki w zakresie prezentacji i obiektywnej analizy wyników. W tej części rozprawy można znaleźć liczne ryciny i tabele, które w przejrzysty sposób podsumowują wykonaną analizę, a także pozwalają dostrzec ważne detaliczne informacje pominięte w opisie wyników. Rezultaty prac badawczych są obiektywizowane przez zastosowanie adekwatnych testów statystycznych. Do ostatecznych analiz ekspresji badanych genów Doktorantka użyła 144 próbek z których 130 stanowiły próbki tkanek nowotworowych: raka jajnika (11), raka piersi (16), raka trzonu macicy (9), nowotworów głowy i szyi (15), nowotworów jamy brzusznej (6), raka jelita grubego (26), raka krtani (33), raka ślinianki (8) i raka wątroby (6) oraz 14 próbek z linii komórkowych: raka jelita grubego (8), czerniak (4) i raka jajnika (2).

Doktorantka dokonała starannej analizy porównawczej, która wykazała, że badane komórki nowotworowe mają odmienną ekspresję genów – potencjalnych kandydatów do transdukcji rAAV. W tym kontekście uzyskane wyniki sugerują, że nowotwory układu pokarmowego, w tym zwłaszcza nowotwór wątroby, są podatną grupą nowotworów na transdukcję rAAV; z kolei najmniej wrażliwą grupą z pośród badanych nowotworów są nowotwory głowy i szyi oraz krtani.

Przedstawione wnioski (rozdział 6) są adekwatnie sformułowane do uzyskanych wyników. Potwierdzają, że praca doktorska może być pomocna w opracowaniu sygnatur genowych użytecznych w planowaniu terapii genowych i prób klinicznych. Dowodzą, że ocena badanych genów może być wykorzystana w diagnostyce różnicowej nowotworów, a także być brana pod uwagę dla ustalenia wrażliwości na genoterapię z użyciem biobezpiecznych rekombinowanych wektorów rAAV.

Dyskusja (rozdział 5) jest zwarta i klarowna, wyniki badań są precyzyjnie omawiane w odniesieniu do opublikowanych licznych badań na temat sygnatur genowych nowotworów dla wyznaczenia czynników prognostycznych i planowania terapii genowych. Jest świadectwem biegłości wiedzy, którą zgłębiła Doktorantka w tematyce prowadzonych badań, a także zdolności wyprowadzania syntetycznych wniosków z mnóstwa danych uzyskanych z różnych modeli doświadczalnych. Bardzo obszerna literatura przedstawiona w referencjach (rozdział 7), zawierająca aż 244 pozycje, powierdza dużą wartość naukową i kliniczną wybranego tematu, ogromne zainteresowanie tego typu badaniami w świecie, aktualność tez badawczych (większość przytoczonych publikacji pochodzi z ostatnich 5 lat) oraz znakomity przegląd wiedzy związany z tematyką pracy doktorskiej.

Z obowiązku wywiązania się z niewdzięcznej roli recenzenta chciałbym wskazać na te aspekty rozprawy doktorskiej, które nasuwają krytyczne spostrzeżenia i uwagi, a także niedosyt poznawczy dla wnikliwego naukowca. Dla pobudzenia wyobraźni badawczej i ukierunkowania młodego naukowca ku samodzielnie prowadzonym ważnym badaniom w przyszłości warto wskazać, że pozyskanie więcej danych klinicznych o przebiegu choroby nowotworowej i podjęcie próby korelowania ich z ekspresją badanych genów w próbkach fragmentów tkanek, znacząco mogłoby wzbogacić zakres dokonanych obserwacji. W części eksperymentalnej wartość naukową pracy badawczej zwiększyłyby badania ekspresji badanych genów u tych samych pacjentów we fragmentach tkanek z obrzeża guzów, uznanych histopatologicznie za nienowotworowe. Obecna wiedza o etiopatogenezie nowotworów dostarcza sporo obserwacji na temat mozaikowości mutacji nowotworowych w „zdrowym” otoczeniu tkankowym guza nowotworowego, co przekłada się na zmienną ekspresję różnych genów. Ponadto, niedosyt w części eksperymentalnej pozostawia brak oceny ekspresji i lokalizacji w komórce białek, które kodują badane geny, a których ocenę możnaby dokonać metodami immunohistochemii dla badanych fragmentów tkanek lub też immunocytochemii dla linii komórkowych. Byłoby to tym bardziej warte sprawdzenia, gdyż białka receptorowe HSPG znajdują się na powierzchni komórek, ulegają ciągłej i warkkiej internalizacji dla dalszej degradacji lizosomalnej czy też rycklingu membranowego. Powstaje naturalne pytanie na ile zmiany ekspresji genów przekładają się na wielkość ekspozycji kodowanych białek na powierzchni komórek?

Całość pracy oceniam bardzo pozytywnie. Pani mgr Magdalena Ducher-Hanaka wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, pełne opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego i umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników z bardzo dobrze dobranymi narzędziami biostatystycznymi. Praca zawiera szereg elementów oryginalnych. Wyniki rozprawy wnoszą postęp w diagnostyce różnicowej nowotworów, a także wzbogacają wiedzę dla planowania genoterapii za pomocą rekombinowanych wektorów rAAV. Przytoczone uwagi krytyczne nie umniejszają istotnie wartości naukowej rozprawy doktorskiej, mają posłużyć do wzbogacenia rozwoju naukowego Doktorantki. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, że spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. **Wnoszę więc do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Ducher-Hanaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Włodzisław Kalinowski