

Prof. dr hab. Jacek Bigda

Zakład Biologii Komórki i Immunologii

Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Igi Kołodziejczak-Guglas:

**pt. „Analizy molekularne odróżnicowania onkogennego przy użyciu
zestawów danych proteogenomicznych otrzymanych z 12 typów
nowotworów”**

wykonanej pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Macieja Wiznerowicza z
Międzynarodowego Instytutu Onkologii Molekularnej w Poznaniu i przedłożonej
Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Obszar onkologii zajmujący się mechanizmami prowadzącymi do progresji nowotworowej od wielu lat stanowi pole intensywnie prowadzonych badań. Rozwój technik wielkoskalowych, tzw. omicznych w powiązaniu z zaawansowanymi analizami bioinformatycznymi pozwala obecnie na szerokie, całościowe spojrzenie na zmiany sekwencji DNA różnorodnych genów, ich transkryptów, produktów białkowych w komórkach pochodzących z wybranych nowotworów, ich typów histologicznych, stopni zaawansowania, lokalizacji w guzie pierwotnych bądź przerzutach, różnych etapach postępowania terapeutycznego. Analiza wzorów zmian sekwencji czy modyfikacji DNA, zmian ekspresji specyficznych RNA czy białek może być również prowadzona w odniesieniu do istotnych dla progresji nowotworowej parametrów stanowiących ważne cechy biologiczne komórek nowotworowych. Ich przykładem jest macierzystość - cecha wykazywana przez część komórek nowotworowych wpływająca najprawdopodobniej na zdolność nowotworów do nabywania fenotypu progresyjnego, a także przyczyniająca się do oporności na terapie, zwłaszcza skierowane przeciwko komórkom szybko proliferującym.

Autorka podjęła się próby odniesienia tzw. indeksu macierzystości opracowanego przy użyciu danych proteomicznych pozyskanych poprzez analizę proteomu wielu ludzkich indukowanych linii komórek macierzystych z danymi

genomicznymi, transkryptomicznymi oraz proteomicznymi uzyskanymi przez międzynarodowe konsorcjum CPTAC dla 12 typów guzów pierwotnych często występujących nowotworów. Miała ona posłużyć identyfikacji potencjalnie nowych punktów uchwytu terapii, głównie białek zaangażowanych w nabywanie czy utrzymanie fenotypu macierzystego komórek nowotworowych. Autorka zaplanowała również przeprowadzenie analizy immunohistochemicznej wybranych białek związanych z macierzystością w próbkach klinicznych jasnokomórkowego raka nerki oraz płaskonabłonkowego raka krtani i gardła przede wszystkim w celu określenia ich wartości rokowniczej.

Podjęty temat badawczy uważam za bardzo aktualny i nowoczesny, dający szansę na identyfikację nowych, przydatnych klinicznie markerów progresji nowotworowej, a po odpowiedniej dalszej weryfikacji stanowiących również potencjalnie nowe cele terapeutyczne.

Dokumentacja powyższej pracy zawarta jest na 142 stronach maszynopisu w typowym układzie: streszczenie, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie – wnioski i ograniczenia. Zawiera 19 rycin, wyodrębniony spis skrótów, spis rycin oraz 291 aktualnych pozycji bibliograficznych.

Streszczenie jest pierwszą merytoryczną częścią pracy. Jest niestety zbyt ogólne, już w nim, w moim przekonaniu, powinien być zawarty dokładniejszy opis czym jest indeks macierzystości PROTsi oraz co Autorka rozumie przez stopień „odróżnicowania onkogennego”. Styl zdań jest w tej części niekiedy bardzo zawiły np. *„W celu istniejących ograniczeń, niniejsza praca łączy koncept macierzystości nowotworów z proteomiką, która dodaje nową warstwę molekularnego wglądu w mechanizmy napędzające progresję raka”*. W kolejnym zdaniu Doktorantka odnosi się już do wyników pisząc, że *„indeks macierzystości... jest związany z cechami histopatologicznymi guza...”*, podczas gdy jeszcze nie przedstawiła w zarysie materiału badawczego. Pojawiają się również niezręczne tłumaczenia – *early onset gastric cancer* prościej można przetłumaczyć na wczesny rak żołądka. Inne zdanie zawiera treści zbyt ogólne lub wyrażone hasłowo - *„Integracja indeksu ... z ekspresją genów... zidentyfikowała wyraźną asocjację proteogenomiki z macierzystością...”*. Warto w tym miejscu byłoby przytoczyć przykładowe zidentyfikowane białka wskazujące na przydatność zaproponowanej analizy w identyfikacji nowych molekuł

mogących świadczyć o macierzystości komórek poszczególnych typów nowotworów. W podsumowaniu, streszczenie niestety nie stanowiło dobrej syntezy problemu badawczego, założeń, wyników i wniosków, natomiast niewątpliwie zaciekało zaproponowaną ogólną koncepcją oraz cennym materiałem badawczym, bardzo dobrze opracowanym przez międzynarodowe konsorcjum.

Kolejną częścią jest wstęp rozprawy, który na początku przedstawia opis zadań konsorcjum CPTAC powstałego z inicjatywy amerykańskiego NCI i zaangażowanego w analizę proteomiczną szeregu nowotworów. Jego naczelnym celem jest przyczynienie się do zrozumienia molekularnych podstaw powstawania i progresji nowotworów oraz odkrycia nowych markerów za pomocą wielkoskalowych analiz genomicznych i proteomicznych. W dalszej części wstępu Autorka opisuje proteomikę, wielkoskalowy sposób analizy białek, który pozwala na uzupełnienie informacji o badanych układach biologicznych uzyskanej na podstawie metod genomicznych i transkryptomicznych. Oczywiście można się zgodzić z Autorką, że jednoczesna analiza poziomu wielu białek w określonych komórkach bardziej niż analiza na poziomie DNA i RNA przybliża nas do zrozumienia funkcji komórek w danym czasie i miejscu, jednak sformułowanie, że „*Proteomika umożliwia badanie funkcjonalnych aspektów białek...*” (str. 24) jest uproszczeniem „na wyrost” lub dużym skrótem myślowym. Trudnym do pozostawienia bez wypomnienia i być może skrótem myślowym o charakterze „humoru z zeszytów” jest jednak sformułowanie „*Białka są syntetyzowane z genów*” (strona 25 wiersz 1).

W następnej części wstępu Doktorantka opisuje pojęcie macierzystości nowotworów związane z występowaniem wśród komórek nowotworowych komórek o cechach samoodnowy i posiadających specyficzne markery prawidłowych komórek macierzystych. Obecność macierzystych komórek nowotworowych wiąże się obecnie ze zdolnością nowotworów do progresji, opornością na terapię, a także występowaniem późnych wznów nowotworów. Dlatego zastosowanie technik wielkoskalowych do oceny potencjalnego, zróżnicowanego występowania w poszczególnych nowotworach komórek o cechach macierzystych jest niewątpliwie jak najbardziej uzasadnione. Autorka opisuje również sposób opracowania indeksu macierzystości opartego na analizie profilu ekspresji transkryptów RNA w komórkach macierzystych, indukowanych komórkach macierzystych i ich prekursorach. Indeks

ten wykazał swoją przydatność w identyfikacji nowotworów o wyższej złośliwości, szybciej tworzących przerzuty i o gorszym rokowaniu.

W dalszej części wstępu Doktorantka przedstawia charakterystykę nowotworów stanowiących przedmiot dalszych analiz, ich klasyfikację ze szczególnym uwzględnieniem klasyfikacji molekularnej niektórych spośród badanych nowotworów. Wprowadzenie klasyfikacji molekularnej w tych przypadkach udokumentowało kliniczną przydatność analiz wielkoskalowych.

Wstęp, podobnie jak streszczenie zawiera trochę sformułowań żargonowych czy stylistycznie niezgrabnych jak np. „*Zintegrowane analizy proteogenomiczne przybliżyły sygnatury zależne od wyników leczenia...*”. Wymienianie ich wszystkich uznaję jednak za niekonieczne, bo ostatecznie nie wpływają na zrozumienie całości wyводу.

W kolejnej części pracy autorka prezentuje ogólny cel i cele szczegółowe. Cel ogólny powinien być jednak sformułowany bardziej specyficznie, bowiem w prezentowanej formule mógłby odnosić się do analizy pierwotnych danych zaprezentowanych w licznych publikacjach Konsorcjum. Również sposób formułowania celów szczegółowych nie jest zbyt precyzyjny. Dla przykładu czytelnik nie wie, co stanowi dla Autorki stopień odróżnicowania onkogennego? W drugim celu Czytelnik nie wie dokładnie, o jakie wyniki analiz proteogenomicznych chodzi: czy może o te uzyskane przez Konsorcjum CPTAC, czy może te uzyskane w wyniku realizacji celu 1. Ponadto z brzmienia celu 2 może wynikać mylne rozumienie pojęcia predykcja, Autorka powinna użyć pojęcia rokowanie lub prognozowanie. Niezależnie od powyższych słów krytycznych postawione cele są atrakcyjne i zachęcają do dalszej lektury.

W opisie materiałów i metod Autorka przedstawia pochodzenie próbek analizowanych przez Konsorcjum CPTAC oraz zasób danych poddanych dalszym analizom. W kolejnej części rozdziału przedstawia procedurę służącą opracowaniu indeksu macierzystości PROTsi uzyskanego dzięki użyciu danych z opublikowanych przez konsorcjum HipSci proteomów wielu ludzkich indukowanych linii komórek macierzystych. Zastanawia czy sposób wytrenowania algorytmu służącego do oceny próbek HipSci był ten sam, co we wcześniej opisanych analizach mRNAsi, czy może

zastosowano ten sam algorytm do analiz proteomu. Warto również było przybliżyć sposób określenia/zastosowania tzw. wektora wagowego w przyjętym modelu.

Następnie Autorka opisuje sposób oceny korelacji ekspresji genów i poziomów białek z indeksem PROTsi w analizowanych próbkach nowotworów, co pozwoliło na identyfikację białek, których poziom jest najwyższy lub najniższy w próbkach wykazujących wysokie poziomy PROTsi. W kolejnych etapach Doktorantka opisała sposób porównania obecności zidentyfikowanych białek i związku ze wzorem fosfoproteomu, analizy miRNA, metylacji DNA, powiązania z danymi klinicznymi takim, jak przeżycie całkowite i przeżycie wolne od progresji. Oceniała również przynależność zidentyfikowanych białek do rodzin funkcjonalnych, zweryfikowała obecność zidentyfikowanych białek w bazie istniejących białkowych celów terapeutycznych, a także – również *in silico* - interakcje z potencjalnymi lekami. Następnie przedstawiła sposób kategoryzacji białek służący do wyboru markerów białkowych walidowanych za pomocą przeprowadzonej później analizy immunohistochemicznej. Ze sposobu formułowania opisu metod przyjmuje, że różnorodne analizy bioinformatyczne Doktorantka wykonywała samodzielnie. Ponadto wskazała, że ocenę preparatów IHC wykonywali doświadczeni patolodzy, natomiast niejasne jest, kto przygotowywał same preparaty do oceny.

Wyniki już na samym początku ich prezentacji, tj. porównania guzów i tkanek prawidłowych zdają się potwierdzać przydatność narzędzia jaki jest PROTsi do oceny macierzystości, z drugiej strony wskazują na znaczącą heterogenność analizowanych guzów. Autorka wskazuje na pewne różnice w PROTsi zależne od podtypu molekularnego nowotworów, a także stopnia zaawansowania w ocenie histopatologicznej. W opisie wyników powinna jednak podkreślać, które, najistotniejsze z nich mają znamienność statystyczną. Niewygodnie bowiem Czytelnikowi pracować z lupką czy w wersji elektronicznej ekran raz powiększać, raz pomniejszać. Następnie w przypadku map cieplnych pokazujących najsilniej fosforylowane białka, których obecność wydaje się związana z poziomem indeksu PROTsi należałoby w tym rozdziale wskazać zidentyfikowane, nowe fosfoproteiny, które dotychczas nie stanowią celów terapeutycznych. W kolejnym etapie Autorka zaprezentowała dane dla białek związanych z fenotypem macierzystym, w których w zdecydowanej większości wysokim wartościom PROTsi towarzyszyły wysoki poziom

ekspresji mRNA, poziom białka, niska ekspresja miRNA (najpewniej tych wskazanych jako wpływających na specyficzne mRNA). W wyniku przeprowadzonej kategoryzacji białek związanych z macierzystością Autorka wskazała białka zidentyfikowane w kilku typach nowotworów oraz białka bardziej specyficzne. W kolejnym etapie Doktorantka przedstawiła analizę histochemiczną występowania białek związanych z wysokim indeksem PROTsi w próbkach raka nerki oraz znanych markerów macierzystości np. SOX2 w raku krtani/gardła. Wykazała, że wysokie poziomy białek związanych z wysokim indeksem PROTsi np. HEATR1 są obecne w próbkach o wyższym stopniu złośliwości, a niski poziom białka SLC27A2 powiązany z wysokim indeksem PROTsi także jest identyfikowany w próbkach z nowotworu o wysokim stopniu złośliwości. W oparciu o dane kliniczne stwierdziła również konsekwentny związek z niekorzystnym rokowaniem. Interesujące, że w innym nowotworze, HNSCC, uznane markery macierzystości, takie jak SOX2, REX1 nie wykazały podobnej wartości prognostycznej.

W kolejnej części rozdziału Autorka przedstawiła zestaw cząsteczek chemicznych, które potencjalnie mogą oddziaływać ze zidentyfikowanymi wcześniej białkami związanymi z macierzystością, opracowany na podstawie analizy wielkiej skali profili ekspresji genów komórek poddanych działaniu powyższych cząsteczek. Dla zidentyfikowanych cząsteczek wskazała również potencjalne cele terapeutyczne i mechanizmy działania.

Na wstępie dyskusji Doktorantka podkreśla przewagę indeksu macierzystości opracowanego na podstawie danych proteomicznych nad indeksem opartym o ekspresję mRNA. Choć rzeczywiście intuicyjnie wydaje się to uzasadnione ze względu na rolę białek w komórce, to jednak z punktu widzenia diagnostycznego należałoby szczegółowo porównać przydatność obu indeksów dla oceny rokowniczej bądź predykcyjnej. Następnie Autorka prowadzi dyskusję odnoszącą się do różnic wartości indeksu PROTsi pomiędzy próbkami nowotworowymi a prawidłowymi w poszczególnych nowotworach, odnosi się do heterogenności w obrębie nowotworów, różnic w wartościach indeksów prawdopodobnie zależnych od stopnia agresywności guza. W kolejnej części dyskusji odnosi się do znaczenia fosforylacji niektórych białek, odnosi się specyficznie do białka SRRM2, którego fosforylacja jest obecna preferencyjnie w próbkach o wysokim indeksie PROTsi. To bardzo ciekawy wynik,

choć nieobecny we wszystkich typach badanych nowotworów. W kolejnej części pracy odnosi się do identyfikacji białka HEATR1, którego podwyższone poziomy obserwuje się w próbkach o wysokim PROTsi w pięciu badanych typach nowotworów. To niewątpliwie bardzo ciekawy wynik, który wymagał dalszych analiz. Analizując białka związane z macierzystością w badanych nowotworach Autorka zidentyfikowała białka obecne w różnych typach nowotworów oraz specyficzne dla danego rodzaju nowotworu. Analiza ta powinna być oczywiście w przyszłości pogłębiona w kierunku zrozumienia biologicznego znaczenia poszczególnych obserwacji, prowadzonych nie tylko w oparciu o dyskutowane w dalszej części analizy bioinformatyczne identyfikujące potencjalne cząsteczki terapeutyczne czy ich punktu uchwytu. Przykładem takich badań była cenna analiza immunohistochemiczna wybranych potencjalnych biomarkerów macierzystości wskazująca przekonująco na ich potencjał jako markerów rokowniczych, a także dająca przesłankę dla podjęcia dalszych prac nad weryfikacją znaczenia zmian poziomu określonych białek dla prac nad nowymi punktami uchwytu leków.

Dyskusja jest w sumie ciekawa. Wprawdzie Doktorantka nie ustrzegła się w niej również uproszczeń czy żargonowych sformułowań, czy też ponowienia błędnego postrzegania pojęć prognoza i predykcja, to w całości wykazała na tle aktualnej literatury przedmiotu wartość uzyskanych wyników i ich przydatność dla formułowania dalszych kierunków prac.

W podsumowaniu pragnę wskazać, że doktorantka dokonała interesującej analizy danych genomicznych i proteomicznych nowotworów w oparciu w nowy wskaźnik, tzw. indeks macierzystości mogący świadczyć o frakcji komórek macierzystych występujących w poszczególnych próbkach nowotworowych. Analizy te pozwoliły na identyfikację szeregu kandydatów, białek posiadających nieznane dotychczas, potencjalne znaczenie dla procesu wykształcania się fenotypu progresyjnego nowotworu. Potwierdzały to obserwacje kliniczne chorych, od których pozyskano dane próbki nowotworów. W przypadku wybranych białek-kandydatów, dodatkową bezpośrednią walidację obserwacji przeprowadzono za pomocą analizy immunohistochemicznej ich obecności w próbkach pozyskanych od chorych w powiązaniu z obserwacją kliniczną tych pacjentów. Analizy te również potwierdziły potencjał wybranych białek-kandydatów jako markerów rokowniczych. Niezależnie

zatem od wskazanych w recenzji uchybień, uproszczeń czy nieścisłości, których wyjaśnieniu może posłużyć obrona rozprawy, przedstawiam opinię, że przedłożona praca odpowiada warunkom określonym w stosownych zapisach ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Igi Kołodziejczak-Guglas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 20 listopada 2023 roku

prof. dr hab. Jacek Bigda