

Gdańsk, 12 listopada 2025 roku

Recenzja pracy doktorskiej lek. Laury Szafron zatytułowanej
„Charakterystyka wariantów genetycznych wybranych genów supresorowych
i onkogenów oraz metylomu guzów granicznych jajnika
oraz wysoko i nisko zróżnicowanych raków jajnika”.

Rozprawa Doktorantki wpisuje się w kluczowy nurt badań nad patogenezą raka jajnika, opierając swoje założenia na fundamentalnym dla zrozumienia tej choroby dualistycznym modelu karcynogenezy. Model ten, odchodząc od postrzegania raka jajnika jako pojedynczej jednostki, precyzyjnie rozróżnia dwie główne ścieżki rozwoju choroby:

1. Guzy typu I, obejmujące guzy graniczne (BOTS) oraz raki surowicze nisko zróżnicowane (lgOvCa). Charakteryzują się one względną stabilnością chromosomalną i wolniejszym przebiegiem klinicznym, a ich patogenezą jest napędzana głównie przez mutacje aktywujące w genach szlaku sygnałowego MAPK, takich jak *KRAS*, *NRAS* czy *BRAF*.
2. Guzy typu II, czyli agresywne raki surowicze wysoko zróżnicowane (hgOvCa). Stanowią one większość przypadków, cechują się wysoką niestabilnością genomową, a ich cechą definiującą jest niemal obligatoryjna obecność mutacji w genie supresorowym *TP53* oraz częste defekty w systemach naprawy DNA, w tym w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

O ile biologia molekularna hgOvCa (typ II) jest obecnie stosunkowo dobrze poznana, o tyle patogenezą guzów typu I (BOTS i lgOvCa) pozostaje znacznie słabiej scharakteryzowana. Za kluczowe i wciąż nierozwiązane pytanie naukowe uznaje się mechanizm progresji nieinwazyjnych guzów granicznych (BOTS) do w pełni inwazyjnych, chemoopornych raków lgOvCa.

W tym kontekście, podjęcie przez Doktorantkę próby zintegrowanej, wieloaspektowej analizy porównawczej – obejmującej zarówno profilowanie genomowe (identyfikacja wariantów genetycznych), jak i epigenomiczne (metylom) – tych trzech odrębnych, choć powiązanych jednostek chorobowych (BOTS, IgOvCa, hgOvCa) jest wysoce uzasadnione, aktualne i posiada istotny potencjał poznawczy oraz aplikacyjny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma postać spójnej monografii naukowej, charakteryzującej się klasycznym i logicznym układem treści. Praca obejmuje standardowe rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Wnioski oraz Bibliografię.

Należy podkreślić, że merytoryczny trzon rozprawy oraz podstawę do sformułowania wniosków stanowią trzy publikacje naukowe, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Lek. Laura Szafron jest pierwszą autorką dwóch kluczowych prac badawczych oraz współautorką pracy o charakterze przeglądowym. Świadczy to jednoznacznie o wysokiej wartości naukowej uzyskanych wyników, które już na etapie przygotowywania dysertacji przeszły pomyślnie proces niezależnej recenzji zewnętrznej. Rozdział "Wyniki" stanowi syntetyczne omówienie danych zawartych w tych publikacjach, które dołączono w pełnej wersji na końcu rozprawy.

Doktorantka jako cel główny pracy postawiła sobie przeprowadzenie charakterystyki porównawczej guzów jajnika o różnym stopniu agresywności: granicznych (BOTS), nisko zróżnicowanych (IgOvCa) oraz wysoko zróżnicowanych (hgOvCa). Celem szczegółowym było poszukiwanie cech molekularnych związanych z procesem transformacji guzów granicznych w nowotwory złośliwe oraz identyfikacja potencjalnych biomarkerów o znaczeniu klinicznym.

Badania przeprowadzono na retrospektywnej, lecz szczegółowo scharakteryzowanej pod względem kliniczno-patologicznym grupie chorych z Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie (materiał z lat 1995-2015).

Do analiz genomowych zakwalifikowano łącznie 225 guzów jajnika, które podzielono na cztery kluczowe grupy analityczne: BOT (guzy graniczne bez mutacji BRAF V600E, N=53), BOT.V600E (guzy graniczne z mutacją BRAF V600E, N=23), IgOvCa (N=10) oraz hgOvCa (N=139).

W analizie genomowej zastosowano komplementarne podejście, wykorzystując dwa różne panele celowane NGS:

1. Panel 44 genów (m.in. geny związane z dziedzicznym rakiem jajnika, np. *BRCA1/2*, *TP53*, geny szlaku Anemii Fanconiego - FA) z wzbogacaniem opartym na hybrydyzacji (SeqCap EZ Enrichment System).
2. Panel "hot-spot" 37 genów (m.in. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) z wzbogacaniem opartym na technice PETE (KAPA HyperPETE Hot Spot Panel).

Warianty genetyczne o częstości alleli (VAF) poniżej 10% były odfiltrowywane. Wybrane warianty walidowano następnie przy użyciu sekwencjonowania metodą Sangera, a ich wpływ na poziom białka oceniano metodą Western Blot (WB).

Do analiz epigenomicznych (metylomu) wykorzystano podgrupę 128 pierwotnych guzów surowiczych (BOT N=14, BOT.V600E N=11, IgOvCa N=7, hgOvCa N=96). Profilowanie metylacji DNA wykonano przy użyciu wysokorozdzielczych mikromacierzy Infinium MethylationEPIC (Illumina).

Rozprawa dostarcza szeregu oryginalnych i istotnych obserwacji, które zostały syntetycznie przedstawione w rozdziałach Wyniki oraz Wnioski.

W zakresie analizy genomowej (Publikacja 1):

1. Praca potwierdziła założenia dualistycznego modelu: warianty o silnym wpływie ("HIGH") w genach *TP53* i *BRCA1* były istotnie częstsze w hgOvCa.
2. Odwrotnie, warianty o umiarkowanym wpływie ("MODERATE") w genach szlaku MAPK (*KRAS*, *NRAS*) odgrywały istotną rolę w BOTS i IgOvCa, ale nie w hgOvCa, co potwierdza ich wspólne pochodzenie molekularne i odrębność od guzów typu II.
3. Wykazano, że warianty w genach zaangażowanych w ubiquitytację (*SEMI*, *FANCB*) były istotnie częściej zmienione w BOTS.

4. W analizach regresji wieloczynnikowej zidentyfikowano potencjalne nowe markery prognostyczne: obecność wariantów w genie *PARP1* okazała się negatywnym czynnikiem prognostycznym (zwiększone ryzyko wznowy) w grupie BOTS.
5. W grupie hgOvCa, obecność wariantów w genie *FANCI* zidentyfikowano jako negatywny marker prognostyczny (ryzyko wznowy), a obecność wariantów w *BRCA2* jako wartościowy predyktor odpowiedzi na leczenie.
6. Analizy WB wykazały, że znaczenie kliniczne i ekspresja *FANCI* oraz jego partnera *FANCD2* są zależne od tła molekularnego, tj. statusu genów *BRCA1/2* oraz *TP53*.

W zakresie analizy epigenomicznej (Publikacja 2):

1. Potwierdzono, że globalna hipometylacja genomu rośnie wraz ze stopniem agresywności guza (jest najsilniejsza w hgOvCa).
2. Wykazano, że guzy BOT.V600E (z mutacją w genie *BRAF*) stanowią odrębną jednostkę epigenetyczną, cechującą się hipometylacją w porównaniu do guzów BOT bez tej mutacji.
3. W grupie IgOvCa, która (zgodnie z literaturą) niemal nie posiada mutacji w genie *TP53*, zaobserwowano istotnie wyższą metylację (hipermetylację) regionów promotorowych i pierwszego eksonu genu *TP53* w porównaniu zarówno do BOTS, jak i hgOvCa. Doktorantka słusznie wnioskuje, że w IgOvCa inaktywacja szlaku *TP53* może dokonywać się na drodze epigenetycznej, a nie poprzez mutacje.
4. 10 najbardziej znamienych regionów o zróżnicowanej metylacji (DMR), odróżniających BOTS od IgOvCa, zlokalizowanych jest na chromosomie 6 w obrębie regionu MHC. Sugeruje to kluczową rolę zmian w mikrośrodowisku immunologicznym w procesie transformacji BOTS do IgOvCa.
5. Odkrycie to zostało poparte identyfikacją markera predykcyjnego w BOTS: zmiany metylacyjne w genie *IL34* (kodującym interleukinę 34) okazały się dobrym predyktorem. Hipermetylacja *IL34* (prawdopodobnie prowadząca

do jego wyciszenia) była korzystnym czynnikiem, zmniejszającym ryzyko powstania mikroinwazji/wszczepów.

Dyskusja stanowi krytyczną ocenę merytoryczną rozprawy, konfrontując ustalenia Doktorantki z dostępnymi danymi literaturowymi w celu identyfikacji zarówno wybitnych osiągnięć naukowych, jak i słabości oraz ograniczeń metodologicznych pracy.

Zgodnie z rolą recenzenta, konieczne jest wskazanie na istotne ograniczenia metodologiczne i interpretacyjne pracy, do których Doktorantka powinna odnieść podczas publicznej obrony.

1. Najpoważniejszym ograniczeniem rozprawy, rzutującym na wiarygodność jej najbardziej przełomowych wniosków (dotyczących hipermetylacji TP53 i DMRs w regionie MHC), jest niska liczebność grupy badawczej IgOvCa. W badaniu genomowym grupa ta liczyła N=10, a w kluczowym badaniu metylomu (guzy surowicze) zaledwie N=7. Recenzent ma świadomość, że rak IgOvCa jest jednostką rzadką (5-10% raków surowiczych), co znacząco utrudnia zebranie dużych kohort badawczych. Niemniej jednak, tak mała liczebność próby istotnie ogranicza moc statystyczną badania i sprawia, że uzyskane wyniki są wysoce narażone na błąd losowy. Chociaż zaobserwowane trendy (hipermetylacja TP53, zmiany w MHC) są ciekawe i spójne biologicznie, muszą być traktowane z dużą ostrożnością, wyłącznie jako wyniki badań wstępnych. Zatem wnioski sformułowane w rozprawie (np. "inaktywacja supresora TP53 dokonuje się przede wszystkim na drodze epigenetycznej") są sformułowane zbyt kategorycznie w stosunku do mocy dowodowej płynącej z badania (N=7).
2. Doktorantka zastosowała w pracy dwa różne panele NGS (44-genowy "dziedziczny" i 37-genowy "hot-spot") oparte na odmiennych technologiach wzbogacania (SeqCap EZ vs KAPA HyperPETE). Jak sama Doktorantka słusznie zauważyła, doprowadziło to do sprzecznych wyników dla tych samych genów. Przykładowo, w panelu 44-genowym (obejmującym całe regiony

kodujące) warianty "MODERATE" w genie *BRCA1* były częstsze w BOTS niż w hgOvCa. Natomiast w panelu "hot-spot" (celowanym w znane miejsca patogenne) warianty "HIGH" w tym genie były, zgodnie z oczekiwaniami, zatem częstsze w hgOvCa. Rozbieżności te wynikają bezpośrednio z odmiennego projektowania paneli i zastosowanych technologii. Panel 44-genowy (hybrydizacyjny), badający całe geny, wykrył prawdopodobnie dużą liczbę wariantów o nieznanym znaczeniu (VUS) lub wariantów polimorficznych, które algorytm VEP automatycznie klasyfikuje jako "MODERATE". Panel "hot-spot" celował tylko w znane, patogenne warianty "HIGH". Zarzut dotyczy braku wyciągnięcia ostatecznego, krytycznego wniosku. Ustalenie z panelu 44-genowego, jakoby BOTS miały więcej wariantów *BRCA1* niż hgOvCa, jest zapewne artefaktem metodologicznym i wprowadza w błąd, przecząc ugruntowanej wiedzy, że mutacje *BRCA1* są rzadkie w BOTS. Doktorantka odnotowuje rozbieżność, ale nie wskazuje, który wynik jest biologicznie prawdziwy, a który mylący. Podobny zarzut dotyczy genów *SEM1* i *FANCB*, gdzie wysoka częstość wariantów "MODERATE" w BOTS jest prawdopodobnie wynikiem wykrycia wariantów polimorficznych, a nie patogennych (co Doktorantka sama przyznaje dla *SEM1* w dyskusji).

3. Doktorantka w metodologii badań genomowych arbitralnie odfiltrowała wszystkie warianty o częstości alleli (VAF) poniżej 10%. Uzasadnienie (niemożność walidacji metodą Sangera) jest technicznie zrozumiałe, jednak w erze NGS próg 10% jest uznawany za bardzo wysoki w analizie nowotworów somatycznych. Powoduje to całkowitą utratę informacji o wariantach subklonalnych (np. 1-9% VAF), które mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia heterogenności guza i śledzenia mechanizmów ewolucji klonalnej, np. podczas progresji BOTS do IgOvCa. Sama Doktorantka przytacza przypadek detekcji wariantów *TP53* w IgOvCa na poziomie 11% i 14%, co pokazuje, jak blisko była utraty tych danych. Jest to istotne ograniczenie metodologiczne, które zawęża analizę genomową tylko do dominujących klonów.

Proszę również, aby Doktorantka odniosła się do następujących kwestii:

1. W analizie Western Blot, Doktorantka stwierdza "niespodziewanie wysoką ekspresję białka CHEK1" dla wariantu nonsensownego (p.Trp79Ter), sugerując korelację: im wyższy odsetek zmienionego allelu, tym silniejszy sygnał. Jest to interpretacja sprzeczna z podstawami biologii molekularnej (mutacja nonsensowna powinna prowadzić do degradacji NMD lub powstania niefunkcjonalnego, skróconego białka). Czy Doktorantka rozważyła alternatywne wyjaśnienia, np. że zastosowane przeciwciało rozpoznaje epitop N-końcowy, a skrócone białko (jeśli powstaje) jest bardziej stabilne? Lub czy wariant ten zaburza miejsce wiązania np. miRNA, prowadząc do utraty regulacji i paradoksalnego wzrostu translacji?
2. W badaniu metylomu, Doktorantka stwierdza obniżoną metylację (hipometylację) promotora genu supresorowego CDKN1A (p21) w rakach (IgOvCa i hgOvCa) w porównaniu do BOTS. Jest to wynik sprzeczny z oczekiwaniami (supresor powinien być wyciszany, a nie aktywowany). Czy Doktorantka może szerzej skomentować tę obserwację w kontekście statusu TP53 w tych guzach? Literatura wskazuje, że w komórkach z defektywnym p53, białko p21 może tracić funkcję supresorową i pełnić funkcje pronowotworowe, co tłumaczyłoby jego aktywację przez hipometylację w rakach.

Reasumując, rozprawa doktorska lek. Laury Szafron pt. „Charakterystyka wariantów genetycznych wybranych genów supresorowych i onkogenów oraz metylomu guzów granicznych jajnika oraz wysoko i nisko zróżnicowanych raków jajnika” stanowi obszerne i wartościowe studium molekularne, wnoszące nowe informacje w zrozumienie dualistycznej patogenezy nowotworów jajnika.

Na szczególne uznanie zasługują oryginalne i doskonale udokumentowane wyniki o charakterze epigenetycznym. Identyfikacja hipermetylacji genu *TP53* jako prawdopodobnego, alternatywnego mechanizmu inaktywacji tego supresora w rakach typu IgOvCa jest odkryciem nowatorskim i o potencjalnie dużym znaczeniu

poznawczym. Równie istotne jest wykazanie, że progresja guzów granicznych (BOTS) do raków inwazyjnych (IgOvCa) jest silnie powiązana ze zmianami epigenetycznymi w regionie MHC oraz w genach regulatorów mikrośrodowiska immunologicznego, takich jak IL34. W części genomowej, praca identyfikuje nowe, potencjalne markery prognostyczne (PARP1 w BOTS, FANCI w hgOvCa) i poprawnie umieszcza je w złożonym kontekście biologicznym szlaku FA i statusu genów BRCA1/2 oraz TP53.

Praca nie jest wolna od ograniczeń. Najpoważniejszym jest bardzo niska liczebność grupy IgOvCa (N=7 w badaniach metylomu), co osłabia moc statystyczną uzyskanych wyników i nakazuje traktować je z dużą ostrożnością. Ponadto, zastosowanie dwóch różnych, nie w pełni porównywalnych paneli NGS doprowadziło do niespójnych wyników (np. dla BRCA1), co nie zostało wystarczająco krytycznie omówione w dyskusji.

Pomimo wskazanych ograniczeń, które są częściowo wynikiem obiektywnych trudności badawczych (rzadkość występowania IgOvCa), rozprawa lek. Laury Szafron jako całość demonstruje jej wysokie kompetencje merytoryczne, umiejętność planowania i samodzielnej realizacji złożonych eksperymentów genomowych i epigenomicznych, a także zdolność do analizy bioinformatycznej i wyciągania dojrzałych, biologicznie uzasadnionych wniosków. Praca jest oryginalna, a jej kluczowe wyniki zostały opublikowane w pismach międzynarodowych.

Rozprawa doktorska lek. Laury Szafron spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Niniejszym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Laury Szafron do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

