



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 61 869 1427
61 869 1532
www.ckdm.ump.edu.pl

Poznań, dnia 27.07.2018 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Kingi Bednarek
pt. „Udział wybranych genów o potencjale onkogennym lub supresorowym w patogenezie
płaskonabłonkowego raka krtani”,
w związku z powierzeniem obowiązku recenzenta
przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

1. Znaczenie podjętych badań

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Jarmuż-Szymczak. Praca dotyczy próby zbadania mechanizmu patogenezy raka krtani. Pośrednio może więc się przyczynić do identyfikacji molekularnych markerów prognostycznych, diagnostycznych i punktów uchwytu celowanych leków w nowotworach krtani. Ze względu na zróżnicowaną charakterystykę przedmiotu badań, jest to zadanie niebywale trudne. I tym samym już na wstępie należy podkreślić, że praca jest wyjątkowo wielowątkowa i bardzo rozbudowana. Tym bardziej trzeba docenić nakład pracy Autorki konieczny w dążeniu do realizacji celu i obiektywnego zbadania problemu. Praca napisana została w sposób logiczny z uwzględnieniem ciągu przyczynowo-skutkowego.

Rozprawa powstała w wyniku realizacji projektu badawczego finansowanego przez dwa projekty NCN (w tym Preludium – autorskiego Doktorantki) oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Podjęcie przez Doktorantkę wspomnianej tematyki jest logiczną konsekwencją i rozwinięciem badań prowadzonych przez promotora rozprawy, a dotyczących patogenezy i zwalczania nowotworów głowy i szyi. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie z zastosowaniem standardowych i najnowocześniejszych technik biologii molekularnej, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników o kluczowym znaczeniu dla poznania mechanizmów towarzyszących procesom nowotworzenia w krtani.

2. Ocena pracy

A) Ocena merytoryczna

W zwięzłym wstępie liczącym 13 stron Autorka przedstawia podstawowe informacje dotyczące raka krtani, tj. jego występowania, leczenia i patogenezę. Następnie podejmuje problem regulacji ekspresji genów o znanym i potencjalnym znaczeniu dla etiologii raka krtani, w tym szczegółowo opisuje geny podlegające badaniu w rozprawie. Wartość merytoryczną zwięzłego Wstępu oceniam bardzo wysoko.

W Założeniach i celu pracy Doktorantka wskazuje na konieczność poszerzenia wiedzy dotyczącej mechanizmów uczestniczących w patogenezie raka krtani ale i w dziedzinie identyfikacji markerów diagnostycznych i terapeutycznych. Cel zdefiniowany jest jasno w 4 krótkich punktach (cele szczegółowe). Cel pracy uznaję za ambitny i nowatorski, wymagający pracy eksperckiej zarówno przy uzyskiwaniu jak i opracowywaniu wyników.

Materiały i metody przedstawiono na aż 44 stronach, co w dużym stopniu mówi o złożoności i zaawansowaniu pracy. Doktorantka szczegółowo charakteryzuje stosowane podłoża, bufony, odczynniki i przeciwciała wskazując ich pochodzenie. Szczegółowo charakteryzuje materiał pierwotny pochodzenia śródoperacyjnego, a więc najmocniejszą stronę całej pracy i w konsekwencji decydującą o wartości uzyskanych wyników. Podstawą do uzyskania przełomowych wyników było zastosowanie tak innowacyjnych i wysokoprzepustowych metod jak qPCR/HRM czy mikromacierze ekspresyjne oraz interferencja RNA, co zdecydowanie podnosi walory poznawcze pracy.

Wyniki przedstawione zostały na 54 stronach, są bogato ilustrowane rycinami i fotografiami oraz opisują kolejne etapy realizacji rozprawy. Dodatkowo praca została wzbogacona o liczne graficzne załączniki. Praca polegająca na próbie oceny udziału grupy genów (ATAD2, CDK1, CEACAM6, CLCA4, FUT3, LAPTM4B, NETO2, SERPINH1, SFRP2 oraz SNAI2) w patogenezie raka krtani doprowadziła do wytypowania genu CDK1 jako potencjalnego onkogenu. Doktorantka wykazała jego zwiększoną ekspresję w komórkach nowotworowych w odniesieniu do prawidłowych zarówno na poziomie mRNA jak i białka. W świetle jednak uzyskanych wyników oraz świadomej oceny Doktorantki, hipoteza ta wymaga weryfikacji. Doktorantka zasugerowała też, na podstawie obserwowanych zmian w poziomie metylacji, udział czynników epigenetycznych w kontroli ekspresji genu CEACAM6. Przez wzgląd na odnotowane obniżenie jego ekspresji w komórkach nowotworowych, została wysunięta hipoteza o jego potencjale supresorowym. Tu podobnie wniosek jest ostrożny i ponownie wymaga weryfikacji w ramach dalszych

badan, czego świadomość Doktorantka w pełni wykazuje. Trzeba jednak przyznać, że takie pionierskie wyniki mogą mieć ogromne znaczenie dla przebiegu dalszych badań nad metabolizmem raka krtani.

W Dyskusji wyników przedstawionej na 21 stronach Doktorantka dokonała logicznego podziału na poszczególne części dotyczące odpowiednio interpretacji wyników dotyczących genów o zaobserwowanej podwyższonej, obniżonej ekspresji oraz genów o potencjalnie onkogennej i supresorowej roli. Doktorantka umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki w odniesieniu do danych piśmiennictwa. Ta część pracy wydaje się szczególnie wartościowa, ponownie wielowątkowa ale i ostrożna. Reasumując, zarówno dyskusja jak i zwięzłe podsumowanie to bardzo mocne strony pracy. Zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że sama Autorka, świadoma ograniczeń, wskazuje konieczność kontynuacji badań. Świadomość ta owocuje sformułowaniem czterech złożonych i ponownie ostrożnych ale adekwatnych do uzyskanych wyników wniosków.

Integralna część pracy to 2 zwięzłe (jak na ogrom materiału i uzyskanych wyników) streszczenia, odpowiednio w języku polskim i angielskim. Rozprawę zamyka wykaz skrótów, spis elementów graficznych pracy tj. rycin i tabel oraz wykaz piśmiennictwa, które pochodzi z ostatnich lat (143 pozycje, prawie wyłącznie anglojęzyczne).

B) Strona formalna

Rozprawa doktorska napisana jest w układzie klasycznym, obejmuje 181 stron z uwzględnieniem szczegółowego spisu treści, który ułatwia poruszanie się po dość bogatej pracy. Integralną część pracy stanowią dwa zwięzłe streszczenia odpowiednio w języku polskim i angielskim. Rozprawa przygotowana jest bardzo starannie i jednocześnie ciekawie. W pracy pojawiły się nieliczne błędy edytorskie i zapożyczenia z języka angielskiego. I tak, wydaje się np., że przy tworzeniu ryciny 1 zapożyczanie oryginału w języku angielskim nie było konieczne i można było ten schemat przedstawić w języku polskim. Podobnie, należy wspomnieć, że odpowiednikiem określenia stosowanego przez Doktorantkę tj. *medium*, jest w języku polskim pożywka lub podłoże hodowlane. Wydaje się również, że w wyjątkowo szczegółowo opisanej sekcji Materiały i Metody nie wyjaśniono w sposób satysfakcjonujący jak 2 ml ekstraktu komórkowego zawierającego RNA przeniesiono z płytki hodowlanej do probówki typu Eppendorf o pojemności zaledwie 1,5 ml. Należałoby również stosować odpowiednią nazwę dla substratu dla peroksydazy chrzanowej jakim jest **luminol**, a nie *luminal*, jak znalazło się na stronie 45 rozprawy. Korzystnym dla pracy byłoby również ujednolicenie czasu narracji – w pracy czas przeszły dokonany i niedokonany stosowane są na

przemian. Zastanawiające jest również dlaczego do oceny przeżywalności komórek nie zastosowano metod takich jak barwienie błękitem trypanu, liczenie komórek, ocena markera proliferacji ki67, cytometria przepływowa czy test klonogenności. Ten niedosyt wynika jednak zdecydowanie z faktu, że apetyt, również recenzenta, rośnie w miarę jedzenia. Praca jest bowiem bardzo obszerna, a zastosowana liczba metod i ich jakość oraz poziom zaawansowania ale i interpretacji wyników tworzą efekt końcowy absolutnie wyjątkowy i nieprzeciętny. Zdaniem recenzenta, aby dopełnić obrazu, w dokumentacji zabrakło jedynie grafik krzywych topnienia uzyskanych metodą qPCR/HRM.

Wśród nielicznych uwag chciałbym jeszcze zaznaczyć, że informacja o kluczu jakim Doktorantka posługiwała się w doborze genów przeznaczonych do badania, została zaprezentowana dopiero w materiałach i metodach, a nie już we wstępie. Zrodziło to pewien niedosyt na etapie pierwszego rozdziału pracy. Niedosyt pozostaje w jeszcze jednej kwestii – trudno znaleźć pod poszczególnymi wynikami informację o liczbie powtórzeń danych eksperymentów. Widząc dział poświęcony statystyce i odchylenia standardowe należy przypuszczać, że powtórzenia były ale trudno powiedzieć w jakiej liczbie.

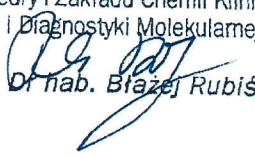
4. Wniosek końcowy

Doktorantka porusza w rozprawie bardzo aktualny, ciekawy i jednocześnie trudny temat. Sposób prezentacji uzyskanych wyników oraz cała praca robią bardzo dobre wrażenie, co daje efekt nadążania formy za przebogatą i wartościową treścią.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że Autorka przygotowała bardzo ciekawą rozprawę, zgodną z Ustawą 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.). Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Kingi Bednarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wnikliwą analizę uzyskanych wyników w dziedzinie badania patogenezy raka krtani wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem

Kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Molekularnej

Dr hab. Błażej Rubiś