



Recenzja /

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 05.11.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Pęciak pt.: „Częstość występowania oraz poziom ekspresji $EGFR^{vIII}$ a jego biologiczna rola w wybranych typach nowotworów”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Pęciak została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Eweliny Anny Stoczyńskiej-Fidelus, prof. Uczelni w Zakładzie Biologii Nowotworów, Katedrze Biologii Medycznej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska była współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.04.00-10-037/11-00) i Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/0-166-01/503-01-002 oraz 503-01-003).

Rozprawa doktorska mgr Joanny Pęciak porusza bardzo istotny temat dotyczący opracowania optymalnej metody wykrywającej jedną z najczęściej zmutowanych form genu kodującego receptor naskórkowego czynnika wzrostu – $EGFR^{vIII}$. Praca doktorska dotyczy również badań nad biologiczną rolą $EGFR^{vIII}$ w komórkach glejaka oraz oceny przydatności modeli komórkowych do badań nad $EGFR^{vIII}$. Opracowanie metody pozwalającej na detekcję $EGFR^{vIII}$ jest utrudnione ze względu na znaczną rozległość fragmentu ulegającego delecji (od 2 do 7 eksonu) i występowanie różnych miejsc pęknięć w obrębie sekwencji intronów 1 i 7 u różnych chorych. Detekcja $EGFR^{vIII}$ może być również utrudniona ze względu na heterogenność w obrębie tkanki nowotworowej. Obecnie najbardziej wiarygodną metodą detekcji $EGFR^{vIII}$ jest sekwencjonowanie całego genu $EGFR$ z użyciem metody sekwencjonowania nowej generacji – NGS, który jest coraz częściej używany

w rutynowej diagnostyce molekularnej, jednak wciąż nie jest dostępny w każdym laboratorium molekularnym. *EGFR^{vIII}* jest wykrywany w różnych typach nowotworów m.in. w glejakach, raku piersi, raku jelita czy raku płaskonabłonkowym głowy i szyi. Ponieważ *EGFR^{vIII}* jest wykrywany jedynie na powierzchni komórek nowotworowych może stanowić potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej. Jednakże, pomimo intensywnych badań do tej pory nie opracowano skutecznej terapii celowanej w *EGFR^{vIII}*.

W związku z powyższym temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i istotny dla poszerzenia wiedzy o roli *EGFR^{vIII}* w biologii i progresji nowotworów oraz opracowania wiarygodnej metody detekcji *EGFR^{vIII}*. Badania nad poznaniem biologicznej roli zmutowanego receptora mogą przyczynić się do rozwoju nowych terapii celowanych.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 155 strony. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na następujące rozdziały: wstęp merytoryczny, cele pracy, materiał, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis rycin, spis tabel oraz piśmiennictwo. Bibliografia pracy doktorskiej obejmuje 198 anglojęzycznych pozycji literaturowych pochodzących najczęściej z ostatnich kilku lat. Praca doktorska zawiera 27 rycin oraz 14 tabel, w większości obrazujących uzyskane wyniki, co pozwala na dokładne prześledzenie i analizę wszystkich wyników. W pracy doktorskiej zamieszczono dodatkowo wykaz 11 artykułów opublikowanych w czasie realizacji przewodu doktorskiego, w których Doktorantka jest współautorem (w tym jednego jako pierwszy autor). Wszystkie przedstawione w wykazie publikacje są wysoko punktowane i mają zasięg międzynarodowy. Doktorantka jest również współautorem jednego zgłoszenia patentowego RP.

Rozprawa doktorska napisana jest starannie, w zwięzłym i syntetycznym stylu. Wstęp merytoryczny stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. Wstęp jest podzielony na 3 podrozdziały, w których przedstawiono szczegółowy opis na temat roli EGFR w nowotworach, *EGFR^{vIII}* jako potencjalnego celu w terapii celowanej oraz metodologii wykrywania *EGFR^{vIII}*. We Wstępie w pierwszym podrozdziale Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawiła charakterystykę genu *EGFR* i jego struktury białkowej, opisała dwa modele aktywacji sygnalizacji EGFR oraz

zmiany molekularne charakterystyczne dla EGFR. We wstępie w drugim podrozdziale Doktorantka bardzo dokładnie przedstawiła charakterystykę zmutowanej formy *EGFR^{vIII}* i jego struktury białkowej, podała częstość wykrywania mutacji *EGFR^{vIII}* w różnych typach nowotworów oraz opisała możliwe terapie celowane ukierunkowane na EGFR/*EGFR^{vIII}*, które obecnie są w trakcie badań klinicznych i przedklinicznych. Trzeci podrozdział Wstępu zawiera przegląd metod stosowanych do detekcji mutacji *EGFR^{vIII}* w komórkach i tkankach. W tym podrozdziale Doktorantka opisuje zasadę stosowanych obecnie metod w celu detekcji mutacji *EGFR^{vIII}* na poziomie genomowego DNA (sekwencjonowanie metodą Sanger, MLPA i FISH), na poziomie mRNA/cDNA (real-time RT-PCR) oraz na poziomie białka (barwienie immunocytochemiczne i Western Blotting). W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy w opisie metody MLPA w rozdziale 4.18 na str. 49 występuje drobny błąd edytorski cyt.: „Jako próbkę kontrolną wykorzystano DNA wyizolowane z krwi obwodowej od pacjentów, u których wykryto choroby nowotworowej”. Ponadto w pracy brakuje informacji jaka objętość krwi została pobrana od pacjentów i jaką metodę zastosowano do izolacji DNA z krwi obwodowej. Wymagane jest wyjaśnienie tej kwestii. Jednakże, takie drobne błędy i niedociągnięcia nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

W pracy postawiono cztery główne cele badawcze, których poprawność sformułowania nie budzi wątpliwości. Cele pracy zostały przedstawione zgodnie z planem wykonywanych badań, a należały do nich: 1. Ocena przydatności metod wykrywania *EGFR^{vIII}* w materiale pobranym od pacjentów onkologicznych oraz w liniach nowotworowych oraz wytypowanie najbardziej optymalnej z nich; 2. Analiza częstości wykrywania *EGFR^{vIII}* w nowotworach jelita grubego, gruczołu krokowego, piersi oraz w glejakach wielopostaciowych; 3. Charakterystyka modeli badawczych do badań nad biologią *EGFR^{vIII}*; 4. Próba zbliżenia się do wyjaśnienia wybranych aspektów biologii *EGFR^{vIII}*.

W rozdziale Materiał Doktorantka opisała materiał wykorzystany do badań w ramach pracy doktorskiej tj. wycinki tkankowe otrzymane w wyniku resekcji chirurgicznych, 11 linii komórkowych, cztery myszy SCID z upośledzoną odpornością oraz szereg wektorów plazmidowych. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane. W rozdziale Metody Doktorantka bardzo dokładnie opisała liczne metody badawcze, w tym m.in. hodowle komórkowe linii komercyjnych i

pierwotnych, klonowanie z pojedynczej komórki metodą seryjnych rozcieńczeń, badanie żywotności i apoptozy komórek, test inwazyjności, badania *in vivo* na myszach SCID, reakcję PCR w czasie rzeczywistym, sekwencjonowanie metodą Sangera, sekwencjonowanie nowej generacji, MLPA, FISH, Western Blotting i barwienie immunocytochemiczne. W pracy doktorskiej zastosowano również metody biotechnologiczne tj. otrzymanie przeciwciała rozpoznającego *EGFR^{vIII}*, produkcja wektora lentiwirusowego, transdukcja komórek wektorami lentiwirusowymi oraz transfekcja komórek plazmidowym DNA.

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i wykresy ułatwiają ich analizę. W pierwszej części pracy doktorskiej wytypowano zmodyfikowaną metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym polegającą na półilościowej ocenie ekspresji *EGFR^{vIII}* jako najbardziej optymalną metodę detekcji *EGFR^{vIII}* w celu stratyfikacji pacjentów do terapii celowanej. Wykazano, że metoda ta charakteryzuje się dużo wyższą czułością niż inne stosowane metody. W kolejnych badaniach poddano analizie ekspresji i bezwzględnej liczby cząsteczek mRNA 155 wycinków nowotworowych jelita grubego, piersi, gruczołu krokowego oraz glejaków wielopostaciowych. W pracy wykazano, że *EGFR^{vIII}* jest wykrywany w glejakach wielopostaciowych z najwyższą częstością - 27,59%, natomiast z mniejszą częstością w raku jelita grubego - 8,11% oraz w raku gruczołu krokowego - 6,52%, przy czym odnotowano znaczne różnice w ekspresji i liczbie kopii pomiędzy poszczególnymi próbkami. W żadnym spośród 43 analizowanych wycinków nowotworów piersi nie wykryto *EGFR^{vIII}*. W tym miejscu należy zauważyć, że w rutynowej diagnostyce molekularnej do detekcji mutacji do celów personalizacji terapii przeciw-nowotworowej stosuje się tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie, a analiza molekularna w takiej tkance nowotworowej zawsze musi być poprzedzona oceną histopatologiczną z zaznaczeniem fragmentu tkanki z jak największym odsetkiem komórek nowotworowych (minimum 20%). W związku z tym nasuwa się następujące pytanie: Czy wiadomo jaki odsetek komórek nowotworowych zawierały analizowane w pracy doktorskiej wycinki nowotworowe? Jeśli w pracy nie zastosowano oceny histopatologicznej to istnieje niebezpieczeństwo, że analizie molekularnej poddano wycinki tkankowe nienowotworowe lub z niższym niż 20% odsetkiem komórek nowotworowych. Ważnym aspektem do rozważenia w dalszych badaniach jest sprawdzenie czy opracowana metoda może być przydatna w detekcji

EGFR^{vIII} w tkankach nowotworowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie oraz we frakcji wolno-krażącego DNA pochodzącego z komórek nowotworowych (ctDNA) z zastosowaniem płynnej biopsji (osocze lub nawet płyn mózgowo-rdzeniowy u chorych z glejakiem), co przy bardzo czułej metodzie daje możliwość wykrycia *EGFR^{vIII}* w całkowitej puli krażącego nowotworowego DNA eliminując ograniczenia wynikające z heterogenności guza.

W ramach badań prowadzonych w drugiej części pracy doktorskiej wykazano, że spośród wszystkich analizowanych modeli do badań nad *EGFR^{vIII}*, najbardziej optymalnym modelem jest heterogenna linia komórkowa DK-MG oraz jej pochodne uzyskane metodą seryjnych rozcieńczeń. Na opracowanym modelu wykazano, że występowanie *EGFR^{vIII}* nawet w niewielkiej subpopulacji komórek nowotworowych może wpływać na biologię całej populacji komórek. Ponadto w pracy wykazano, że obecność *EGFR^{vIII}* zmniejsza wrażliwość komórek na apoptozę, senescencję, zwiększa proliferację oraz odsetek udanych prób zainicjowania guza w modelu podskórnym u myszy SCID. W pracy wykazano również, że komórki *EGFR^{vIII}*-negatywne są zależne od *EGFR^{vIII}*-pozytywnych w ogólnej populacji komórek. Uzyskane w pracy wyniki niewątpliwie będą przydatne w optymalizacji i rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

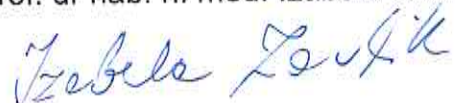
Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano siedem wniosków.

Wnioski Końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Bardzo wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska pt: „Częstość występowania oraz poziom ekspresji *EGFR^{vIII}* a jego biologiczna rola w wybranych typach nowotworów” w pełni spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanna Pęciak do

dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

A handwritten signature in blue ink, reading "Izabela Zawlik". The signature is written in a cursive style with a large initial 'I' and 'Z'.