Olga Haus

Recenzja 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"**

Rak jelita grubego (RJG) jest bardzo częstym nowotworem, coraz częstszym m.in. ze względu na zmienione nawyki żywieniowe człowieka i zwiększoną zawartość wysoko przetworzonej żywności w diecie.

Głównym tematem badań genetycznych w raku jelita grubego jest jego podłoże molekularne, przede wszystkim dziedziczne aspekty tego podłoża. Niemniej jednak, również cały somatyczny ciąg „wydarzeń genetycznych" jest w RJG bardzo interesujący i coraz częściej analizowane są sporadyczne postacie tego raka, zdecydowanie częstsze niż dziedziczne, należące do ciężkich chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Zainteresowanie sporadycznym rakiem jelita grubego kwitło już wiele lat temu, potem przycichło ze względu na przewagę zainteresowania dziedzicznymi aspektami nowotworów. Ostatnio jednak zauważa się renesans tego zainteresowania; ukazują się liczne prace dotyczące nabytych (somatycznych) zmian genetycznych leżących u podłoża RJG. Związane jest to m.in. z rosnącym zainteresowaniem epigenetyką oraz ze zwiększonymi, w porównaniu z ubiegłymi latami, możliwościami analizy epigenomu.

W tę tendencję wpisuje się praca doktorska mgr biotechnologii Przemysława Leszczyńskiego, poświęcona znaczeniu metylacji genów adamalizyn w rozwoju RJG. Adamalizyny, metaloproteinazy kodowane przez geny z rodzin *ADAM* i *ADAMTS*, mają w dużej mierze charakter supresorów transformacji nowotworowej, stąd hamowanie ich funkcji poprzez metylację wysp CpG ich promotorów może wydatnie wpływać na wzmożenie tej transformacji, również w jelicie grubym.

W pracy stanowiącej podstawę rozprawy doktorskiej mgr Przemysław Leszczyński przebadał status metylacyjny promotorów czterech genów z rodziny

ADAMTS – ADAMTS1, *ADAMTS2*, *ADAMTS5* i *ADAMTS18*, oraz promotora jednego genu z rodziny *ADAM – ADAM12*. Geny te wyselekcjonował stosując technikę mikromacierzy metylacyjnych u chorych z RJG, porównując dane ze zmienionej nowotworowo i zdrowej tkanki jelita grubego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest interesująca merytorycznie, ma typowy układ rozdziałów i podrozdziałów i obfitą (ponad 200 pozycji), aktualną bibliografię.

„Wstęp" stanowi przegląd obecnych poglądów dotyczących etiopatogenezy sporadycznego raka jelita grubego. We wstępie zawarł również Doktorant krótkie podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat adamalizyn, mechanizmów ich działania i roli w nowotworzeniu. Wykazał też, że rola ta nie jest jeszcze w pełni poznana, a niektóre poglądy na nią – sprzeczne, co stanowiło motywację do podjęcia badań nad genami tej grupy białek w pracy doktorskiej.

Hipotezy, które Doktorant chciał potwierdzić w pracy, zostały dobrze sformułowane i mówią o: większej częstości metylacji promotorów genów *ADAM* i *ADAMTS* w tkance nowotworowej w porównaniu ze zdrową, o jej związku, w większości przypadków, z brakiem innych markerów RJG, takich jak mutacje genów *BRAF* i *KRAS* oraz niestabilność mikrosatelitarna. Głównym celem pracy była „próba znalezienia nowych markerów molekularnych i/lub podłoża kancerogenezy RJG". Do osiągnięcia tego celu dążył Autor poprzez realizację następujących celów szczegółowych: ocenę metylacji wysp CpG promotorów wybranych genów z rodzin *ADAM* i *ADAMTS* w tkance RJG w porównaniu ze zdrową tkanką jelita tych samych osób, ocenę, czy metylacja ta występuje częściej w nowotworach z ujemnym fenotypem metylatorowym i czy może ona wpływać na rozwój sporadycznego RJG u osób bez mutacji *BRAF* i *KRAS* i niestabilności mikrosatelitarnej.

Przedstawione cele osiągnął Doktorant poprzez realizację złożonych badań molekularnych, takich jak ocena fenotypu metylatorowego i niestabilności mikrosatelitarnej, [m.in. badania z zastosowaniem mikromacierzy metylacyjnych i specyficznej dla metylacji łańcuchowej reakcji polimerazy (MSP)], ocena mutacji genów *BRAF* i *KRAS* i in.

Metody badań zostały adekwatnie dobrane do założonych celów.

Grupę badaną stanowiło 136 nieleczonych chorych z RJG, w tym 101 z guzem w części dystalnej i 35 w części proksymalnej, od których pobrano wycinki tkanki zmienionej nowotworowo. Od 110 z nich udało się również pobrać fragment zdrowej tkanki jelita grubego, która, choć nie została tak nazwana, stanowiła niejako kontrolę przy ocenie intensywności badanych zmian molekularnych w komórkach RJG. Poza tą „wewnętrzną" kontrolą materiał kontrolny był dobierany do każdego z ocenianych parametrów oddzielnie; dla badań metylacji wysp CpG kontrolą pozytywną było całkowicie zmetylowane genomowe DNA linii komórkowej raka szyjki macicy HeLa (Henrietta Lacks), zaś kontrolą negatywną – cały genom zamplifikowany bez kopiowania wzoru metylacyjnego (REPLI-g), dla badania mutacji genu *KRAS* kontrolą pozytywną było DNA linii komórkowej SW480. Innych kontroli nie było, a przynajmniej nie zostały one wymienione w rozdziale „Materiały i metody". Zarówno grupa badana, jak i grupa i materiał kontrolny zostały dobrze dobrane do założonych badań.

Metodyka badań była bardzo złożona i obejmowała wiele metod badań molekularnych, uwzględniając różnorodne techniki PCR i oparte na nich metody, np. COBRA, analiza MSI, MSP i inne, amplifikację całego genomu bez wzoru metylacyjnego (MDA, ten skrót nie został objaśniony w „Spisie skrótów i słowniku"), macierze metylacyjne. Precyzyjny opis zastosowanych metod pozwala na przypuszczenie, że Autor przynajmniej część z nich realizował osobiście, co świadczyłoby, że dysponuje bogatym warsztatem badawczym, dającym szansę na kontynuację badań w przyszłości. W opisie badań funkcjonuje jednak błędne określenie „reakcja łańcuchowej polimerazy" zamiast „łańcuchowa reakcja polimerazy" i inne drobne błędy, wymagające korekty.

Do analizy wyników posłużyły dobrze dobrane narzędzia bioinformatyczne i metody statystyczne.

Wyniki badań wskazały na największy udział epigenotypów o niskiej metylacji (LME) wśród badanych próbek (84 próbki), i najmniejszy epigenotypów o wysokiej metylacji (HME – 10 próbek). Epigenotypy HME zaklasyfikował Autor do grupy klasycznego dodatniego fenotypu metylatorowego CIMP+, a połączone epigenotypy IME i LME do klasycznego fenotypu CIMP-.

Analizując mutacje w genie *KRAS* Doktorant wykazał, że kojarzyły się one z „niskim" fenotypem metylatorowym albo jego brakiem (IME, LME = CIMP-), natomiast w grupie z „wysokim" fenotypem metylatorowym (HME = CIMP+) mutacji nie wykryto. Analizę PCR-RFLP mutacji genu *KRAS* zilustrował doktorant przejrzystą ryciną 2, z adekwatną legendą. Natomiast w tekście pracy pomylił numerację prób – próbie 7 zamiast 6 przypisał heterozygotyczną mutację u pacjenta, podczas gdy próba ta odpowiada kontroli pozytywnej, o czym zresztą wspomina dwie linijki niżej.

Obecność mutacji V600E w genie *BRAF* kojarzyła się w badanej grupie z wysokim fenotypem mutatorowym.

Natomiast niestabilność mikrosatelitarna, wskazywana przez część autorów jako marker stopnia zaawansowania i złośliwości RJG, nie kojarzyła się z żadnym epigenotypem.

Badanie porównawcze tkanki RJG z tkanką zdrową, przeprowadzone z użyciem mikromacierzy metylacyjnych, wykazało znaczne nakładanie się wyników między grupami HME i LME; dotyczyło to 49% wszystkich metylowanych wysp CpG. Rozkład metylowanych wysp CpG w trzech epigenotypach przedstawił Doktorant na ryc. 6. Jednak ze względu na brak jej opisu, jest ona słabo czytelna, zrozumiała tylko w łącznej analizie z ryciną 7, ale i tak nie do końca, gdyż niektóre wartości liczbowe nie zgadzają się między tymi rycinami. W sumie wykazano, że 666 wysp CpG było metylowanych we wszystkich trzech epigenotypach, w tym m.in. wyspy zlokalizowane w genach należących do rodzin *ADAM* i *ADAMTS*. Spośród nich do dalszej analizy wybrano *ADAMTS 1*, *2*, *5* i *18* oraz *ADAM12*. Cenny jest fakt, że wszystkie dane uzyskane z badań macierzowych zostały zdeponowane w internetowej bazie danych NCBI Gene Expression Omnibus.

Dla ww. wybranych genów porównywano częstość występowania metylacji w ich promotorach (MSP), stwierdzając różnice pomiędzy metylacją w tkance nowotworowej a metylacją w tkance zdrowej (największe dla *ADAMTS 1* i *2* oraz *ADAM12*), potwierdzając tym samym słuszność ich wyboru jako markerów nowotworzenia do dalszych badań. Jednocześnie stwierdzono nierówną dystrybucję metylacji ww. genów pomiędzy różnymi epigenotypami.

Dalsze analizy wykazały znamienną korelację między metylacją promotora genu *ADAMTS2* a proksymalną lokalizacją guza, mutacją genu *KRAS* i

epigenotypem IME. Dla *ADAMTS5* stwierdzono częstszą metylację w komórkach RJG kobiet niż mężczyzn oraz korelację z epigenotypem IME. Dla metylacji *ADAM12* wykazano korelację z proksymalną lokalizacją guza, obecnością mutacji *BRAF* oraz dodatnim fenotypem metylatorowym, CIMP+. Dla genów *ADAMTS 1* i *18* nie znaleziono żadnych korelacji, przy czym Autor omyłkowo pisze tu (str. 71) o genie *ADAMTS5* zamiast *ADAMTS18*.

Wyniki swoich badań, czasem zgodne, a czasem sprzeczne z wynikami innych badaczy, przeanalizował Doktorant w rozdziale „Dyskusja", wykazując się analitycznym myśleniem i dojrzałością naukową. Dyskusja jest dobrą częścią rozprawy; Doktorant krytycznie analizuje każdy aspekt wyników swojej pracy w odniesieniu do wyników innych autorów oraz do możliwości zastosowania w praktyce klinicznej. W dyskusji nie ma błędów merytorycznych, jednak na str.75 gen *ADAMTS5* został wymieniony w dwóch przeciwstawnych grupach – tej, w której udało się metodą MSP potwierdzić metylację stwierdzoną w badaniu z zastosowaniem mikromacierzy metylacyjnych, i w tej, w której się to nie udało.

Rozprawę kończy sześć dobrze sformułowanych, odpowiadających poszczególnym celom pracy, wniosków, wyciągniętych bezpośrednio z wyżej przedstawionych jej wyników.

Praca jest merytorycznie dobra, oryginalna, powstała z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych i dotyczy najbardziej gorącego obecnie tematu w genetyce, czyli epigenetyki.

Jednak ogólnie dobre wrażenie dotyczące pracy, oprócz ww. wymienionych błędów i nieścisłości paramerytorycznych (w tym m.in. „gen *PTEN* [...] jest powodem (???) mniej niż 1% wszytkach (???) RJG", „autosomalnie dominujące mutacje", „reakcja łańcuchowej polimerazy", psują obecne w niej błędy językowe; co najmniej kilka błędów ortograficznych (wacha się, „pod kontem" zamiast „pod kątem"), dużo błędów stylistycznych, kalki językowe (wydaje się być, wydają się korespondować, itp.) i stosunkowo dużo literówek, błędy w zapisie nazwisk znanych uczonych (np. Linch zamiast Lynch, Bar zamiast Barr) i inne. Wymienione błędy i niedociągnięcia nie obniżają jednak w znacznym stopniu merytorycznej wartości pracy. Poza tym praca zasługuje na druk w anglojęzycznym czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w którym

błędy polszczyzny nie będą w ogóle grały roli. A jednak szkoda, że znalazły się one w dobrej skądinąd pracy…

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska „Zmiany wzoru metylacji wysp CpG promotorów genów kodujących proteazy z rodziny ADAM(TS) w sporadycznym raku jelita grubego" pana mgr biotechnologii Przemysława Leszczyńskiego jest oryginalną pracą, opartą na dobrym projekcie badawczym. Jej wyniki mają znaczenie poznawcze, poszerzając wiedzę o etiopatogenezie sporadycznego raka jelita grubego, a w przyszłości być może również kliniczne, gdyż metylacja genów adamalizyn może się stać, przynajmniej w niektórych aspektach, markerem nowotworzenia w jelicie grubym.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 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.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie pana mgr Przemysława Leszczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz, 07.08.2022

prof. dr hab. med. OLGA HAUS
specjalista genetyki klinicznej
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
internista
8560460 98010894
tel. 601 55 12 02