

Poznań, 7.09.2020

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

dr hab. Maciej Giefing, prof. PAN
Kierownik Zakładu Genetyki Nowotworów
e-mail: maciej.giefing@igcz.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Majer-Burman pt. „Novel molecular disease monitoring tools for clear renal cell carcinoma (ccRCC)”

Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Majer-Burman było poszukiwanie nowych biomarkerów, które mogłyby zostać wykorzystane w małoinwazyjnej lub bezinwazyjnej diagnostyce jasnokomórkowego raka nerki. Doktorantka stawia hipotezę, że badanie wolnokrążącego DNA, tak zwanego cfDNA, za pomocą technik wysokoprzepustowych w osoczu pacjentów jak również badanie miRNA wyizolowanego z guza nowotworowego może uwidocznienie unikatowe zmiany genetyczne i tym samym umożliwić wczesne diagnozowanie pacjentów i prognozowanie przebiegu choroby.

Niewątpliwie stawiana hipoteza, jak i cała rozprawa doktorska, wpisuje się tym samym w bardzo obecnie popularny ale zarazem istotny nurt badań w obrębie genetyki nowotworów, mianowicie w poszukiwanie sposobu poprawy diagnostyki, stratyfikacji pacjentów nowotworowych a co za tym idzie, terapii zindywidualizowanej. Obserwuje się obecnie wysyp prac naukowych traktujących o różnych aspektach badania cfDNA czy miRNA na przykład poszukiwaniu markerowych mutacji, zmian metylacji DNA czy istotnych statystycznie zmian w stężeniu cfDNA u pacjentów w porównaniu z osobami zdrowymi. Należy podkreślić, że tego typu badania nie tylko poszerzają naszą wiedzę z dziedziny genetyki człowieka ale także mogą dostarczyć nowych informacji o potencjalnym zastosowaniu w praktyce klinicznej. Wybór przedmiotu badań jest też niewątpliwie trafny z

przyczyn epidemiologicznych. Choroby nowotworowe to druga po chorobach układu krążenia przyczyna zgonu Polaków, a rak nerki plasuje się w pierwszej dziesiątce najczęstszych nowotworów w Polsce.

Przygotowana przez Panią mgr Majer-Burman rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Liczy 116 stron i jest podzielona na wstęp, cel badań, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Całość rozpoczynają streszczenia przygotowane w języku polskim jak i angielskim oraz spis treści a kończy bibliografia zawierająca 179 pozycji, spisy rycin i tabel, spis stosowanych skrótów oraz suplement. Jeśli chodzi o układ pracy to zabrakło mi jedynie wniosków pracy w oddzielnych podpunktach korespondujących z wyszczególnionymi celami, co znacznie ułatwiłoby porównanie założonych celów i otrzymanych wyników.

Zanim przejdę do omawiania kwestii merytorycznych chciałbym trochę miejsca poświęcić aspektom redakcyjnym przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Jestem zmuszony stwierdzić, że rozprawa pod względem redakcyjnym jest przygotowana po prostu źle. Tekst zawiera zdecydowanie ponadprzeciętną liczbę literówek, pominiętych odstępów, niekonsekwencji w zapisie (np. zdanie rozpoczynane od słowa miRNA raz jest pisane z wielkiej a raz z małej litery), wielkich liter w środku zdania, błędów interpunkcyjnych itd. Błędy tego typu znalazłem na prawie każdej stronie rozprawy! Na wspomniane błędy redakcyjne nakłada się dość słaba warstwa językowa. Doktorantka stosuje kalki z języka polskiego np. „operacja” chirurgiczna to po angielsku „surgery” a nie „operation”, a np. szyk zdania: „The first step of an analysis of cfDNA sequencing data was creating fastq files” powinien po angielsku być następujący: „The first step of cfDNA sequencing data analysis was the creation of fastq files”. Do tego w pracy znaleźć można całe mnóstwo dziwnych sformułowań takich jak: „imaging techniques” zamiast „imaging techniques” albo „For now even with the access to drugs the main RCC treatment approach still is a biopsy” – biopsja nie jest przecież sposobem leczenia co sugeruje powyższe stwierdzenie; albo „treatment personalized individually”; czy jeszcze gdzie indziej „Recently copy number variations are widely tested as cancer biomarkers due to them being scattered through genome in cancer cells” – można się jedynie z trudem domyślać co Doktorantka chciała w tym zdaniu powiedzieć. Do tego dochodzą skróty myślowe utrudniające odbiór tekstu takie jak: „chromosomal aberrations analysis of cfDNA” – cfDNA nie zawiera chromosomów, chodziło raczej o „chromosomal aberration analysis using, albo by the means of cfDNA” albo: „Microarrays are inexpensive, widely available and sensitive even for small amount of miRNA. Unfortunately, the primer design can heavily influence the results”. Po pierwsze Doktorantka powinna raczej stosować „low concentrations of miRNA” zamiast „small

amount of miRNA” a po drugie o jakich starterach jest tu mowa w kontekście mikromacierzy? Mogę się jedynie domyślać, że jest to nieumiejętny przeskok do dalej omawianej techniki qPCR.

Podsumowując omawiane kwestie redakcyjne stwierdzam, że jest dla mnie niezrozumiałe dlaczego tekst przygotowano w języku angielskim, który w znacznym stopniu utrudnił doktorantce napisanie dobrej rozprawy.

Przejdę teraz do omówienia poszczególnych części rozprawy.

Wstęp. W dobry sposób uzasadnia on konieczność poszukiwania nowych markerów nowotworowych a tym samym zasadność badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej. Doktorantka przytacza szereg doniesień literaturowych, gdzie wykazano, że cfDNA izolowane z osocza pacjentów może stanowić dobry materiał diagnostyczny a tym samym stanowić podstawę małoinwazyjnej diagnostyki nowotworów. Jest to zarazem zgodne z obserwacjami poczynionymi w mojej grupie badawczej, gdzie opracowywany jest właśnie test diagnostyczny dla raka krtani oparty o charakterystyczne zmiany w poziomie metylacji wolnokrążącego DNA izolowanego z osocza. Zgadzam się tym samym z doktorantką, że badanie cfDNA może być nakierowane na wiele aspektów takich jak poszukiwanie mutacji, zmian w metylacji DNA czy zmian w samym stężeniu cfDNA. Nie zgadzam się natomiast z konkluzją mgr Majer-Burman z końcówki wstępu, która stwierdza, że zanim biomarkery oparte o miRNA wejdą do praktyki klinicznej konieczne będzie poznanie ich funkcji. Biologiczna funkcja biomarkera jest rzeczą drugorzewną. Istotna jest natomiast jego czułość i swoistość. Niemniej jednak stwierdzam, że wstęp rozprawy spełnia swoje funkcje i pomimo ogromu błędów redakcyjnych omówionych wcześniej czyta się go dobrze. W tej części rozprawy Doktorantka zawarła także cele pracy, które jednak mają dla mnie bardziej charakter kamieni milowych opisywanych badań aniżeli poszczególnych celów jakie zamierza się osiągnąć realizując prace badawcze.

Materiały i metody. Zdecydowanie na uznanie w recenzowanej rozprawie doktorskiej zasługuje wykorzystanie licznych zaawansowanych, wysokoprzepustowych technik molekularnych takich jak Infinium assay czy NGS. Co ważne użyte techniki są dobrze opisane a ponadto Doktorantka przygotowała bardzo czytelne ryciny (ryc. 5, 6, 7) obrazujące kolejność i przebieg prowadzonych badań. Ryciny te w dobry sposób przedstawiają dwie zasadnicze części rozprawy, pierwszą dotyczącą analizy cfDNA w osoczu i moczu pacjentów z rakiem nerki i drugą dotyczącą próby stworzenia panelu miRNA, którego badanie w

materiale pobranym z guza mogłoby usprawnić diagnostykę podtypów raka nerki. Zadbano również o uzyskanie wymaganej zgody Komisji Bioetycznej.

Natomiast kwestią budzącą moją wątpliwość jest fakt wykorzystania jedynie jednego genu referencyjnego, U6, w analizach qPCR. Jest to moim zdaniem błąd w planowaniu eksperymentu, który może powodować otrzymanie niewiarygodnych wyników w dalszej części pracy. Wystarczy spojrzeć na *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*, przygotowany przez brytyjski National Measurement System lub jakiegokolwiek inne opracowanie tego typu aby wyczytać, że zalecane jest stosowanie kilku genów referencyjnych lub dokładna, eksperymentalna walidacja stabilności ekspresji stosowanego genu referencyjnego, której w ocenianej rozprawie nie przeprowadzono.

Wyniki. Badania przeprowadzone w ramach pierwszej części rozprawy dotyczącej analizy cfDNA w osoczu i moczu pacjentów z rakiem nerki przyniosły w większości wyniki negatywne. Identyfikacja zmian liczby kopii DNA w genomie nowotworowym na podstawie analizy cfDNA z moczu nie powiodła się w ogóle. Trochę lepiej wypadło analogiczne badanie z wykorzystaniem cfDNA z osocza pacjentów gdzie w dwóch przypadkach Doktorantka zaobserwowała utratę krótkiego ramienia chromosomu trzeciego w analizie cfDNA. Niestety identyfikowano również całe mnóstwo wyników fałszywie pozytywnych co w znacznym stopniu umniejsza wiarygodność zastosowanego podejścia eksperymentalnego.

Wyniki dotyczące drugiej części rozprawy są bardziej obiecujące. Doktorantka wykonała ciekawą metaanalizę, dzięki której wyróżniono panel genów miRNA potencjalnie umożliwiających różnicową diagnostykę podtypów raka nerki. Na uznanie zasługuje też dobrze przygotowana i bardzo informatywna rycina 20 obrazująca wyniki przeprowadzonej metaanalizy. W dalszej części rozprawy mgr Majer-Burman opisuje udaną walidację za pomocą techniki qPCR niektórych zależności zaobserwowanych w metaanalizie co jest w ładny sposób zobrazowane na rycinie numer 26 jako sugerowany panel miRNA do diagnostyki raka nerki. Należy jednak zwrócić uwagę, że wyniki pPCR ze względu na zbyt małą liczbę genów kontrolnych są mało wiarygodne. Ponadto Doktorantka powinna wykorzystać regresję logistyczną do oceny przydatności potencjalnego testu diagnostycznego. Tego typu panele genów wymagają również potwierdzenia prawidłowego funkcjonowania na niezależnej i zdecydowanie bardziej licznej grupie chorych z rakiem nerki. Wymienione elementy są kluczowe aby można było uznać proponowany panel genów za wiarygodny test genetyczny. Tym samym, otrzymany wynik jest jedynie wstępną ciekawostką, która wymaga jeszcze sporego nakładu pracy aby stała się wiarygodnym wynikiem naukowym.

Niestety również w tej części uwidacznia się wszechobecny bałagan tej rozprawy. Doktorantka myli numerację rycin, która jest inna w tekście i inna w podpisach pod rycinami. Dla ryciny numer 25 w ogóle nie znalazłem odnośnika w tekście. Szczytem jest już natomiast fakt, że spis rycin, który jak sądziłem pomoże mi odnaleźć niektóre z nich, rozpoczyna się od pozycji numer 27. Doktorantka zgubiła opis wcześniejszych 26 rycin! Zadania nie ułatwia też spis tabel zamieszczony na końcu rozprawy który jest niekompletny, brakuje opisu dla tabel numer 9, 10 i 13 a pozostałe tabele opisane są nie po kolei.

W tej części rozprawy znalazłem także szereg innych słabych punktów. Do najważniejszych zaliczam mało liczne grupy pacjentów, które w dalszych analizach są jeszcze dzielone na podgrupy. W konsekwencji niektóre grupy są jednoosobowe co uniemożliwia wyciągnięcie jakichkolwiek wiarygodnych wniosków z przeprowadzonych badań (str. 39 i 58). W tej części rozprawy pojawia się także bałagan w określaniu liczebności grup. Np. Doktorantka stwierdza na stronie 39 że grupa pacjentów zawierała 19 osób w tym 9 kobiet i 11 mężczyzn. Dalej liczby pacjentów przedstawionych na wykresach nie zgadzają się z liczbami pacjentów w podpisie pod ryciną oraz danymi z tabel (np. rycina 11 i 12). Jeszcze dalej Doktorantka w ogóle zrezygnowała z podawania liczebności grup pod wykresami (rycina 13). Razem tworzy to obraz dużego bałaganu i potęguje wrażenie bardzo niechlujnie przygotowanej rozprawy. Chciałbym również podkreślić, że sam fakt opisywania liczebności grup i charakteryzowania pacjentów w części rozprawy poświęconej wynikom również jest niewłaściwa. Tego typu informacje winne znaleźć się w części poświęconej materiałom i metodom.

Mam też wątpliwości co do wykresu na str. 40 przedstawiającego stężenie cfDNA u osób kontrolnych. Wykres ten jest zupełnie płaski a przecież w tabeli zamieszczonej na następnej stronie nie ma kontroli z zerowym stężeniem cfDNA? Jest to więc wykres przedstawiający albo inną próbkę albo efekt nieprawidłowo przeprowadzonej analizy.

Dyskusja. Pani mgr Majer-Burman poprawnie dyskutuje otrzymane wyniki. Odnosi się do znacznej liczby dobrze opublikowanych prac naukowych. Docenić należy również umiejętność krytycznego spojrzenia na wyniki własnych badań oraz zaproponowanie potencjalnych wyjaśnień ich niepowodzenia w oparciu o doświadczenia własne i doniesienia literaturowe. Do gustu przypadł mi także wyczerpujący opis stanu wiedzy w obszarze badań nad wykorzystaniem cfDNA w diagnostyce nowotworów. Moja ocena tej części rozprawy jest pozytywna, dopatrzyłem się jednak kilku drobnych błędów i nieścisłości. Doktorantka na przemian stosuje poprawny zapis nazw genów kursywą i niepoprawny, zwykłym tekstem (str,

76, 77, 82, 83). Nieprecyzyjny jest także akapit poświęcony metylacji na stronie 74 gdzie brakuje informacji czy chodzi o metylację DNA regionu okołopromotorowego genu *SHOX2* czy badany był inny fragment genu. Nie mogę się też zgodzić z konkluzją zamieszczoną na stronie 79: „(...) our results showed that the analysis of chromosomal aberrations in cfDNA by using Wisecondor software are suitable for screening of ccRCC patients (...)”. Moim zdaniem, co omówiłem już wcześniej, wyniki otrzymane w toku badań są negatywne stąd wniosek płynący z tych badań jest zgoła odwrotny. Nie zgadzam się również ze stwierdzeniem padającym na stronie 80: „(...) many of miRNAs have been described as oncomirs, it is a definition of miRNAs that may be tumor suppressors or oncogenes”. Wydaje mi się, że dużo trafniejsze jest opisywanie miRNA o właściwościach onkogennych jako oncomiRs natomiast miRNA o działaniu supresorowym jako tumor-suppressor miRNAs. Dalej na tej samej stronie pada stwierdzenie: „(...) deregulation of miRNA in cancer samples has been reported, but still the causes of those deregulation events are mostly unknown”. Pomijając już szeroko omawiane uprzednio błędy natury językowej w cytowanym zdaniu, nie mogę zgodzić się, że nauka nie dostarczyła wyjaśnienia mechanizmów deregulacji ekspresji miRNA w nowotworach. Wiadomo przecież, że zmiany liczby kopii DNA, metylacja jak i demetylacja DNA, mutacje w genach kodujących białka DICER i DROSHA i wiele innych mechanizmów odpowiada za ich zmienioną ekspresję. Mamy przecież w Poznaniu piękną tradycję w badaniu miRNA rozpoczętą przez śp., wybitnego Profesora Włodzimierza Krzyżosiaka a kontynuowaną chociażby przez Profesora Piotra Kozłowskiego czy dr Edytę Kościańską. Naukowcy ci opublikowali szereg prac opisujących wspomniane mechanizmy.

Podsumowując, Pani mgr Weronika Majer-Burman przygotowała źle zredagowaną rozprawę doktorską opartą o badania przeprowadzone na relatywnie nielicznej grupie badanej. Nie ustrzegła się też szeregu błędów w projektowaniu eksperymentów, opracowaniu wyników i dyskusji. Na korzyść Doktorantki przemawia natomiast fakt, że rozprawa traktuje o istotnym i bardzo aktualnym zagadnieniu z obszaru genetyki nowotworów oraz że w badaniach wykorzystano najnowocześniejsze techniki molekularne, którymi niewątpliwie Doktorantka sprawnie się posługuje. Rozprawa dostarcza też pewnych wniosków poznawczych, które jednak wymagają dalszego opracowania i walidacji.

Tym samym stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Majer-Burman spełnia minimalne ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne, Uniwersytetu im. Adama

Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Majer-Burman do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Maciej Giefling