

Łódź, 2019-04-29

Dr hab. Anna Krześlak
Katedra Cytobiochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź
tel: +48 42 635 43 35
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Marty Starczak
pt. „Nowe modyfikacje epigenetyczne DNA i ich rola w rozwoju raka jelita grubego”

Rozprawa doktorska mgr Marty Starczak wpisuje się w nurt badań dotyczących poszukiwania związku pomiędzy określonymi zmianami epigenetycznymi w DNA a procesem nowotworzenia. Zmiany modyfikacji DNA mogą być jedną z głównych przyczyn zarówno powstawania nowotworów, jak również wpływać na ich progresję. Rak jelita grubego stanowi drugą, po raku płuc, przyczynę zgonów z powodu nowotworów, co sprawia, że poznanie wszystkich zaburzeń odpowiedzialnych za jego powstawanie jest szczególnie ważne i pilne. Transformacja nowotworowa jelita grubego jest procesem wieloetapowym. Gruczolaki konwencjonalne oraz polipy ząbkowane mogą być zmianami prekursorowymi poprzedzającymi pojawienie się zmian złośliwych, dlatego dokładne poznanie i porównanie rodzajów modyfikacji DNA w różnych zmianach chorobowych jelita może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów stojących za rozwojem raka jelita grubego. Zastosowanie w ostatnich latach nowoczesnych metod spektrometrii mas do analizy tych modyfikacji, z uwagi na wyjątkową czułość i dokładność analizy daje realną szansę na usprawnienie diagnostyki nowotworów. Mgr Marta Starczak włączyła się do nurtu tych badań i podjęła się niełatwego zadania zidentyfikowania i porównania zmian

epigenetycznych DNA w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit, gruczolakami i rakiem jelita grubego.

Rozprawa doktorska mgr Marty Starczak stanowi monotematyczny cykl czterech prac opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pięcioletni sumaryczny Impactfactor czasopism, w których opublikowane zostały prace wynosi 22,487 a liczba punktów MNiSW 160. Jedna z prac jest pracą przeglądową, a trzy pozostałe to oryginalne prace doświadczalne. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Ryszard Olinski, **Marta Starczak**, Daniel Gackowski. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: oxidatively modified base, epigenetic mark or both? Mutation Research/Reviews in Mutation Research 2016 767: 59-66. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.02.001.
2. Daniel Gackowski, **Marta Starczak**, Ewelina Zarakowska, Martyna Modrzejewska, Anna Szpila, Zbigniew Banaszkiwicz, and Ryszard Olinski. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultraperformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. Analytical Chemistry 2016 88 (24): 12128-12136. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02900
26
3. **Marta Starczak**, Ewelina Zarakowska, Martyna Modrzejewska, Tomasz Dziaman, Anna Szpila, Kinga Linowiecka, Jolanta Guz, Justyna Szpotan, Maciej Gawronski, Anna Labejszo, Ariel Liebert, Zbigniew Banaszkiwicz, Maria Klopocka, Marek Foksinski, Daniel Gackowski, Ryszard Olinski. In vivo evidence of ascorbate involvement in the generation of epigenetic DNA modifications in leukocytes from patients with colorectal carcinoma, benign adenoma and inflammatory bowel disease. Journal of Translational Medicine 2018 16 (1): 204. DOI: 10.1186/s12967-018-1581-9.
4. Tomasz Dziaman, Daniel Gackowski, Jolanta Guz, Kinga Linowiecka, Magdalena Bodnar, **Marta Starczak**, Ewelina Zarakowska, Martyna Modrzejewska, Anna Szpila, Justyna Szpotan, Maciej Gawronski, Anna Labejszo, Ariel Liebert, Zbigniew Banaszkiwicz, Maria Klopocka, Marek Foksinski, Andrzej Marszalek, Ryszard Olinski. Characteristic profiles of DNA epigenetic modifications in colon cancer and its predisposing conditions : benign adenomas and inflammatory bowel disease. Clinical Epigenetics 2018 10: 72. DOI: 10.1186/s13148-018-0505-0.

Prace są wieloautorskie, więc recenzowana rozprawa stanowi część pracy zbiorowej. Autorka określiła swój udział w realizacji wszystkich prac. Do rozprawy doktorskiej dołączone zostały również pisemne oświadczenia pozostałych współautorów. Z załączonych oświadczeń wynika, że udział Doktorantki polegał na przeprowadzaniu eksperymentów związanych z walidacją i kalibracją nowo opracowanej metody do identyfikacji i analizy modyfikacji zasad DNA, oznaczaniu epigenetycznych modyfikacji DNA, oznaczaniu stężenia witamin w osoczu,

tworzeniu baz danych, analizie wyników, przygotowaniu tabel i rycin oraz udział w pisaniu jednego z artykułów.

Poza kopiami publikacji do rozprawy Doktorskiej mgr Marta Starczakdołączyła również następujące rozdziały:wstęp, cele badań, podsumowanie i wnioski. Ponadto każdą z zamieszczonych prac poprzedza krótkie wprowadzenie w języku polskim. Autorka zamieściła również spis stosowanych skrótów i piśmiennictwa.

We wstępie Pani mgr Marta Starczak w sposób syntetyczny przedstawiła dane związane z epidemiologiąraka jelita grubego oraz opisała molekularne podłożerozwoju tego raka, uwzględniając rolę zaburzeń metylacji DNA w powstawaniu zmian nowotworowych. Część wstępna jest napisana w sposób bardzo klarowny i stanowi dobre wprowadzenie w problematykę nowotworzenia jelita grubego. Mam tylko uwagę dotyczącjednego sformułowania, cytuję: *„Pojęcie epigenetyka wyjaśnia się najczęściej jako zmiany w ekspresji genów nie związane ze zmianą sekwencji nukleotydów w DNA”*. Epigenetyka jest nauką podobnie jak genetyka. Epigenetykę można więc określić jako naukę, badającą zmiany w ekspresji genów, ale sama epigenetyka tymi zmianami nie jest. Błąd ten może wynikać z odobieństw słów angielskich „epigenetics” – epigenetyka i „epigenetic” -epigenetyczny.

Po wstępie Autorka przedstawiła cele badawcze, którymi były:

- Optymalizacja i walidacja metody pozwalającej na analizę ilościową modyfikowanych zasad azotowych w DNA izolowanym z leukocytów krwi obwodowej oraz prawidłowych i zmienionych chorobowo tkanek jelita grubego;
- Ocena roli modyfikowanych zasad DNA w rozwoju raka jelita grubego, poprzez porównanie ich zawartości u osób chorych z nieswoistym zapaleniem jelit, gruczolakami i rakiem jelita grubego na poziomie zdrowych i zmienionych chorobowo tkanek/guzów, jak również w leukocytach krwi obwodowej;
- Ocena zależności pomiędzy stężeniami witamin o działaniu antyoksydacyjnym a modyfikacjami DNA.

Mam w tym miejscu drobnezastrzeżenie do sformułowania celu trzeciego. Jego oryginalne brzmienie jest następujące: *„Ocena związku podstawowych stężeń witamin o działaniu antyoksydacyjnym z ilością modyfikacji o potencjalnym znaczeniu epigenetycznym w DNA”*. Nie rozumiem co Autorka miała na myśli używając określenia „podstawowe stężenia witamin”. Ponadto zwraca moją uwagę nieco zbyt ogólnie sformułowany cel drugi, ponieważ

nie mam pewności, czy wyłącznie poprzez porównanie zawartości modyfikowanych nukleozydów w DNA osób chorych z nieswoistym zapaleniem jelit, gruczołakami i rakiem jelita grubego na poziomie zdrowych i zmienionych chorobowo tkanek oraz leukocytów można jednoznacznie ocenić rolę modyfikowanych zasad w rozwoju raka jelita grubego. Pozostawiam tę kwestię do dyskusji.

W dalszej części pani mgr Marta Starczak krótko omówiła oraz przedstawiła prace wchodzące w skład rozprawy. Pierwsza praca jest pracą przeglądową dotyczącą powstawania, usuwania oraz potencjalnego znaczenia 5-hydroksymetylouracylu. Praca jest bardzo interesująca, zważywszy na fakt, że o tej modyfikacji DNA wiemy stosunkowo mało i jej potencjalna rola, szczególnie w regulacji ekspresji genów, pozostaje nieznana. Określenie roli tej modyfikacji jest interesujące, tym bardziej, że może ona być wynikiem zarówno działania enzymów, a więc podlegać pewnym kontrolowanym mechanizmom, jak i być efektem ubocznym stresu oksydacyjnego. W pracy tej Autorzy nie tylko przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat 5-hydroksymetylouracylu, ale bardzo interesująco dyskutują w oparciu o dane literaturowe i swoje własne doświadczenia możliwe scenariusze dotyczące roli tej modyfikacji. Praca jest bez wątpienia bardzo dobra, ale mój entuzjazm gasi niecierpliwość co do roli Doktorantki w tworzeniu tej pracy. W pracy przeglądowej Doktorantka jest drugim z trzech autorów, ale niestety nie brała udziału w pisaniu pracy. Zgodnie z oświadczeniem przygotowała ona rysunki i tabelę oraz redagowała tekst manuskryptu. Rysunki jednak są dosyć proste i oczywiste, a choć są one przygotowane bardzo starannie to nie dają niestety możliwości oceny umiejętności Doktorantki do pogłębionej analizy i syntezy informacji z zakresu epigenetycznych modyfikacji DNA. Pragnę jednak podkreślić, że nie sugeruję, iż Doktorantka takich umiejętności nie posiada, zaznaczam tylko, że trudno o nich wnioskować biorąc pod uwagę wkład Doktorantki w tworzenie tej pracy. Krótkie wprowadzenie zamieszczone przed pracą daje tylko namiastkę umiejętności Doktorantki w tym zakresie.

Udział Doktorantki w powstaniu drugiej pracy jest niewątpliwie znaczący, jest ona drugim spośród siedmiu autorów. Mgr Marta Starczak odpowiadała za syntezę, oczyszczenie i analizę standardów wewnętrznych, które nie były dostępne komercyjnie oraz eksperymenty związane z walidacją i kalibracją metody, a także brała udział w analizie wyników i przygotowywała ryciny i tabele. Praca ta jest szczególnie wartościowa ponieważ opracowana i opisana w *Analytical Chemistry* metoda oparta na zautomatyzowanej dwuwymiarowej

ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS), z zastosowaniem standardów wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami daje możliwość wiarygodnej identyfikacji i szybkiej oraz dokładnej analizy ilościowej wielu modyfikacji DNA. Na uwagę zasługuje fakt, że była to pierwsza metoda pozwalająca na równoczesną analizę szerokiego spektrum endogennie generowanych modyfikacji zasad w DNA podczas analizy pojedynczej próbki. Takie podejście pozwala ocenić poziom określonych modyfikacji na tle innych modyfikacji DNA, co może mieć duże znaczenie dla zrozumienia mechanizmów odpowiadających za zmiany modyfikacji DNA oraz ich biologicznej roli.

Trzecia praca dotyczy udziału askorbinianu, retinolu i tokoferolu w potencjalnym generowaniu epigenetycznych modyfikacji DNA leukocytów pacjentów z nowotworami jelita grubego, gruczolakami oraz zapalną chorobą jelit. W pracy tej jest aż 16 współautorów. Podkreślić jednak trzeba, że Doktorantka jest pierwszym autorem i oprócz wykonania szeregu oznaczeń brała również udział w pisaniu manuskryptu, co zdecydowanie świadczy o jej wiodącej roli w powstaniu tej pracy. W omawianej pracy oprócz analizy porównawczej zawartości 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmUra, 8-oksyoGua w leukocytach krwi osób zdrowych i chorych z nieswoistym zapaleniem jelit oraz pacjentów z łagodnymi i złośliwymi nowotworami jelita grubego, przeprowadzono również ocenę korelacji pomiędzy zawartością poszczególnych modyfikacji DNA a stężeniem w osoczu wybranych witamin oraz ekspresją genów kodujących białka TET, uczestniczących w utlenianiu 5-mCyt. Na uwagę zasługuje bardzo dobre opracowanie statystyczne uzyskanych wyników, które pozwoliło na określenie szeregu zależności. W pracy wykazano istotnie wyższą zawartość 5-mCyt i 5-hmCyt w DNA izolowanym z leukocytów osób zdrowych w porównaniu do pozostałych grup, przy czym najniższą zawartość obserwowano w leukocytach pacjentów z rakiem jelita grubego. Zatem zmiany modyfikacji DNA nie ograniczają się jedynie do samej zmienionej chorobowo tkanki jelita ale mogą być wykrywane w leukocytach, co potencjalnie może zostać wykorzystane do opracowania nieinwazyjnych testów wspomagających diagnostykę raka jelita grubego. Ponadto stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartością w DNA leukocytów 5-hmCyt i 5-hmUra a stężeniem askorbinianu w osoczu, co może sugerować jego istotną rolę w procesie metylacji/demetylacji DNA. Po uważnej lekturze artykułu i opracowania Autorki w dysertacji zwróciły moją uwagę wyniki wskazujące na odwrotną korelację pomiędzy ekspresją niektórych genów TET, szczególnie TET2 a pewnymi

modyfikacjami DNA. Ponieważ taka zależność jest nieoczekiwana, biorąc pod uwagę rolę białek TET, chciałabym aby Doktorantka odniosła się do tych wyników i podjęła próbę wyjaśnienia tego zjawiska.

W pracy czwartej ponownie dokonano analizy zawartości zmodyfikowanych zasad oraz ekspresji genów TETu osób chorych z nieswoistym zapaleniem jelit, gruczolakami i rakiem jelita grubego, ale tym razem na poziomie zdrowych i zmienionych chorobowo tkanek. Ponadto określono ekspresję genu kodującego deaminazę AID oraz ilość białek TET z wykorzystaniem immunohistochemii. Uzyskane wyniki wskazują, że każda zmiana chorobowa jelit cechowała się odrębnym wzorem modyfikacji DNA, który pozwala na odróżnienie ich od siebie, jak również od tkanki prawidłowej. Ponadto okazało się, że zależność pomiędzy zmienionym wzorem modyfikacji a rozwojem raka jest bardzo złożona i nie wynika jedynie ze statusu ekspresji genów TET.

Rozprawę doktorską kończy podsumowanie oraz cztery wnioski. Dwa pierwsze wnioski są poprawnie sformułowane i mają dobre odzwierciedlenie w wynikach. Chociaż uważam, że wszystkie założone cele zostały zrealizowane, to mam pewne wątpliwości dotyczące sformułowań we wnioskach trzecim i czwartym. Wniosek trzeci rozpoczyna zdanie „*Jednym z czynników środowiskowych odpowiadających za rozwój raka jelita grubego może być zależne od diety stężenie L-askorbinianu w osoczu*”. Po pierwsze zdanie to nie jest dobrze stylistycznie napisane, ponieważ sugeruje, że to stężenie askorbinianu w osoczu a nie dieta jest czynnikiem środowiskowym. Po drugie teza, że stężenie to wynika z zawartości askorbinianu w diecie nie jest do końca uprawniona, ponieważ nie mamy dowodu, że dieta pacjentów charakteryzujących się różną zawartością askorbinianu w osoczu była odmienna. Co więcej, ewentualne różnice właściwie zniwelowano na wstępnym etapie badań wykluczając na przykład osoby stosujące suplementy. Różnice w zawartości askorbinianu w osoczu mogą więc bardziej wynikać z różnic wchłaniania czy specyficznych zmian metabolizmu osób chorych. Zatem nie wiadomo tak naprawdę czy obniżona zawartość askorbinianu w osoczu jest „przyczyną czy skutkiem” choroby.

Wniosek czwarty, który ma brzmienie „*Obserwowana już u chorych z nieswoistym zapaleniem jelit i gruczolakami jelita grubego istotnie niższa zawartość 5-mCyt i 5-hmCyt w DNA może przyczyniać się do niestabilności genomu i stanowić decydujący krok w rozwoju raka jelita grubego*” jest w mojej ocenie nieco na wyrost. Praca ma charakter opisowy i porównawczy, a nie mechanistyczny. Trudno na tym etapie jednoznacznie stwierdzić, czy

rzeczywiście ma to decydujące znaczenie w rozwoju raka, tym bardziej że wyniki Doktorantki wskazują, na większą zawartość 5-mdC w DNA z tkanek w przypadku raka jelita w porównaniu z gruczolakiem.

Podsumowując, pomimo pewnych uwag krytycznych przedstawionych z obowiązku recenzenta, wysoko oceniam rozprawę doktorską pani mgr Marty Starczak. Na jej dużą wartość merytoryczną składają się dobrze zaplanowane i przeprowadzone badania, których wyniki opublikowane zostały w bardzo dobrych czasopismach i które dotyczą aktualnego i ważnego problemu jakim jest udział zmian epigenetycznych w procesie nowotworzenia. Dokładne poznanie zależności pomiędzy zaburzeniami modyfikacji DNA a rozwojem raka jelita grubego może przyczynić się do ulepszenia diagnostyki i zapewnić odpowiednio wczesną interwencję, co zdecydowanie może podnieść skuteczność terapii. Autorka w swojej rozprawie przedstawiła wyniki oryginalnych badań, które mają dużą wartość poznawczą, a w przyszłości może też aplikacyjną.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Marty Starczak zatytułowana *Nowe modyfikacje epigenetyczne DNA i ich rola w rozwoju raka jelita grubego* stanowi cenny wkład w poznanie epigenetyki raka jelita grubego i spełnia warunki określone w *art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz U nr 65, poz 595 z późn.zm.)*.

Biorąc powyższe pod uwagę mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczywniosek o dopuszczenie mgr Marty Starczakdo dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysokie walory merytoryczne oraz fakt opublikowania prac składających się na rozprawę w wysokopunktowanych czasopismach proponuję wyróżnienie pracy.

Dr hab. Anna Krześlak

KIEROWNIK
KATEDRY CYTOBIOCHEMII UŁ


dr hab. Anna Krześlak, profesor UŁ

Łódź, 2019-04-29

Dr hab. Anna Krześlak
Katedra Cytobiochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź
tel: +48 42 635 43 35
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl

Wniosek
o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Marty Starczak
pt. „Nowe modyfikacje epigenetyczne DNA i ich rola w rozwoju raka jelita grubego”

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy mgr Marty Starczak oraz fakt opublikowania prac składających się na rozprawę w wysoko punktowanych czasopismach, zgłaszam do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, wniosek o wyróżnienie pracy.

Dr hab. Anna Krześlak

KIEROWNIK
KATEDRY CYTOBIOCHEMII UŁ


dr hab. Anna Krześlak, profesor UŁ