



dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Wrocław, 25.04.2022

OCENA

**Rozprawy doktorskiej Pana mgr Przemysława Leszczyńskiego
pt. „Zmiany wzoru metylacji wysp CpG promotorów genów kodujących proteazy z rodziny
ADAM(TS) w sporadycznym raku jelita grubego.”**

Od wielu lat choroby nowotworowe stanowią jedną z czołowych przyczyn zgonów na świecie. Biorąc pod uwagę starzenie się społeczeństw oraz coraz powszechniejszą obecność czynników rakotwórczych w środowisku, nie można spodziewać się, że w bliskiej przyszłości nastąpi zmiana tego trendu. Molekularne przyczyny powstawania nowotworów są, niestety, skomplikowane, różnorodne i nie ograniczające się do jednego mechanizmu. Jedną z nich jest kumulacja w genomie komórki zmian epigenetycznych, między innymi zmian wzoru metylacyjnego wysp CpG. Dokładne ich poznanie wydaje się być koniecznym nie tylko dla opracowania skutecznych metod terapeutycznych, ale również dla stworzenia nowych, czułych metod diagnostycznych.

Recenzowana Rozprawa powstała w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego, jednostce kierowanej przez Pana Prof. Andrzeja Hendricha. Prace kierowane przez Pana Profesora związane są głównie z terapiami przeciwbakteryjnymi i przeciwwirusowymi. Tym razem jednak, wraz z Doktorantem oraz we współpracy z Zakładem Genetyki, Pan Profesor pochylił się nad poszukiwaniem molekularnych zmian leżących u podłoża rozwoju sporadycznego raka jelita grubego.

Wybór padł na adamalizyny, należące do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, których zmiany poziomu ekspresji podczas rozwoju nowotworów różnego typu oraz podczas przerzutowania wydają się być dobrze udokumentowane, nawet jeśli istnieją niejasności, jaka

jest molekularna przyczyna tych zmian oraz jaka konkretnie jest rola poszczególnych adamalizyn w wymienionych procesach.

W Rozprawie Doktorskiej Autor stawia trzy jasno brzmiące hipotezy:

1. Metylacja promotorów genów z rodziny ADAM i ADAMTS jest częstsza w tkankach raka jelita grubego w porównaniu z tkanką zdrową;
2. Metylacja promotorów genów z rodziny ADAM i ADAMTS jest związana z brakiem fenotypu metylatorowego;
3. Metylacja promotorów genów z rodziny ADAM i ADAMTS jest częstsza w tkankach raka jelita grubego, w których nie znaleziono innych czynników i markerów predysponujących do RJG w tym mutacji w genie BRAF, KRAS oraz niestabilności mikrosatelitarnej.

Hipotezy te Pan mgr Leszczyński weryfikuje krok po kroku w swojej Rozprawie, używając adekwatnych technik molekularnych oraz skrupulatnie analizując uzyskane wyniki. Ponieważ wstęp Rozprawy jest obszerny i porusza liczne zagadnienia związane z etiologią raka jelita grubego, czytelnik nie ma problemu ze śledzeniem toku rozumowania Doktoranta w rozdziale „Dyskusja wyników”.

Podsumowując krótko owe wyniki, w trakcie swoich badań Doktorant wykazał, że:

- w sporadycznych nowotworach jelita grubego (RJG) metylacja wysp CpG w obrębie promotorów genów *ADAMTS1*, *ADAMTS2*, *ADAM12* występuje częściej, niż w tkankach zdrowych jelita;
- metylacja genów *ADAMTS2* i *ADAM12* jest częstsza w RJG o proksymalnej lokalizacji, a ponadto:
- taka metylacja jest częstsza u pacjentów, u których jednocześnie stwierdzono mutacje w genach supresorowych *BRAF* i *KRAS*;
- promotor genu *ADAM12* jest częściej metylowany w guzach o tzw. dodatnim fenotypie metylatorowym, natomiast geny *ADAMTS2* oraz *ADAMTS5* są częściej metylowane w guzach o średnim epigenotypie metylatorowym. Dodatkowo, Promotor genu *ADAMTS5* jest częściej metylowany w guzach wstępujących u kobiet.



Jest to zatem kolejny ważny krok w kierunku lepszego zrozumienia molekularnych zmian towarzyszących powstawaniu raka jelita grubego.

Zadaniem recenzenta jest jednak nie tylko podkreślanie mocnych stron Rozprawy, lecz także wskazywanie uchybień i błędów. O ile nie mam wątpliwości, że wyniki są bardzo wartościowe, to mam kilka uwag do Rozprawy oraz kilka Pytań do jej autora.

Słabszą stroną recenzowanej rozprawy jest bowiem jej strona edytorska. Autor nie ustrzegł się literówek, a nawet błędów większego kalibru. Np. adamilizyny występują w tekście jako adamailizyny, adamilazyny i admalizyny. Autor pisze również: „pod kontem” zamiast „pod kątem”, „adnienią” zamiast „adeniną”, „samo mieszającym” zamiast „samomieszającym”, „do pacjentów” zamiast od pacjentów, „3981 sond niespecyficzne” zamiast „niespecyficznych”, „w raz” zamiast wraz, „w obręcie” zamiast w obrębie, „wacha” zamiast „waha”, „paromotorowej” zamiast „promotorowej” itd.

Przy opisie wiązania domeny PD ADAM z komórkami można przeczytać, że „Najprawomocniej wiązanie to odbywa się za pośrednictwem fibronektyny”. Poza tym Autor prezentuje dość nieortodoksyjne podejście do interpunkcji (chodzi tu głównie o przecinki).

Dalej, w języku polskim pomiędzy liczbą a jednostką typu mg, μ l, h, s stawia się spację, o czym Autor zapomina.

W rozdziale Materiały i Metody, Autor rozprawy kilkakrotnie pisze o zwirowywaniu lub mieszaniu mikropróbówki, gdy tak naprawdę chodzi przecież o jej zawartość.

Metody eksperymentalne opisane są bardzo dokładnie, jednak przy opisach procedury warto byłoby skupić się na celu danego jej etapu, a nie na tym, że dodano bufor ATL, BW, czy D1, skoro czytelnik nie wie, jaki jest skład tychże. Rozumiem, że zostało to uznane za ważne dla jasnego opisanego wykorzystania danego kitu odczynników i z tym się zgadzam, jednak cel danego etapu jest ważniejszy.

Na str. 46 sekwencje DNA z nici komplementarnych genomowego DNA wcale nie są komplementarne: nić A ma 25 nukleotydów, nić B – 26.



Na str. 61 Autor pisze o 34 mutacjach łącznie, jednak podane liczby składowe nie sumują się do 34, tylko do 33.

Dalej: w pracach naukowych tabele i ryciny zwykle pojawiają się blisko miejsca, w którym po raz pierwszy je zacytowano. W recenzowanej Rozprawie tak nie jest. Np. tabela 3 jest wzmiankowana po raz pierwszy na str. 61, a znajduje się dopiero na str. 65 i jest poprzedzona kilkoma rycinami. Rycina 5 w tekście cytowana jest przed rycinami 2-4, a pojawia się po nich, daleko od miejsca pierwszego zacytowania. Jest to bardzo niewygodne dla czytelnika i bardzo utrudnia jednoczesne śledzenie wyników w tekście i na ilustracjach.

W pracy użyto 136 próbek tkanek, z czego 110 były to próbki sparowane: tkanka zdrowa – nowotworowa od tego samego pacjenta. Nie jest jednak jasno powiedziane, w których eksperymentach użyto próbek sparowanych – co prawda czytelnik może to sobie wydedukować, ale nie tak powinno być.

Na stronie 70 znajduje się rycina opisana „Dystrybucja epigenotypów w obrębie poszczególnych statusów metylacyjnych wysp CpG promotrów wybranych genów w tkance nowotworowej”. Co zatem oznaczają + i – opisujące słupki wykresów? Tkanę nowotworową i zdrową?

W dyskusji Autor często pisze o korelacji z częstością występowania nowotworu, jednak zapomina wspomnieć jaka to korelacja – dodatnia czy ujemna?

Chciałabym też, by Autor odpowiedział na dwa pytania:

1. Czy istnieje jakaś hipoteza, w jaki sposób hipermetylacja *ADAMTS2* może przyczynić się do nowotworzenia?
2. Na czym polegają „różne strategie rozwoju nowotworów”, o których Rozprawa wspomina przynajmniej trzykrotnie, a które mają między innymi wyjaśniać rozbieżne wyniki uzyskane przez Doktoranta oraz przez Li i współpracowników, dotyczące częstości występowania metylacji promotora *ADAMTS5* w RJG w porównaniu z tkanką zdrową?

Podsumowując, mimo drobnych uchybień edytorskich oceniam Rozprawę Doktorską Pana Przemysława Leszczyńskiego jako interesującą i nieźle napisaną. Nie mam też żadnych

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁADY WNB****ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ**

ul. H. Sienkiewicza 21

50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53

zfrm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

wątpliwości, że odkrycia Doktoranta wnoszą istotną i niezwykle potrzebną cegiełkę wiedzy dotyczącą biologii raka jelita grubego, sugerując ważną rolę adamalizyn w jego etiopatogenezie.

Na tej podstawie stwierdzam, że Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Leszczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWrocław