



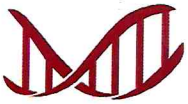
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Bartosza Muchy „Związek naprawy DNA z polimorfizmem genów HRR i NHEJ u pacjentów z rakiem jelita grubego”.

Procesom nowotworzenia często towarzyszy aktywacja protoonkogenów lub inaktywacja genów supresorowych będące wynikiem niestabilności genetycznej. Zmiany genetyczne mogą objawiać się substytucjami, insercjami lub delecjami nukleotydów, amplifikacją bądź utratą genów lub też rozległymi rearanżacjami prowadzącymi do utraty części, bądź całych chromosomów. Niestabilność chromosomową obserwuje się w przeważającej części przypadków sporadycznego raka jelita grubego. Konsekwencją niestabilności chromosomowej jest nierównowaga w liczbie chromosomów, subchromosomalne amplifikacje czy utrata heterozygotyczności. U podstaw rearanżacji materiału genetycznego stoją pęknięcia na obu niciach DNA oraz procesy rekombinacji kwasów nukleinowych. Mechanizmami stojącymi na straży integralności materiału genetycznego, odpowiadającymi za naprawę podwójnych pęknięć w DNA są procesy naprawy poprzez homologiczną rekombinację oraz łączenie niehomologicznych końców DNA. Za całkowicie uzasadniony należy więc uznać cel badań jaki postawiono przed Doktorantem wiążący obecność wybranych polimorfizmów genów, lub ich obszarów promotorowych, systemu naprawy podwójnych pęknięć DNA oraz zachorowalność na raka jelita grubego.

Doktorant podjął się bardzo ambitnego zadania próbując nie tylko powiązać obecność wybranych polimorfizmów z częstością występowania RJG, ale także przeprowadził wyszukane badania molekularne pozwalające na ich funkcjonalną analizę. Tak zaawansowane badania molekularne były możliwe dzięki doskonałemu warsztatowi badawczemu oraz ogromnemu doświadczeniu zespołu prof. Ireneusz Majsterka.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny. Część doświadczalna jest poprzedzona wstępem literaturowym wprowadzającym czytelnika w sposób bardzo kompetentny kolejno w epidemiologie raka jelita grubego, czynniki ryzyka, podłoże molekularne, uszkodzenia dwuniciowe DNA oraz mechanizmy ich naprawy. Ta część pracy jest napisana bardzo ładnym

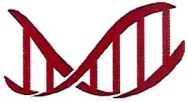


językiem naukowym i dostarcza czytelnikowi wszystkich niezbędnych informacji dla właściwego zrozumienia dalszych części dysertacji. Za wypadek przy pracy należy więc uznać zdanie (str. 13) „Badania z indukcją knock-downu ekspresji PLK1...” będące typową kalką językową. Doktorant pisze na str. 23, że „... niepożądane zmiany w STR (short tandem repeats) są szczególnie niebezpieczne, gdy występują blisko regionów kodujących białka, gdzie najczęściej powodują zmiany ramki odczytu”. **Czy Doktorant miał na myśli występowanie STR w regionach kodujących ? Jeśli nie to proszę o wyjaśnienie mechanizmów opisywanej zależności.** Autor w sposób bardzo kompetentny przedstawia „tło genetyczne” raka jelita grubego z wymienieniem najważniejszych zmian genetycznych opisanych w chorobach nowotworowych w tym w RJG jak np. rolę czynnika transkrypcyjnego dla genów regulujących progresję cyklu komórkowego oraz przeżywalność (CMYC), którego amplifikację stwierdza się w 5-30% przypadków RJG (str. 20), czy też mutacje w MLH1 i MLH2 (systemu MMR) zwiększające ryzyko RJG do nawet 80% (str. 24). Czy właśnie potencjalnie odmienne tło genetyczne u pacjentów ze zdiagnozowanym RJG nie jest powodem często sprzecznych doniesień literaturowych dotyczących roli określonych SNP w zapadalności na RJG ? **Czy Doktorant zgodzi się z przemyśleniami recenzenta, że wprowadzenie analizy tła genetycznego pacjentów chociaż dla wybranych genów, lub określenie niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) czy typów fenotypu metylacji (CIMP) pozwoliłoby na uzyskanie statystycznie znamiennej zależności pomiędzy określonymi polimorfizmami a zapadalnością na RJG i większą spójność pomiędzy badaniami prowadzonymi dla różnych grup pacjentów ?**

Cele pracy są jasno sformułowane i mają swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach.

Przyjęta metodologia badań, liczne, świetnie dobrane grupy badawcza oraz kontrolna, gwarantowały rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorant zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje bogactwo zastosowanych technik molekularnych, właściwie dobranych, dla identyfikacji badanych polimorfizmów, poziomu ekspresji genów oraz wydajności procesu naprawy DNA. Jedynie opis genotypowania RFLP-PCR (str. 68) uległ prawdopodobnie w czasie edycji



doktoratu rearanżacjom połączonym z utratą części treści i wymaga korekty jeśli ma służyć młodszemu kolegom pojawiającym się w laboratorium.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant w swoich badaniach nie ograniczył się do charakterystyki obecności badanych polimorfizmów u osób z grupy kontrolnej i badanej, ale podjął się znacznie trudniejszej metodycznie oceny wydajności naprawy DNA oraz poziomu ekspresji, z wykorzystaniem genu reporterowego, zależnej od obecności badanych polimorfizmów co wymagało przeprowadzenia szeregu reakcji miejscowo-specyficznej mutagenezy.

Otrzymane w czasie realizacji badań wyniki dowodzą skutecznej realizacji ambitnych celów pracy. Przedstawiona dokumentacja naukowa oraz przeprowadzona analiza statystyczna wyników dowodzi realizacji poszczególnych etapów pracy i świadczy o bardzo dobrym, metodycznym przygotowaniu autora.

W pierwszej części badań Doktorant zastosował metodę PCR-RFLP dla identyfikacji wybranych polimorfizmów w genach i/lub sekwencjach promotorowych genów zaangażowanych w naprawę podwójnych pęknięć DNA. Przedstawione, jednoznacznie udokumentowane wyniki badań, wykazały, że spośród badanych polimorfizmów, allel T polimorfizmu 172 G/T genu RAD51, allel A polimorfizmu -4601 A/G tego samego genu oraz allel G polimorfizmu -1394 G/T genu XRCC4 oraz genotypy T/C i C/C polimorfizmu -991 T/C genu XRCC6 mogą być związane ze wzrostem ryzyka występowania RJG. Natomiast genotyp Thr/Met polimorfizmu 241 genu XRCC3 może wpływać na obniżenie ryzyka występowania RJG. **Czy na bazie otrzymanych wyników wskazujących jednoznacznie na zwiększone ryzyko zachorowania na RJG dla polimorfizmów w genach systemu NHEJ (XRCC4, XRCC6) lecz nie w genach HRR (RAD51 i XRCC3) oraz dostępnych danych literaturowych można mówić o większym znaczeniu systemu NHEJ niż HRR w niestabilnościach genetycznych prowadzących do procesu nowotworzenia, w tym do RJG ?**

Ciekawych informacji dostarczyły także przeprowadzone analizy kombinacji podwójnych SNP w obrębie genów związanych z HRR i NHEJ. Doktorant przeprowadził również analizę rozkładu genotypów i częstości występowania alleli badanych SNP w kontekście wpływu na progresję RJG. **Jak Doktorant tłumaczyłby wyraźny związek**

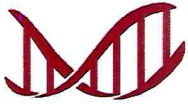


pomiędzy obecnością badanych wariantów polimorficznych genów NHEJ a występowaniem RJG i jednocześnie brak wpływu tych polimorfizmów na progresję RJG.

Bardzo ciekawą częścią pracy była przeprowadzona przez Doktoranta ocena aktywności promotorów genów związanych z HRR oraz NHEJ w kontekście badanych polimorfizmów. Znamienne statystycznie różnice w ekspresji genu reporterowego zaobserwowano jedynie dla SNP 135 G/C oraz 172 G/T genu RAD51 oraz -991 T/C genu XRCC6 w prawidłowych komórkach epitelialnych jelita. Zastosowany układ badawczy był idealny dla określenia bezpośredniej zależności pomiędzy badanym SNP a aktywnością transkrypcyjną danego genu. Jednak w przypadku bardziej złożonych zależności, dany SNP może być elementem koniecznym lecz nie wystarczającym dla zmian ekspresji genu, które mogłyby wymagać dodatkowych zmian kompensacyjnych np. w sekwencjach genów kodujących czynniki transkrypcyjne należałoby zaproponować inną metodykę badań. **Czy Doktorant rozważał również możliwość określenia poziomu ekspresji badanych genów bezpośrednio w tkankach osób noszących badane polimorfizmy ?**

Niezwykle ciekawa metodycznie była część pracy poświęcona określeniu oceny efektywności naprawy NHEJ i HRR. Przeprowadzone analizy nie pozwoliły na wykazanie znaczących statystycznie różnic w efektywności naprawy żadnego z badanych mechanizmów u osób zdrowych i pacjentów z RJG. Doktorant wskazuje na prawdopodobnie zbyt niską czułość zastosowanej metody w stosunku do częstości badanych zjawisk. **Czy mógłby Doktorant określić jaka była częstość badanych procesów NHEJ i HRR zachodzących w badanych komórkach.**

Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo dojrzały, a Doktorant krytycznie odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. W dyskusji uzasadniono również wybór określonych polimorfizmów dla badań w aspekcie RJG. Szczególnie zastanawiająca jest przytoczona przez Doktoranta ogromna rozbieżność danych literaturowych dotyczących nawet zbliżonych populacji w aspekcie badanych polimorfizmów. **Czy ujednoczenie metodyki badań oraz ankiet kwalifikujących pacjentów oraz osoby w grupach kontrolnych oraz stworzenie bazy danych typu „open access” nie pozwoliłyby na uzyskanie bardziej jednoznacznych odpowiedzi odnośnie roli określonych polimorfizmów w wybranych chorobach**



nowotworowych ? Proszę Doktoranta o komentarz na ten temat podczas publicznej obrony.

Wnioski wyciągnięte przez Doktoranta są w pełni uprawnione i mają całkowite pokrycie w przedstawionych danych eksperymentalnych.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgr Bartosza Muchy uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. **Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr Bartosza Muchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pana mgr Bartosza Muchy przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

