

**Ocena**  
**pracy doktorskiej mgr Joanny Pęciak**  
**pt. Częstość występowania oraz poziom ekspresji EGFR<sup>vIII</sup>**  
**a jego biologiczna rola w wybranych typach nowotworów**

Przedstawiona do oceny praca mgr Joanny Pęciak wykonana została w Zakładzie Biologii Nowotworów Katedry Biologii Medycznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. n. med. Eweliny Anny Stoczyńskiej-Fidelus, prof. UMed.

W świetle wyników wielu badań nie ulega wątpliwości, że w transformacji nowotworowej mają miejsce amplifikacje i mutacje genu *EGFR*, kodującego receptor naskórkowego czynnika wzrostu o aktywności kinazy tyrozynowej. Odgrywa on istotną rolę nie tylko w patogenezie nowotworów złośliwych, ale przyczynia się do oporności na leczenie przeciwnowotworowe. Jedną z najczęściej występujących mutacji genu *EGFR* jest mutacja typu III (*EGFRvIII*), powstająca w wyniku delecji eksonów od 2. do 7., co skutkuje brakiem blisko 270 aminokwasów domeny zewnątrzkomórkowej receptora. Konsekwencją tej delecji jest utrata miejsca wiązania ligandów i stała aktywność kinazowa domeny cytoplazmatycznej, prowadząca do ciągłej aktywacji szlaków odpowiedzialnych za wzrost i przeżycie komórek, mobilność i inwazyjność, jak też oporność na terapię przeciwnowotworową. Zróżnicowana w zależności od zastosowanej metody badań, ekspresja wariantu III *EGFR* obserwowana jest w różnych typach nowotworów, przy najprawdopodobniej jej braku w komórkach prawidłowych, co czyni go potencjalnym markerem komórek nowotworowych i istotnym celem terapii ukierunkowanej. Wyniki wielu badań zmierzających do poznania mechanizmów leżących u podstaw amplifikacji i rearanżacji powodujących delecję, podobnie jak roli wariantu III *EGFR* w patogenezie nowotworów i wykorzystania go jako celu terapeutycznego nie są jednak jednoznaczne. Celem badań podjętych w pracy była 1. weryfikacja metod wykrywania wariantu *EGFRvIII* w materiale biologicznym oraz modeli wykorzystywanych w badaniach *EGFRvIII*, 2. ocena częstości występowania *EGFRvIII* w nowotworach jelita grubego, gruczołu krokowego, piersi i w glejakach wielopostaciowych oraz 3. przybliżenie roli wariantu III *EGFR* w rozwoju nowotworów.

Oceniana praca licząca 155 stron przygotowana została w klasycznym układzie w zakresie nauk biologii eksperymentalnej. Rozpoczyna ją 30-stronicowy Wstęp, w którym zawarto informacje dotyczące receptora naskórkowego czynnika wzrostu naskórka (*EGFR*) oraz jego wariantu III (*EGFRvIII*). Opisana została struktura genu i białka, aktywowanych

szlaków transmisji sygnału, zmiany molekularne towarzyszące transformacji nowotworowej i częstość ich występowania w różnych nowotworach oraz znaczenie w terapiach celowanych. W kolejnych rozdziałach przedstawiono podstawowe, ogólne dane odnośnie do metod detekcji wariantu EGFRvIII na poziomie DNA, mRNA i białka. Dobór zagadnień zaprezentowanych w tej części pracy, jako wprowadzenie w problematykę będącą przedmiotem badań, nie budzi wątpliwości. Zagadnienia przedstawione we Wstępie stanowią bardzo dobre uzasadnienie badań prowadzonych przez Doktorantkę i przejrzyste zarysują problemy badawcze podjęte w części eksperymentalnej.

Część eksperymentalna pracy jest prawidłowo opisana i zilustrowana. Rozdział Metody zawiera opis podejść metodycznych i pokazuje, że zrealizowano budzący uznanie rozległy zakres badań, za pomocą licznych technik laboratoryjnych stosowanych w biologii komórkowej i molekularnej, w tym analizy żywotności, proliferacji, senescencji i apoptozy komórek oraz inwazyjności *in vitro* i *in vivo*, a także ekspresji na poziomie mRNA i białka, sekwencjonowania metodą Sangera, sekwencjonowania nowej generacji (NGS), multipleksowej amplifikacji sondy zależnej od ligacji (MLPA), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, czy barwienia immunoenzymatycznego. Na uznanie zasługuje podjęcie próby otrzymania przeciwciał rozpoznających wariant III EGFR. Jednak jak wykazały przeprowadzone analizy otrzymane przeciwciało okazało się jednak wiązać również z niezmutowaną formą EGFR. Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym z resekcji chirurgicznych od 37 pacjentów z nowotworami jelita grubego (Kutnowski Szpital Samorządowy oraz Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. WAM – Centralny Szpital Weteranów w Łodzi), 46 pacjentów z nowotworami gruczołu krokowego (Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Pirogowa w Łodzi), 43 pacjentek z nowotworami piersi (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi) oraz od 29 pacjentów z glejakami wielopostaciowymi (Wojewódzki Specjalistyczny Szpital w Olsztynie). W badaniach wykorzystano również komercyjnie dostępne linie komórkowe glejaków wielopostaciowych charakteryzujące się endogenną ekspresją EGFRvIII, tj. heterogenną linię komórkową DK-MG, zawierającą populację komórek wykazujących zróżnicowaną ekspresję zmutowanego receptora oraz linię CAS-1 wykazującą ekspresję zmutowanej formy w około 1% komórek. Badania prowadzono również na liniach komórkowych z egzogennie wprowadzonym EGFRvIII oraz pierwotne hodowle komórkowe. Wyniki badań zaprezentowano w formie 26 rycin i zdjęć mikroskopowych oraz 9 zestawień tabelarycznych.

W pierwszej części pracy doświadczalnej z uwagi na duże rozbieżności w literaturze przedmiotu dotyczące częstości występowania wariantu III EGFR w materiale biologicznym podjęto ocenę przydatności stosowanych metod do jego detekcji. Ta część pracy w mojej ocenie jest szczególnie wartościowa. Stosowanie właściwych metod badawczych jest warunkiem *sine qua non* dla właściwej interpretacji wyników i w konsekwencji wnioskowania

dotyczącego biologii komórki. Wykazano, że sekwencjonowanie metodą Sanger'a może mieć zastosowanie jedynie wówczas, gdy znane jest miejsce wystąpienia pęknięć w intronach, które są swoiste dla każdego przypadku. Z kolei sekwencjonowanie na poziomie mRNA/cDNA tego samego fragmentu materiału biologicznego może nie dostarczać jednoznacznych wyników z uwagi na ekspresję zmutowanej formy w zróżnicowanym odsetku komórek. Również reakcja MLPA z sondami komplementarnymi dla eksonów 1-8 oraz 13, 18 i 25 genu *EGFR* nie wydaje się być właściwą techniką badawczą ze względu, jak wykazano, na niską czułość i w konsekwencji wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych z uwagi na duży odsetek komórek *EGFRvIII*-pozytywnych, ale z niską ekspresją tego onkogenu. Z kolei technika FISH z sondami wiążącymi się do DNA genu *EGFR* oraz centromeru chromosomu 7. może być stosowana do analiz hodowli pierwotnych wyprowadzonych z materiału pochodzącego od pacjentów jedynie jako analiza pomocnicza z uwagi na brak sond specyficznych dla DNA kodującego zmutowany receptor. Mimo, że metoda Western Blot pozwala na bardzo wyraźne, rozróżnienie formy zmutowanej od niezmutowanej, to jej niska czułość, stwarza możliwość uzyskania wyników fałszywie negatywnych. Ekspresja *EGFRvIII* na poziomie białka metodą podwójnego barwienia komercyjnie dostępnymi przeciwciałami przeciwko całkowitemu *EGFR* oraz prawidłowemu receptorowi, nie pozwala na oszacowanie odsetka komórek *EGFRvIII*-pozytywnych. W świetle przedstawionych w dysertacji wyników badań najbardziej optymalną metodą wykrywania wariantu III receptora *EGFR* wydaje się być technika RT-PCR z zastosowaniem starterów specyficznych do cDNA zmutowanego receptora, pozwalająca na określenie względnej ekspresji mRNA prawidłowego i zmutowanego *EGFR* oraz bezwzględnej liczby cząsteczek cDNA zmutowanego genu.

W kolejnym etapie pracy wykorzystując wytypowaną jako najbardziej wiarygodną i czułą metodę RT-PCR określono częstość występowania zmutowanej formy *EGFR* w nowotworach wywodzących się z różnych tkanek. Przeanalizowano ogółem 155 wycinków materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów. Najwyższą częstość występowania mRNA *EGFRvIII*, bo blisko w 30% przebadanych prób, wykazano w glejakach wielopostaciowych. Zdecydowanie niższą ekspresję, bo w około 8% ujawniono w nowotworach jelita grubego i w 6,5% w nowotworach gruczołu krokowego. W przypadku raka piersi nie stwierdzono występowania tej mutacji.

*W tym miejscu nasuwa się pytanie czy w przeprowadzonej analizie nie należałoby uwzględnić obok lokalizacji guza również typu, patomorfologii, czy stopnia złośliwości badanych nowotworów. W rozdziale Materiał zabrakło bliższej charakterystyki badanych nowotworów. De facto w pracy nie badano różne typy nowotworów, ale nowotwory wywodzące się z różnych narządów. Może to leży u podstaw obserwowanej przez innych autorów ekspresji zmutowanej formy *EGFR* w raku piersi?*

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że wariant III genu *EGFR* z najwyższą częstością występuje w przypadku glejaków wielopostaciowych, przy czym poziom jego ekspresji może być bardzo zróżnicowany. Pozwala to wyodrębnić dwie grupy w obrębie tego nowotworu, tj. glejaki z wysoką i glejaki z niską ekspresją *EGFRvIII*, co wydaje się szczególnie istotne w przypadku wykorzystania tego wariantu w terapii ukierunkowanej. Niewątpliwie w opracowaniu skutecznej terapii celowanej nieodzowne jest dysponowanie odpowiednim modelem *in vitro*. W kolejnym etapie pracy podjęto zatem badania mające na celu ewaluację modeli badawczych najczęściej wykorzystywanych w analizach *in vitro* wariantu III *EGFR*, w tym stabilnych linii komórkowych z egzogenną ekspresją badanego wariantu receptora, hodowli trójwymiarowych na przykładzie neurosfer oraz linii komórkowych z endogenną ekspresją *EGFRvIII*, które jak wykazano w pracy, wydają się być modelem dostarczającym najbardziej wiarygodnych wyników. Na podstawie przeprowadzonych analiz w badaniach udziału wariantu III *EGFR* w biologii komórek wykorzystano linię komórkową DK-MG, z której metodą klonowania z pojedynczej komórki z zastosowaniem seryjnych rozcieńczeń wyselekcjonowano i ustabilizowano sublinię z wysoką, tj. w około 50% komórek oraz niską, tj. w około 5% komórek ekspresją *EGFRvIII*. Nie udało się natomiast ustabilizować subpopulacji charakteryzującej się wyłącznie komórkami *EGFRvIII*-negatywnymi, co wskazuje na istotną funkcję biologiczną komórek z ekspresją wariantu III *EGFR*. Szczegółowe analizy wykazały ponad 200-krotną różnicę w poziomie ekspresji *EGFRvIII*, a także różnice w występowaniu ampikonów ekstrachromosomalnych i odsetku komórek *EGFRvIII*-pozytywnych oraz różnice na poziomie molekularnym w obu podliniach. Uzyskane wyniki badań sugerują, że ekspresja wariantu III *EGFR* może być związana z przejściem epitelialno-mezenchymalnym, tempem proliferacji i żywotności komórek oraz ich inwazyjnością i tumorogennością. Wykazano również, że komórki *EGFRvIII*-pozytywne poprzez produkcję niektórych czynników wzrostu mogą oddziaływać parakrynnie na komórki *EGFRvIII*-negatywne.

*Jak Doktorantka mogłaby zinterpretować większy efekt pożywki kondycjonowanej izolowanej z hodowli komórek z niską ekspresją EGFRvIII na zwiększenie tempa proliferacji komórek? Jaki wpływ na biologię komórek różniących się odsetkiem komórek EGFRvIII-pozytywnych może mieć liczba kopii EGFRvIII?*

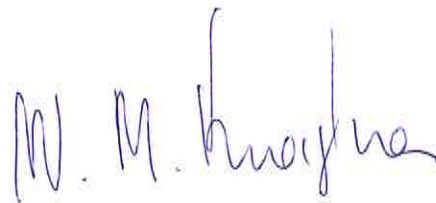
Uzyskane wyniki badań dotyczące weryfikacji i użyteczności metod stosowanych w analizach wariantu III receptora *EGFR* oraz jego obecności i potencjalnej roli w nowotworach przedyskutowane zostały w krytycznej 23-stronicowej dyskusji i podsumowane siedmioma wnioskami. Wniosek nr 2 w kontekście wniosku nr 6 wydaje się niezbyt trafnie sformułowany. Jak sama Autorka podkreśla w rozdziale Dyskusja (str.109-110), wykorzystanie w terapii celowanej *EGFRvIII* powinno uwzględniać zarówno ekspresję na poziomie mRNA, jak i białka, stąd we wniosku nr 2 w opinii recenzenta powinno

znaleźć się stwierdzenie, że ocena ekspresji *EGRFvIII* za pomocą metody *RT-PCR* wydaje się najbardziej przydatna do oceny poziomu mRNA, a nie stratyfikacji pacjentów do terapii celowanej.

Biorąc pod uwagę stronę formalną dysertacji stwierdzam, że układ pracy jest poprawny, rozprawa przygotowana została z dużą starannością pod względem zarówno językowym i edytorskim, jak i dokumentacji wyników. W pracy wykorzystano 198 pozycji literaturowych, a jej przejrzystość wzbogaca wykaz skrótów i symboli oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Uchybienia są bardzo nieliczne, jak na przykład brak danych referencyjnych prac własnych (str. 142-143), brak stosowania jednolitej zasady w spisie literatury dotyczącej tytułów czasopism (wymienne pełne nazwy i skróty), czy w ogóle brak tytułu czasopisma (np. poz. 125, 129).

### **Podsumowanie**

Pracę doktorską mgr Joanny Pęciak pt. *Częstość występowania oraz poziom ekspresji EGFR<sup>vIII</sup> a jego biologiczna rola w wybranych typach nowotworów* oceniam w pełni pozytywnie. Praca zawiera wyniki szeroko zakrojonych badań mających na celu weryfikację metod wykrywania wariantu III receptora naskórkowego czynnika wzrostu, ewaluacji modeli badawczych wykorzystywanych w jego analizie oraz identyfikacji mechanizmów molekularnych, których zaburzenia z jego udziałem mają miejsce w komórkach nowotworowych. Uzyskane wyniki niewątpliwie wzbogacają wiedzę w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Przedstawiona dysertacja jest dowodem znaczącej aktywności naukowej Doktorantki i opanowania bogatego warsztatu badawczego. Znajduje to również potwierdzenie we współautorskim dorobku publikacyjnym mgr Joanny Pęciak obejmującym 11 prac, opublikowanych w latach 2014 – 2019 w czasopismach z listy JCR oraz współautorstwo zgłoszenia patentowego. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Pęciak spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. 2021 poz. 478 ze zm.). Biorąc pod uwagę wartość naukową rozprawy oraz rozległy zakres badań przeprowadzonych za pomocą nowoczesnych technik badawczych praca w mojej opinii zasługuje na wyróżnienie.



prof. dr hab. Wanda M. Krajewska

Łódź 4 września 2023 r.