



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU
Katedra Genetyki
i Podstaw Hodowli Zwierząt

POZNAN UNIVERSITY
OF LIFE SCIENCES
Department of Genetics
and Animal Breeding

Wołyńska 33, 60-637 Poznań, tel. 618487187 fax. (061) 8487148

Dr hab. Monika Dragan

Poznań, 16.04.2021

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Śmiech

pt. „Evaluation of the impact of selected mutations of the *BRAF*-gene on the development of liver cancer – model studies on genetically modified mammalian cell lines”

(Badanie wpływu wybranych mutacji genu *BRAF* na rozwój nowotworu wątroby – badania modelowe z wykorzystaniem linii komórkowych ssaków)

wykonanej w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. Mariusza Pierzchały

oraz promotora pomocniczego - dr Hiroaki Taniguchi

Problematyka podjęta w pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Śmiech wpisuje się w nurt badań, ukierunkowanych na identyfikację czynników genetycznych związanych z rozwojem procesu nowotworowego. Nowotwory wg danych WHO stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Wskazano do tej pory szereg genów, np. *TP53*, *APC*, *BRCA1*, których mutacje somatyczne lub germinalne są przyczyną rozwoju niektórych typów nowotworów. Jednakże wykorzystanie technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania pozwala na identyfikację dużej liczby nowych wariantów, których znaczenie w procesie kancerogenezy wymaga weryfikacji poprzez analizy funkcjonalne. Taki też cel w swoich badaniach obrała Doktorantka. Podjęte badania cechują się nowatorstwem, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do opracowania w przyszłości skuteczniejszych metod terapii nowotworów u niektórych pacjentów.

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma formę monografii naukowej, napisanej w j. angielskim (z wyjątkiem streszczenia napisanego w j. polskim) i posiada strukturę typową dla tego rodzaju prac naukowych. Niektóre elementy pracy, tzn. ryciny 3, 4 i 20 pochodzą z pracy przeglądowej, opublikowanej w 2020 roku w czasopiśmie *Genes*, w której pierwszym autorem jest mgr Magdalena Śmiech.

Pracę opatrzone tytułem w języku angielskim i polskim, jednak zauważyć można między nimi pewną niezgodność. Tytuł w j. angielskim informuje, że badania przeprowadzono na genetycznie zmodyfikowanych liniach komórkowych, co nie zostało ujęte w tytule w j. polskim. Po analizie zawartości pracy uważam, że tytuł w j. angielskim może być mylący, bowiem linie komórkowe, na których przeprowadzono badania nie posiadały trwałej modyfikacji w genomie, uzyskanej np. przy pomocy narzędzi do edycji genomu, a charakteryzowały się nadekspresją wariantów białka BRAF, wywołaną poprzez transfekcję komórek przy pomocy wektora plazmidowego. W tytule pracy można było również doprecyzować, że analizy przeprowadzono na liniach komórkowych człowieka.

We wstępie Autorka przedstawiła znane geny, odpowiadające za rozwój nowotworów u ludzi. Sądzę, że warto byłoby zaznaczyć, które spośród wymienionych mutacji mają charakter germinalny, a które są somatyczne. Następnie Doktorantka przedstawiła epidemiologię, czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju pierwotnego nowotworu wątroby oraz geny, których mutacje opisano jako przyczyniające się do rozwoju tego typu nowotworu. W dalszej kolejności Autorka szczegółowo opisała kluczowe elementy, regulację oraz konsekwencje zaburzeń przekaźnictwa sygnału w ścieżce sygnałowej MAPK/ERK. Wskazała ponadto geny i białka z tej ścieżki, których warianty mają istotne znaczenie kliniczne. Kolejne rozdziały były poświęcone charakterystyce genu i białka BRAF oraz wpływie mutacji na jego aktywację poprzez białko RAS oraz na aktywność kinazy. Wśród opisywanych wariantów znalazły się takie, które odpowiadają za rozwój wielu różnych typów nowotworów, jednak ich patogenność w odniesieniu do nowotworu wątroby jest nieznaną. Do takich wariantów Autorka zaliczyła warianty BRAF V600E oraz D594A. Doktorantka zwróciła również uwagę na dwa nowe warianty zamieszczone w bazie danych ICGC (the International Cancer Genome Consortium): BRAF E648G i L537M, których znaczenie funkcjonalne było nieznaną aż do momentu podjęcia niniejszych badań. Moja uwaga do tej części pracy dotyczy ryc. 3, przedstawiającej schematy aktywacji ścieżki MAPK/ERK dla trzech klas mutacji w genie *BRAF*. Na rycinie mógłby być również dodany schemat pokazujący prawidłową formę białka BRAF (BRAF WT). Podsumowując, opisy zawarte we wstępie dobrze uzasadniły potrzebę przeprowadzenia badań funkcjonalnych, które mogą mieć znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne.

W kolejnych dwóch rozdziałach Autorka w sposób zwięzły przedstawiła trzy hipotezy i dwa cele badań, które polegały na kompleksowej analizie wpływu czterech wymienionych powyżej mutacji, zmieniających sekwencję aminokwasów białka BRAF na proces transformacji nowotworowej w hodowanych *in vitro* komórkach wywodzących się z hepatocytów oraz ocenie zmian transkryptomu wskutek aktywacji ścieżki MAPK/ERK przez zmutowaną formę białka BRAF.

W dalszej części Doktorantka zawarła opis materiałów i zastosowanych metod. Autorka opisała wykorzystane ludzkie linie komórkowe THLE-2 i HEK293. Nie znalazłam w ocenianej pracy informacji, jaki był cel wykorzystania do badań komórek linii HEK293, którą uwzględniono jedynie w pierwszej analizie (western blot) i później niejako „porzucono”, bez wyjaśnienia. Uważam, że schemat, przedstawiający przebieg całego doświadczenia mógłby ułatwić śledzenie kolejnych etapów analiz. W pracy zabrakło mi ważnej informacji, ile w każdej analizie zastosowano powtórzeń biologicznych, a ile powtórzeń technicznych. Taka informacja mogłaby być zamieszczona na wyżej zaproponowanym schemacie. Proces przygotowania poszczególnych wariantów plazmidów oraz uzyskania transfekowanych komórek został bardzo dobrze opisany. W tabeli 5 warto było wskazać lokalizację w genomie referencyjnym (lub identyfikator rs) czterech pozycji, które poddano ukierunkowanej mutagenie. W opisie dotyczącym analizy western blot (rozdział 7.4.6) zabrakło informacji o sposobie normalizacji wyników. Ta informacja została zamieszczona dopiero w rozdziale 9. (Wyniki). W rozdziale 7.8.1, który przedstawia procedurę izolacji RNA nie wspomniano, czy została przeprowadzona ocena integralności preparatów RNA np. przy pomocy współczynnika RIN. Jest to jeden z kluczowych parametrów w ocenie jakości prób przed sekwencjonowaniem RNA. Z kolei w rozdziale 7.8.2, który opisuje procedurę przygotowania biblioteki i sekwencjonowanie RNA (wykonane przez firmę zewnętrzną) nie podano, jaka długość odczytów była generowana. Autorka dość oszczędnie opisała sposób obróbki bioinformatycznej odczytów uzyskanych po sekwencjonowaniu RNA oraz parametrach analizy, np. jak przeprowadzono normalizację wyników i jaka była liczba zmapowanych odczytów. Autorka podała kryterium graniczne FDR, pozwalające uznać, że gen podlega zróżnicowanej ekspresji, które wynosiło 0,1. Muszę przyznać, że jest to dość mało restrykcyjne kryterium, i w literaturze najczęściej przyjmuje się bardziej restrykcyjną wartość $FDR < 0,05$. Ponadto często zakłada się, że gen o zróżnicowanej ekspresji powinien spełniać jednocześnie drugie kryterium, dotyczące poziomu wartości fold change. Najczęściej przedstawia się ją jako wartość zlogarytmowaną ($\log_2\text{FoldChange}$), co pozwala uzyskać symetryczne zakresy danych dla genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji. W rozdziale opisującym przebieg analizy

qPCR zabrakło informacji na temat sposobu analizy wyników (metoda delta delta Ct czy krzywe standardowe).

Podsumowując, opis materiałów i metod zastosowanych w pracy jest w większości wyczerpujący i pokazuje różnorodność technik, jakie opanowała Doktorantka oraz duży nakład jej pracy. Uważam, że metodyka zastosowana w pracy została dobrana prawidłowo. Zwróciłabym uwagę, aby kolejność opisów zastosowanych metod była zgodna z kolejnością prezentowanych wyników. Uwaga ta dotyczy rozdziałów 7.9 i 8.1.

Zaprezentowane w kolejnej części pracy wyniki pokazały, że badane mutacje występują w miejscach o wysokim konserwatyźmie międzygatunkowym. W transfekowanych komórkach wykazano nadekspresję wszystkich form białek BRAF, jednak ich wpływ na aktywność kinazy, mierzoną jako poziom fosforylowanej formy białka ERK (P-ERK), był zróżnicowany. Największy poziom P-ERK odnotowano w przypadku wariantu BRAF V600E w komórkach linii THLE-2. Dla pozostałych form białka BRAF poziom P-ERK był równy lub niższy w porównaniu do typu dzikiego (WT). Na ryc. 8 nie naniesiono jednak wartości p przy wykresach, co utrudnia interpretację wyników analizy western blot. Wykazano, że spośród badanych wariantów tylko forma BRAF V600E powodowała aktywację ścieżki sygnałowej MAPK/ERK oraz była związana ze zwiększoną migracją komórek, charakterystyczną dla komórek nowotworowych. Stwierdzono również, że w przypadku wariantu BRAF V600E więcej komórek znajdowało się w fazie G2 cyklu komórkowego w porównaniu z komórkami z nadekspresją pozostałych form białka BRAF, jednak różnice nie były statystycznie istotne. Na podstawie powyższych wyników warianty BRAF L537M, D594A i E648G zostały uznane jako niepatogenne, a jako patogenny w rozwoju nowotworu wątroby uznano jedynie wariant BRAF V600E.

W następnej kolejności zbadano, jak konstytutywna aktywność ścieżki sygnałowej MAPK/ERK, wywołana mutacją BRAF V600E wpływa na transkryptom komórek linii THLE-2. Nadekspresja białka BRAF V600E spowodowała zmiany (głównie wzrost) ekspresji 306 genów względem komórek transfekowanych prawidłową formą białka BRAF (WT). W Tabeli 11 przedstawiono 25 genów o najbardziej podwyższonej i obniżonej ekspresji, uszeregowanych na podstawie wartości fold change. Dla lepszego zobrazowania wyników warto byłoby zamieścić w powyższej tabeli wartości FDR, a zmiany ekspresji fold change wyrazić jako wartości zlogarytmowane. W dalszej części pracy opisano walidację wyników sekwencjonowania RNA przy pomocy techniki qPCR dla 10 wybranych genów, zabrakło jednak informacji, na jakiej podstawie wybrano akurat te geny. Dla większości genów analiza qPCR potwierdziła wyniki uzyskane poprzez sekwencjonowanie RNA. Na wykresie

znajdującym się na ryc. 16 nie naniesiono jednak wartości p , co utrudnia interpretację wyników analizy qPCR. W kolejnych rozdziałach przedstawiono najistotniejsze ścieżki sygnałowe, regulowane przez geny podlegające zróżnicowanej ekspresji. Następnie potwierdzono, że istotny wzrost poziomu ekspresji transkryptów genów *BMP6*, *IL1B*, *TBX21*, *MMP10* i *SERPIND1* nastąpił jedynie w komórkach z nadekspresją wariantu BRAF V600E. Dla pozostałych wariantów BRAF poziom mRNA w/w genów utrzymywał się na poziomie zbliżonym do obserwowanego w komórkach transfekowanych niezmutowaną formą białka BRAF (WT). Ponieważ ścieżka sygnałowa MAPK/ERK prowadzi do aktywacji szeregu czynników transkrypcyjnych, Autorka zdecydowała się przeprowadzić analizę *in silico* promotorów 11 genów, dla których po sekwencjonowaniu RNA stwierdzono największy wzrost ekspresji. Wykazano, że w analizowanych promotorach występują sekwencje konsensusowe dla czynników transkrypcyjnych c-FOS, ELK-1, ETS-1 i SP1. Mimo, że aktywacja czynników transkrypcyjnych odbywa się poprzez interakcję białko-białko, warto byłoby sprawdzić, czy w wyniku pobudzenia ścieżki MAPK/ERK może dochodzić również do zwiększenia poziomu ekspresji genów kodujących w/w czynniki transkrypcyjne.

W rozdziale Dyskusja Autorka umiejętnie skonfrontowała własne wyniki z danymi dostępnymi w literaturze, wskazując dużą ich zgodność z wynikami uzyskiwanymi dla innych typów nowotworów ludzi i zwierząt modelowych. Zabrakło jednak wskazania słabych stron przeprowadzonych przez Autorkę analiz, np. podjęcia próby wyjaśnienia niepowodzenia walidacji części wyników uzyskanych po sekwencjonowaniu RNA. Ponadto można było pokusić się o wskazanie kierunku, w którym mogłyby być prowadzone dalsze badania. Lektura niniejszej pracy nasunęła również pytanie: czy Autorka uważa, że zasadne byłoby wykorzystanie techniki CRISPR/*Cas9* do wprowadzenia mutacji w określone miejsca genu *BRAF* w genomie komórek THLE-2 lub czy Autorka podjęła próby, aby takie analizy wykonać?

Zwieńczeniem pracy było przedstawienie wniosków, które moim zdaniem zostały sformułowane prawidłowo i podkreśliły istotny wkład wyników badań przeprowadzonych przez Doktorantkę w rozwój wiedzy o molekularnym podłożu rozwoju raka wątroby.

Badania wykonano w ramach projektu PRELUDIUM, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (pod kierownictwem Doktorantki) oraz w ramach finansowania przyznanego dla Krajowych Naukowych Ośrodków Wiodących (KNOW).

Praca doktorska została napisana starannie i zawiera nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne. Nie zawsze Doktorantka przestrzegała zasady, aby używać kursywę w skrótach, gdy mowa o genie czy mRNA. Uwaga ta dotyczy rozdziałów 7.2.3, 7.4, 7.7 i 8.7.

Ujednolicenia sposobu zapisu wymaga spis literatury, a w wielu przypadkach dane bibliograficzne są niepełne, np. brakuje nazwy czasopisma lub nazwisk autorów [rozdział 11, poz: 3, 13, 43, 59, 70, 85, 86, 89, 90, 130, 139, 140, 143, 155, 180, 196, 198, 203 i 210]. Dużą pomocą w tym zakresie mogą być narzędzia do zarządzania bibliografią, których wykorzystanie pozwoliłoby uniknąć tego typu niedociągnięć.

Wymienione powyżej błędy nie umniejszają jednak wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Lektura przedstawionej do oceny pracy pozwala stwierdzić, że Pani mgr Magdalena Śmiech jest dobrze przygotowana teoretycznie, posiada umiejętność prowadzenia badań naukowych, analizy i interpretacji wyników oraz umiejętność aplikowania o środki finansowe na realizację badań. Przede wszystkim należy jednak podkreślić wszechstronność Autorki w zakresie wykorzystania warsztatu badawczego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl 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 powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Śmiech i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duże walory poznawcze i kompleksowe zbadanie podjętego tematu badawczego, wnioskuję o jej wyróżnienie.**

Kowicka Drogan