



KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Święcickiego 4
60-781 Poznań

tel.: + 48 61 854 66 20
fax: + 48 61 854 66 20

Poznań, 6 maja 2019

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej
Magister **Marty Starczak**

p.t. „Nowe modyfikacje epigenetyczne DNA i ich rola w rozwoju raka jelita grubego”

W patogenezie wielu nowotworów, w tym jelita grubego, obok mutacji prowadzących do zmian genotypu, istotną rolę odgrywają zmiany epigenetyczne szczególnie związane z zaburzonym profilem metylacji DNA. Te ostatnie wiążą się zwykle z hipermetylacją miejsc promotorowych genów supresorowych i zmniejszoną zawartością 5-metylocytozyny (5-mCyt) w całym genomie.

Najczęściej przedmiotem badań jest poszukiwanie konstelacji genów, których promotory mają zmienioną metylację w powiązaniu z oceną metylacji sekwencji LINE-1 jako pośredniego źródła informacji o całkowitej zawartości 5-mCyt w genomie.

W przedstawionym do recenzji zestawie prac, które mają być podstawą do nadania stopnia doktora skupiono się na ocenie poziomu 5-mCyt i produktów jej utlenienia w powiązaniu z markerami uszkodzenia oksydacyjnego. Te ostatnie są od lat przedmiotem zainteresowania zespołu, w którym była wykonywana praca i znaczących osiągnięć w tym zakresie. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że produkty naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA takie jak 8-oksy-7,8 dihydro-guanina mogą być uznana za chemiczną modyfikację DNA podobną do modyfikacji epigenetycznych. Podjęcie badań z tego zakresu, istotnych z punktu widzenia patogenezy nowotworów jest bardzo uzasadnione i stanowi „naturalną” kontynuację badań zespołu. Recenzowana praca dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy.

Porównanie poziomu tych modyfikacji w tkance nowotworowej, niezmiennym marginesie operacyjnym, a przede wszystkim leukocytach krwi obwodowej, które można pozyskać w stosunkowo nieinwazyjny sposób nie tylko uzasadniają, ale też podwyższają wartość podjętych badań.

Rozprawa przedstawiona jest w formie cyklu czterech tematycznie powiązanych publikacji, w tym trzech wielo-autorskich prac oryginalnych. Doktorantka oraz współautorzy zgodnie z Rozporządzeniem MNiSzW z dnia 19 stycznia 2018 Rozdział 1, § 4/2, złożyli stosowane oświadczenia dotyczące ich udziału w poszczególnych publikacjach.

We wprowadzeniu do rozprawy, opartym o 24 publikacje, Autorka szeroko omawia epidemiologię, zmiany fenotypowe i histologiczne oraz molekularne podłoże rozwoju raków jelita grubego.

W tym monotematycznym wprowadzeniu, zabrakło jednak sformułowania założeń pracy, czy hipotezy badawczej. Autorka bezpośrednio przechodzi do przedstawienia celów pracy zakładając, że hipotezy badawcze zostały przedstawione w poszczególnych publikacjach.

Szkoda, że we wprowadzeniu nie omówiła choćby skrótowo metod analizy 5-mCyt i jej pochodnych a tym samym uzasadnienia opracowania nowej skoro to stanowi jeden z celów pracy. Ten element pojawia się dopiero w podsumowaniu rozprawy.

Włączona w cykl publikacja poglądowa (#1) stanowi częściowo uzupełnienie wprowadzenia i omawia charakterystykę 5-hydroksy-metylouracylu i jego możliwy udział w zjawiskach epigenetycznych. Stanowi bardzo dobry przegląd „dwuznaczności” tego produktu oksydacji 5-mCyt.

Tę jak i kolejne publikacje poprzedza opis głównych tez i wyników przedstawionych w poszczególnych pracach.

Punktem wyjścia do zasadniczych badań było, jak wspomniano wyżej, opracowanie metody analizy ilościowej jak to określa Doktorantka znaczników o potencjalnym znaczeniu epigenetycznym oraz biomarkerów stresu oksydacyjnego. Opracowana metoda – dwuwymiarowej ultra-sprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas umożliwiającą analizę szerokiego spectrum modyfikacji DNA w formie deoksy- nukleozydów stanowi ważne osiągnięcie Doktorantki i zespołu. Jej druga pozycja w spisie autorów i ich oświadczenia wskazują na Jej istotny wkład w opracowanie metody. Wartość metody zweryfikowano wykonując badania pilotażowe w materiale pochodzącym od pacjentów z rakiem jelita grubego i porównując poziomy modyfikacji DNA w tkance guza oraz „prawidłowym marginesie operacyjnym”. Wnioski autorki są na tym etapie trochę zbyt daleko idące. O ile perspektywiczne zastosowanie kliniczne opracowanej metody do monitorowania , a raczej badań (metoda zbyt skomplikowana na codzienny użytek laboratorium klinicznego) patogenezę chorób związanych ze stresem oksydacyjnym jest uzasadnione, to jej przydatność do oceny zaburzeń metabolicznych wymagałaby wyjaśnienia. Opracowaną metodę w szerszym zakresie Doktorantka wykorzystwała do oceny modyfikacji DNA w leukocytach krwi obwodowej pochodzących od zdrowych wolontariuszy oraz pacjentów z rakiem jelita grubego, gruczolakiem oraz zapalnymi chorobami jelit. To najważniejsza z punktu widzenia osiągnięć doktorantki praca, w której jest pierwszym autorem, opublikowana została w prestiżowym *Journal of Translational Medicine*.

W ograniczonym zakresie próby wykorzystania leukocytów do oceny poziomu 5- mCyt i 5-hmCyt w raku jelita grubego były podejmowane przez innych autorów przy wykorzystaniu klasycznej metody LC-MS/MS i wskazywały na pozytywną choć na granicy statystycznej istotności korelację między poziomami 5-mCyt w leukocytach i tkance guza (Udall et al. 2018).

W pracy Doktorantki takich porównań nie przeprowadzono, ale stwierdzono istotne różnice w poziomie tych samych markerów u wszystkich grup chorych w porównaniu do osób zdrowych. U wszystkich chorych zarówno poziomy 5-mCyt jak i produktów jej utlenienia były niższe niż u osób zdrowych. Jednak poziom 5-hmUra u pacjentów z gruczolakiem był zdecydowanie wyższy niż u tych z rakiem jelita grubego, co wskazuje, że jego oznaczanie może być przydatne w diagnostyce stanów przedrakowych.

Szkoda, że dla porównania nie wykonano analizy cfDNA , który stanowi odzwierciedlenie zmian epigenetycznych w tkance rakowej.

Cenną obserwacją było stwierdzenie pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem przynajmniej niektórych pochodnych 5-mCyt i 8-oksyGua markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA we wszystkich grupach chorych natomiast jej brak u osób zdrowych. W IBD zaobserwowano negatywną korelację między poziomami 5-mCyt i 8-oksyGua. Wysoki poziom tej ostatniej jest zrozumiały biorąc pod uwagę patogenezę tego schorzenia, a szczególnie rolę RFT w procesie zapalnym. Najważniejszym tytułowym osiągnięciem tej pracy doktorantki i jej współautorów było stwierdzenie powiązania pomiędzy poziomem L-askorbinianu w osoczu i poziomami 5-hmCyt i 5-hmUra w leukocytach, co może wskazywać, że L-askorbinian może mieć wpływ na równowagę pomiędzy procesami metylacji i demetylacji wysp CpG.

Cykl prac kończy artykuł przedstawiający ocenę poziomów 5-mCyt i jej pochodnych w powiązaniu z 8-oksyGua w odniesieniu do tych samych jednostek chorobowych ocenianych w materiale klinicznym pobranym ze zdrowych tkanek jelita oraz zmienionych chorobowo. Choć Doktorantka w swoim komentarzu nie ustosunkowuje się do tego problemu, modyfikacje DNA w materiale klinicznym w pewnym tylko zakresie potwierdziły to co zaobserwowano w leukocytach. Wprawdzie najwyższe poziomy 5-mCyt i 5hmCyt stwierdzano w zdrowej tkance jelita jednak poziom 5-hmUra w przeciwieństwie do leukocytów był najniższy w próbkach pobranych od pacjentów z gruczolakami. Natomiast jak się wydaje, zmniejszony poziom 5-fCyt może być cechą charakterystyczną niezróżnicowanych komórek rakowych.

W omawianej pracy oceniano także ekspresję genów *TET* i *AID* zarówno na poziomie mRNA jak i białka. O ile w odniesieniu do mRNA szczególnie *TET1* i *TET2* stwierdzano pewne różnice w jego poziomie w próbkach pochodzących od pacjentów i prawidłowej tkance jelita, to znalazły one potwierdzenie na poziomie białka zasadniczo tylko w odniesieniu do *TET1*. Interpretacja tych obserwacji zgodnie z którą zależność pomiędzy nieprawidłowym wzorcem epigenetycznych modyfikacji DNA a rozwojem nowotworu nie zależy wyłącznie od statusu transkrypcyjnego białek *TET* nie jest przekonująca. Być może różnice w modyfikacji DNA są wynikiem zmian aktywności *TET*, a nie ekspresji kodujących te enzymy genów. Brak korelacji pomiędzy poziomem mRNA *TET2* i poziomem jego białka może wynikać m.in. z niskiej czułości zastosowanej metody oceny białka.

Pracę kończy „Podsumowanie” będące w pewnym stopniu powtórzeniem wcześniej opisanych obserwacji, ale także dyskusją przedstawionych wyników w konfrontacji z danymi literaturowymi. Jak wspomniano wyżej dopiero tutaj doktorantka skrótowo omawia dotychczas stosowane metody analizy 5-mCyt i jej pochodnych.

Interpretacja i omówienie wyników jest poprawne, ale zdarzają pewne uproszczenia szczególnie w opisie powiązania stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego, a także jego wpływu na po-translacyjną modyfikację białek *TET* (str. 103). Dotyczy to także interpretacji wyników dotyczących ekspresji genów *TET* na str. 105. Trudno zgodzić się, ze stwierdzeniem, że na aktywność 5-mCyt hydroksylaz *TET* wpływa mutacja w domenie katalitycznej, bo ta w pierwszej kolejności zmniejsza ekspresję genu kodującego to białko. Podobnie mało przekonujące są inne opisane w tym miejscu mutacje np. dehydrogenazy izocytrynianowej.

Pracę kończą cztery uzasadnione wnioski.

Bibliografia wykorzystana w komentarzach do załączonych prac obejmuje łącznie 71 pozycje.

Zasadniczo wszystkie odnośniki są poprawnie cytowane.

Komentarze są starannie zredagowane, choć pojawiają się pewne niezręczne, bądź nieprecyzyjne sformułowania np. zamiast o witaminach antyoksydacyjnych należałoby mówić o witaminach, które należą do drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy. W odniesieniu do witaminy C Doktorantka wymiennie używa terminu L-askorbinian lub witamina C, choć w artykule jest mowa wyłącznie o askorbinianie; na str. 102 pojawiają się komórki hodowlane.

Osobiście mój sprzeciw jako nauczyciela akademickiego budzą określenia ekspresja mRNA i ekspresja białka, choć jak widać są akceptowane przez redakcje niektórych czasopism. Zarówno mRNA jako i białko są wynikiem ekspresji genu.

Artykuły przedstawione jako podstawa do nadania stopnia doktora były już przedmiotem zapewne wnikliwych recenzji, stąd dla oceny wkładu Doktorantki w ich powstanie, obok jej własnego oświadczenia i oświadczeń współautorów, istotne są przedstawione przez nią komentarze do poszczególnych artykułów i interpretacja wyników przedstawiona w Podsumowaniu i Wnioskach. Uważam, że mgr Starczak mimo przedstawionych wyżej uwag dobrze wywiązała się z tego zadania.

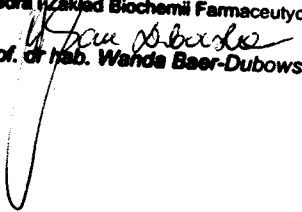
Merytorycznie praca nie budzi zastrzeżeń i oceniam ją wysoko.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała zakres badań, będących celem dysertacji. Wszystkie badania zostały rzetelnie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są bardzo wartościowe. Ich otrzymanie wymagało nie tylko dużej wiedzy, ale także znakomitego przygotowania laboratoryjnego, szczególnie z zakresu złożonych technik analitycznych.

Praca zawiera elementy nowości i stanowi o indywidualnym wkładzie doktorantki do piśmiennictwa dotyczącego molekularnego podłoża patogenezы nowotworów jelita grubego i nieswoistego zapalenia jelit (IBD) oraz poszukiwania biomarkerów tych schorzeń.

Tym samym praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem MNiSzW i pozwala mi wnosić o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magister Marty Starczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UMK Collegium Medicum w Bydgoszczy wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Marty Starczak i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Prof. dr hab. Wanda Beer-Dubowska