

Dr hab. n. med. w zakresie biologii medycznej Monika Dmitrzak-Węglarz
Zakład Genetyki w Psychiatrii
Katedra Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej magister Moniki Lesickiej

pt. „**Analiza profilu metylacji i ekspresji kluczowych genów rytmu okołodobowego w raku piersi.**”

Promotor: Dr hab. Edyta Reszka, prof. IMP
Zakład Genetyki Molekularnej i Epigenetyki
Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra. med. Jerzego Nofera
w Łodzi

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy imienia prof. dra. med. Jerzego Nofera w Łodzi z dnia 5 grudnia 2016r., powołującą mnie do wypełnienia obowiązków recenzenta w przewodzie doktorskim Pani Moniki Lesickiej, przedkładam recenzję rozprawy przygotowanej pod kierownictwem naukowym Pani dr hab. Edyty Reszki. Równocześnie pragnę stwierdzić, co następuje:

1. rozprawa doktorska Pani Moniki Lesickiej pt. „Analiza profilu metylacji i ekspresji kluczowych genów rytmu okołodobowego w raku piersi.” stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę zagadnienia naukowego;
2. w przedstawionej do oceny rozprawie Doktorantka wykazała ogólną wiedzę teoretyczną z zakresu onkologii, rytmów okołodobowych oraz genetyki;
3. lektura przedłożonej pracy w postaci cyklu trzech opublikowanych w prestiżowych, recenzowanych i punktowanych czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym potwierdza umiejętności Doktorantki do prowadzenia pracy naukowej.

Przygotowana przez Doktorantkę rozprawa doktorska w pełni odpowiada kryteriom wynikającym z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. W uzasadnieniu tych ocen przedstawiam następujące uwagi i spostrzeżenia merytoryczne dotyczące recenzowanej rozprawy doktorskiej.

1. Uwagi ogólne

Rak piersi jest drugim po raku płuc najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie. Z kolei wśród kobiet jest najczęściej występującym nowotworem na świecie, niezależnie od poziomu rozwoju ekonomicznego różnych jego regionów. Zajmuje piąte miejsce wśród przyczyn śmierci z powodu chorób nowotworowych i stanowi najczęstszą przyczynę zgonów wśród pacjentek onkologicznych. Według raportu Polskiego Towarzystwa Badań na Rakiem Piersi, rak piersi jest najczęściej diagnozowaną chorobą nowotworową i drugą nowotworową przyczyną śmierci także wśród polskich kobiet. Dostrzeżenie tego problemu stało się powodem objęcia polskiej opieki onkologicznej opracowaniem „Strategii walki z rakiem w Polsce 2015-2024” oraz wprowadzeniem rządowych pakietów reform, których celem jest poprawa efektywności systemu ochrony zdrowia i zwiększenie dostępności pacjentów do skutecznej diagnostyki i leczenia.

Pomimo, że rak piersi jest jednym z nowotworów o najlepiej poznanej etiologii, posiada opracowane standardy profilaktyczne, i różne opcje terapeutyczne, w Polsce obserwujemy wzrost liczby zachorowań u kobiet w wieku 20-49 lat. Oznacza to, że rak piersi coraz częściej dotyka kobiet w pełni aktywnych zawodowo, rodzinie i społecznie, co ma swoje konsekwencje społeczne i ekonomiczne. Dlatego identyfikacja kluczowych czynników determinujących skuteczność diagnozowania i leczenia raka piersi jest nadal istotnym priorytetem badań naukowych w skali kraju i świata, co potwierdza ważkość podjętego przez Doktorantkę tematu badawczego.

Czynniki genetyczne stanowią główną przyczynę zwiększonej predyspozycji do nowotworów. Jest ona najlepiej widoczna w zespole genetycznie uwarunkowanego raka piersi za który odpowiadają mutacje w genach BRCA1 i 2 – jednak stanowi on 3-5% wszystkich diagnozowanych przypadków. Oznacza to, że w pozostałych przypadkach w predyspozycji znaczenie mają również inne, zarówno znane (np. geny supresorowe czy onkogeny), jak i jeszcze niezidentyfikowane geny biorące udział w predyspozycji wielogenowej. W tym względzie zwrócenie uwagi przez Doktorantkę na „geny zegarowe” odpowiadające za rytm okołodobowy organizmu, tkanek i komórek w predyspozycji do rozwoju raka piersi jest nowatorskim podejściem w badaniu populacji polskiej o bardzo dobrze udokumentowanych podstawach naukowych. Procesy biofizyczne i biochemiczne zachodzące w organizmach żywych wykazują cykliczne zmiany zwane „rytmami biologicznymi”. Rytmu te mają naturę endogenną i są uwarunkowane genetycznie. Badania naukowe prowadzone już w latach dziewięćdziesiątych dowiodły, że guzy nowotworowe podlegają rytmom okołodobowym organizmu jak również rozwijają własne rytmy biologiczne zależne od stopnia zaawansowania,

rodzaju guza, tempa jego wzrostu stopnia zróżnicowania. Ponad to guzy mogą również oddziaływać na rytmy okolicznych tkanek. Obserwacje te stały się przyczynkiem do wysunięcia hipotezy, że rytmy mogą być wykorzystane w optymalizacji leczenia nowotworów co ma związek z cyklicznością przemian metabolicznych. W 2017 r. trzech naukowców: Jeffrey Hall, Michael Rosbash oraz Michael Young zostało uhonorowanych Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za odkrycie tajemnicy zegara biologicznego. Naukowcy Ci rozpoczęli badania w 1984r. na modelu muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*). Odkryte przez nich geny zegarowe działają w uniwersalnym modelu sprzężenia zwrotnego również we wszystkich komórkach ludzkiego ciała. Nagroda za to wybitne osiągnięcie potwierdza słuszność obranego przez Doktorantkę kierunku badawczego i wytypowania do analizy kluczowych genów zegarowych zarówno na poziomie polimorfizmów pojedynczych polimorfizmów (SNP) oraz ich ekspresji konstytutywnej.

Kolejnym istotnym punktem i jednocześnie celem głównym obranego tematu badawczego Doktorantki jest oceną statusu metylacji promotorów genów zegarowych u pacjentek z rakiem piersi. Mechanizmy regulacji epigenetycznej są dziedziczne, wpływają na regulację ekspresji genów bez zmiany w sekwencji DNA. Wpływ długotrwanie działających niekorzystnych czynników środowiskowych może wpływać na metylację DNA i zmieniać ekspresję kluczowych genów predyspozycji nowotworowej. Metylacja stanowi punkt styyczny w którym łączą się niegenetyczne zmiany ekspresji genów pod wpływem czynników środowiskowych, które również mogą tłumaczyć etiologię raka piersi.

Dokonując oceny przedstawionej rozprawy należy przede wszystkim wskazać na aktualność tematu wpisujący się w światowy trend prowadzonych badań. Nowatorskie ujęcie wynika z połączenia wiedzy i doświadczenia wielu dyscyplin (epidemiologia, onkologia, genetyka, biologia molekularna, analiza bioinformatyczna i statystyczna). Pomimo trudnego i złożonego charakteru, praca jest spójna i bardzo dobrze udokumentowana na każdym jej etapie.

Ponad to należy zwrócić uwagę, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM. Zatem badania były poprzedzone wnioskiem zawierającym projekt, harmonogram i kosztorys badań, który również podlegał ocenie formalnej i merytorycznej dokonanej przez ekspertów w określonych dziedzinach.

W zasadzie moja rola recenzenta jest wyłącznie formalna, ponieważ na rozprawę składa się cykl trzech oryginalnych prac. Wszystkie zostały poddane rygorystycznej

procedurze recenzji podczas procesu publikacji w renomowanych i punktowanych czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym.

2. Uwagi szczegółowe

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych to cykl trzech oryginalnych prac, liczy łącznie z piśmiennictwem uzupełniającym i załącznikami 124 strony. Opracowanie jest opatrzone jest „Wstępem”, „Celami pracy”, „Materiałami i metodami”, „Wynikami”, „Podsumowaniem najważniejszych wyników” oraz „Wnioskami” w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane, aktualne. Praca napisana jest w sposób bardzo jasny, ilustrowana dobrze opisanymi rycinami, starannie opracowana pod względem edytorskim.

We „Wstępie” Doktorantka przedstawia dane epidemiologiczne raka piersi wraz z opisem wieloczynnikowej etiopatogenezy obejmującej czynniki genetyczne i środowiskowe.

Następnie przedstawia dane z piśmiennictwa potwierdzające związek zaburzeń rytmu okołodobowego z rozwojem raka piersi u kobiet. W tej części zawarty jest opis kluczowych genów zegarowych biorących udział w „generacji i utrzymaniu rytmu okołodobowego na poziomie komórek”. Doktorantka przedstawia mechanizm utrzymania przez geny zegarowe homeostazy organizmu, regulację procesów fizjologicznych oraz zaburzenia tych procesów na skutek zmian cywilizacyjnych i wpływu niekorzystnych czynników środowiskowych. W kolejnej części przedstawia dotychczasowe wyniki badań potwierdzające: a) zmieniony poziom ekspresji genów zegarowych, b) zmieniony poziom metylacji regionów promotorowych genów zegarowych oraz c) asocjacje polimorfizmów SNP genów zegarowych u pacjentek z rakiem piersi. Podsumowanie tej części dowodzi braku kompleksowej analizy genów rytmu okołodobowego w populacji polskich kobiet z rakiem piersi. Część ta potwierdza bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do prowadzonych badań.

„Cele pracy” zostały wyczerpująco opisane w siedmiu punktach z których każdy jest odniesiony do publikacji stanowiących cykl i podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych. Cele obejmują analizę zależności zmienionej ekspresji, metylacji i polimorfizmów SNP w wybranych genach zegarowych z ryzykiem rozwoju raka piersi w różnych konfiguracjach wraz z uwzględnieniem parametrów klinicznych. Część ta zaświadcza o wieloaspektowym podejściu Doktorantki do przedstawionego tematu badawczego.

„Materiały i metody” zawierają informacje na temat zgody lokalnej Komisji Bioetycznej; szczegółowy opis badanej populacji obejmującej zarówno grupę pacjentek jak i zdrowe ochotniczki; metody izolacji materiału biologicznego; technikę badania ekspresji genów; badanie profilu metylacji, genotypowanie oraz wykorzystane metody analizy statystycznej. Wszystkie opisane metody są dobrane adekwatnie do prowadzonych analiz i zgodne ze sztuką prowadzenia analiz molekularnych w poszczególnych etapach. Na szczególną uwagę zasługuje właściwy i dobór metod statystycznych gwarantujący rzetelne i wiarygodne wnioskowanie.

„Wyniki” zostały zaprezentowane jako podsumowanie rezultatów opublikowanych w poszczególnych pracach składających się na cykle z uwzględnieniem kolejności poszczególnych konsekwentnie realizowanych celów pracy. Dzięki takiemu uporządkowaniu recenzent nie ma najmniejszego problemu połączenia pracy z celem i wynikiem.

Cel 1

Doktorantka zbadała profil ekspresji 10 genów zegarowych w parach tkanka guza piersi vs. tkanka otaczająca wolna od komórek nowotworowych 107 pacjentek, potwierdzając obniżony poziom ekspresji dla genów CRY2, PER1, PER2, PER3 podwyższony poziom ekspresji dla genów CLOCK i TIMELESS w tkance guza.

Cel 2

Doktorantka analizowała poziom ekspresji w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby, statusu dla receptorów: estrogenowych (ER- i ER+), progesteronowych (PR- i PR+) oraz ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu (HER- i HER+). Poczynione obserwacje potwierdziły zależność poziomu transkrypcji genu CRY2 ze stopniem zaawansowania choroby oraz poziomu ekspresji genów: CRY2 oraz RER1, 2 i 3 ze statusem hormonalnym guza.

Cel 3

Doktorantka zbadała profil metylacji regionów promotorowych 9 genów zegarowych w parach tkanka guza piersi vs. tkanka otaczająca wolna od komórek nowotworowych w odniesieniu do parametrów klinicznych i poziomu ekspresji badanych genów. Zaobserwowano obniżony poziom metylacji regionów promotorowych genów BMAL1, CLOCK i CRY2 oraz podwyższony poziom dla genów PER1, 2 i 3 w tkance guza vs. tkanka otaczająca wolna od komórek nowotworowych.

Cel 4

Doktorantka analizowała poziom metylacji regionów promotorowych genów zegarowych w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby, zróżnicowania guza, rodzaju histopatologicznego guza i typu molekularnego raka. Istotne zmiany we wzorze metylacji

zaobserwowano w przypadku genów PER1, 2 i 3 w przypadku tkanek guza o wyższej złośliwości histopatologicznej i hormonalnej (ER-/PR-).

Cel 5

Przeprowadzona analiza korelacji poziomu ekspresji i metylacji regionów promotorowych genów zegarowych wskazała na istnienie istotnego związku w przypadku genów CLOJ, PER2 i 3 oraz CRY2. Szczegółowe analizy potwierdziły, że hipometylacja wiąże się z nadekspresją genu CLOCK a hipermetylacja z obniżoną ekspresją genów PERIOD i zaburzeniem ich funkcji supresorowej.

Cel 6

Analiza asocjacyjna łącznie 16 polimorfizmów SNP w 10 genach zegarowych u 321 pacjentek i 364 osób zdrowych pozwoliła na wykazanie związku z podwyższonym ryzykiem zachorowania w przypadku polimorfizmów genów CRY2, PER2 i PER1 oraz wykazanie efektu ochronnego w przypadku polimorfizmu genu BMAL1.

Cel 7

Doktorantka zbadała również wpływ polimorfizmów genetycznych na poziom ekspresji genów zegarowych w tkance guza jak i tkance otaczającej wolnej od komórek nowotworowych. Stwierdzono wpływ polimorfizmów genetycznych na poziom ich ekspresji w tkance guza w przypadku genu BMAL1, CRY2 i PER3. Analogiczny związek w tkance otaczającej dotyczył genów PER1 i PER2.

„Podsumowanie najważniejszych wyników” oraz „Wnioski” stanowią kluczowe podsumowanie realizacji pracy i uzyskanych wyników i są adekwatne do realizowanych z niezwykłą konsekwencją postawionych celów.

Przedstawiona rozprawa doktorska Pani Moniki Lesickiej wskazuje, że Doktorantka była bardzo dobrze merytorycznie przygotowana do podjęcia badań naukowych dotyczących trudnego problemu badań molekularnych w raku piersi. W sposób rzetelny i konsekwentny przeprowadziła badania, które poddane krytycznej ocenie recenzentów zyskały uznanie redaktorów i zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Nie uszła również mojej uwadze analiza bibliometryczna pozostałego dorobku Aplikantki, która świadczy o jej aktywności, zaangażowaniu i systematyczności publikacyjnej.

Wobec powyższego moim obowiązkiem jest potwierdzenie, że przedłożona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza bardzo wysoki poziom wiedzy Doktorantki w zakresie szerokiego wachlarza dyscyplin ujętych

w niniejszej rozprawie a także w sposób niebudzący żadnych wątpliwości potwierdza zdolność Doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wniosek o dopuszczenie Pani mgr Moniki Lesickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. dra med. Jerzego Nofera w Łodzi.

Jednocześnie spełnia wszystkie punkty regulaminu wyróżnienia rozprawy doktorskiej o co wnioskuję z pełnym przekonaniem do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi.

Poznań 24.02.2020r.0

Z wyrazami szacunku
Prof. Jerzy Nofer