

Łódź, dnia 4 czerwca, 2019 r.



dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Molekularnej, UŁ
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: aneta.balcerczyk@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Linowieckiej
pt.: „Badanie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane
w procesy aktywnej demetylacji DNA w raku piersi”

Promotor: dr hab. Marek Foksiński

W przedstawionej do recenzji dysertacji Pani mgr Kinga Linowiecka podejmuje ambitną próbę charakterystyki wybranych komponentów szlaku aktywnej demetylacji DNA w raku piersi z poziomu ich potencjalnego zastosowania do analiz diagnostycznych jako czynniki prognostyczne do oceny zaawansowania stanu chorobowego.

Temat rozprawy jest szalenie ciekawy i niezwykle aktualny. Epigenetyczne mechanizmy regulacji procesu nowotworzenia, w szczególności metylacja DNA od lat budzą zainteresowanie wielu badaczy. Z uwagi na zidentyfikowane zaburzenia w profilu metylacji DNA w komórkach nowotworowych: (i) hipermetylację wysp CpG w obrębie promotorów protoonkogenów i genów supresorowych oraz (ii) globalną hipometylację DNA, z powodzeniem zaczęto wykorzystywać w interwencjach terapeutycznych inhibitory metylotransferazy DNA 1 (Dnmt1), 5-azacytydynę (Vidaza™) czy decytabinę (Dacogen™) jako szlak biernej demetylacji DNA. Przez długi czas było kwestią dyskusyjną, czy w organizmach ssaków istnieją mechanizmy aktywnej demetylacji DNA. Dopiero odkrycie białek Tet, zdolnych przekształcać 5-metylocytozynę w 5-hydroksymetylocytozynę rozwiązało wątpliwości naukowców i przeniosło dyskusję na inny poziom, a mianowicie wykorzystania białek do celów terapeutycznych.

Prezentowana rozprawa mgr Kingi Linowieckiej bardzo dobrze wpisuje się w aktualne nurty poszukiwań znaczenia aktywnej demetylacji DNA w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych. Doktorantka podjęła się wieloparametrycznej oceny poziomu 5-metylocytozyny (5-mC)

i jej pochodnych (5-hmC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC) w raku piersi próbując uzyskać odpowiedź czy ta modyfikacja epigenetyczna może być czynnikiem prognostycznym wspomagającym wczesne wykrywanie nowotworu i/lub markerem skuteczności leczenia. Niewątpliwą zaletą tej rozprawy jest zastosowany model badawczy: (i) próbek krwi od pacjentek i (ii) materiału klinicznego tkanek guza z rozróżnieniem podtypu biologicznego raka piersi, stopnia zaawansowania choroby oraz stopnia remisji guza po leczeniu chemioterapeutycznym.

Recenzowana rozprawa doktorska, licząca 157 stron, została przygotowana w postaci monografii o klasycznym układzie tekstu dla prac medycznych, zawierającym 25 rycin, 27 tabel i 376 pozycji literaturowych w większości opublikowanych w ostatnich 10-ciu latach, które posłużyły do przygotowania monograficznej części pogłądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór literatury nie budzi zastrzeżeń i podkreśla, że tematyka badań podejmowanych przez Doktorantkę i Pana Promotora jest bardzo aktualna. Monografia jest opracowana bardzo starannie pod względem językowym, stylistycznym i edytorskim. Czyta się ją z dużą przyjemnością.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 33 strony, zawierająca 3 ryciny i 4 tabele dobrze uzupełniające i wizualizujące omawiane treści. Poszczególne rozdziały części teoretycznej stanowią płynne przejście od obszernego omówienia mechanizmów epigenetycznej regulacji metylacji DNA, ze szczególnym uwzględnieniem narzędzi i sygnatur procesu demetylacji na poziomie komórkowym do etiologii, diagnostyki i leczenia raka piersi. Wykorzystane przez mgr Kingę Linowiecką piśmiennictwo w części teoretycznej stanowi przykład przemyślanego i świetnie zilustrowanego wykładu na temat aktualnej wiedzy o omawianych zagadnieniach. Autorka pokazała, że potrafi wykorzystywać dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować i komentować.

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Doktorantka w 3 punktach przedstawiła plan swoich badań.

W rozdziale „Materiały i metody” mgr Kinga Linowiecka wyczerpująco opisała stosowane w pracy techniki badawcze, m.in. izolację RNA/DNA z komórek i tkanek, technikę Real-Time qPCR, ultrasprawną chromatografię cieczową z tandemową detekcją mas (2D-UPLC/MS/MS).

Wyniki przeprowadzonych badań opisano na 52 stronach, zaprezentowano w 23 tabelach i zilustrowano na 22 rycinach. Dokumentacja wyników przekonuje, że wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały z dużą skrupulatnością. Sposób prezentacji uzyskanych danych jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację kolejnych celów i zadań. Jedyne czego mi zabrakło to adnotacja pod wykresami jakim testem wyliczono istotność statystyczną. Podczas opisywania wyników Doktorantka dokonując analizy badanych paramentów u kobiet

z rakiem piersi i w grupie kontrolnej pisze, iż obserwowano zmiany, ale nie były one istotne statystycznie np. strona 60, 63, 65. Należy pamiętać, że po to wykonujemy analizę statystyczną żeby stwierdzić istnienie zmian bądź też nie w obrębie badanego parametru i nie można mówić, że ekspresja genu rośnie lub maleje, jeżeli różnice pomiędzy kontrolą a próbą badaną nie są pozytywnie zweryfikowane odpowiednim testem.

W pierwszym etapie badań Doktorantka dokonała analizy ekspresji białek TET na poziomie transkrypty w leukocytach pochodzących od pacjentek z rakiem piersi jak również we fragmentach pierwotnej tkanki nowotworowej raka piersi. Wyniki badań pokazały obniżenie ekspresji genu TET1 i w konsekwencji również spadek poziomu 5-hmC w porównaniu do kontroli (leukocyty od kobiet niechorujących na raka piersi, fragmenty tkanki histopatologicznie niezmięnionej pochodzącej z obrzeża wycinka; odpowiednio), co wskazuje na potencjalny charakter prognostyczny obu parametrów w diagnostyce raka piersi. Jednocześnie uzyskane przez Doktorantkę wyniki marginalizują szlak deaminacji metylowanej cytozyny przez białko AID, wskazując na hydrosymetylację 5-mC jako dominujący mechanizm demetylacji DNA w raku piersi.

W drugiej fazie badań Doktorantka skupiła się na identyfikacji potencjalnej korelacji pomiędzy zastosowaniem chemioterapii przedoperacyjnej u kobiet chorujących na raka piersi a wybranymi elementami szlaku aktywnej demetylacji DNA i biochemicznymi parametrami charakteryzującymi stan energetyczny komórki. Istotnym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę w tej części badań jest wykazanie, że terapia doksorubicyną i cyklofosfamidem nie jest obojętna dla procesu aktywnej demetylacji DNA. Uzyskane wyniki wskazują na istotne obniżenie ekspresji białek TET na poziomie transkrypty podobnie jak innych analizowanych genów, m.in. glikozylazy tyminowej (TGD), AID, HIF1 i HIF2. Jednocześnie obniżonemu poziomowi ekspresji wyżej wymienionych genów towarzyszył wzrost poziomu 5-mC, 5-fC i 5-caC. Interwencja chirurgiczna powodowała zaś wzrost ekspresji wszystkich analizowanych genów, jak również wzrost poziomu 5-mC i 5-hmC.

Kolejne badania przeprowadzone przez Doktorantkę w postaci analizy ekspresji genów dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH1 i IDH2) i próba powiązania metabolizmu energetycznego komórki z aktywną demetylacją DNA, wykazała odmienny poziom ekspresji w zależności od analizowanego materiału (w pierwotnych tkankach nowotworowych stwierdzono obniżony poziom ekspresji IDH1 i podwyższony poziom IDH2, podczas gdy w leukocytach od kobiet z rakiem piersi wraz z obniżeniem poziomu 5-hmC zarejestrowano podwyższony poziom ekspresji IDH1 i obniżony poziom IDH2. Chciałabym prosić Doktorantkę o kilka słów komentarza odnośnie stwierdzonych fluktuacji ekspresji izoform dehydrogenazy izocytrynianowej w badanym materiale w odniesieniu do procesu kancerogenezy. Czy fragmenty tkanki raka piersi i próbki krwi użyte do analiz pochodziły od tych samych pacjentek?

Jak wspomniałam wcześniej badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej mają charakter wielopoziomowy i obejmują również analizę ekspresji genów TET i innych molekuł bezpośrednio lub pośrednio związanych ze szlakiem aktywnej demetylacji DNA w zebranych materiale biologicznym w zależności od ekspresji receptorów dla: estrogeny (ER), progesteronu (PR) i nabłonkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2), których obecność determinuje określony podtyp molekularny raka piersi. W swoich badaniach Doktorantka stwierdziła istotne zmiany w profilu metylacji DNA (poziom 5mC) pomiędzy podtypem nowotworu z ekspresją receptorów HER2 a podtypem potrójnie ujemnym oraz podtypem z ekspresją receptorów hormonalnych. Nie wykazano jednak istotnych zmian w ekspresji genów TET. Chciałabym prosić Doktorantkę o komentarz czy zatem w świetle przedstawionych danych obecność receptorów nie ma wpływu na proces aktywnej demetylacji? I czy zamierza kontynuować ten nurt badań?

Dyskusja, licząca 24 strony, jest syntetyczna i świadczy o biegłej znajomości przez Doktorantkę zagadnień związanych z mechanizmem aktywnej demetylacji DNA w chorobach nowotworowych. Mgr Kinga Linowiecka w sposób krytyczny dokonała przejrzystej analizy oraz interpretacji własnych wyników w oparciu o dostępne piśmiennictwo.

Rozprawę kończą wnioski wynikające z opisanych wyników. Streszczenie w języku polskim i angielskim oddaje charakter pracy i nie budzi zastrzeżeń. Przejrzystość pracy wzbogaca wykaz skrótów oraz spis tabel i rycin umieszczonych w pracy. Zabrakło mi tylko załączenia do monografii dorobku naukowego Doktorantki, a prezentowana dysertacja pozwala sądzić, że jest się czym pochwalić.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Kingi Linowieckiej: „Badanie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w procesy aktywnej demetylacji DNA w raku piersi”. Na wysoką wartość merytoryczną pracy, składają się zarówno oryginalna tematyka badawcza, umiejętnie dobrane nowoczesne metody weryfikujące postawione cele badawcze, jak i zakres przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością zagadnień epigenetycznych w zakresie obejmującym temat Jej badań, znajomością szeregu technik badawczych oraz umiejętnością krytycznej analizy i interpretacji wyników.

W mojej opinii przedłożona do oceny dysertacja mgr Kingi Linowieckiej stanowi znaczny wkład w rozwój uprawianej przez Nią dziedziny i odpowiada warunkom dla rozprawy na stopień doktora określonym przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym bez żadnych zastrzeżeń popieram wnioski o nadanie mgr Kingi Linowieckiej stopnia doktora nauk medycznych i zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium

Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kingi Linowieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę oryginalność pracy i jej bardzo wysokie walory poznawcze wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kingi Linowieckiej w przyjęty na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu sposób.



dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki