21 WRZ. 2011 130 prof. M. Mirowski

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Department of Pharmaceutical Biochemistry
Laboratory of Molecular Biology & Pharmacogenomics
tel/fax: +48 42 677-91-26

E-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Pracownia Biologii Molekularnej
i Farmakogenomiki
tel/fax:+48 42 677-91-26
E-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Łódź, dnia 21 września 2011 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Seta
"Rola *WWOX*, genu supresorowego nowotworów w gruczole mlekowym i jego kancerogenezie"
przedstawionej Radzie Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Seta została przygotowana w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Katedry Medycyny Molekularnej i Biotechnologii UM w Łodzi pod kierunkiem prof. Andrzeja Bednarka. Tym samym tematycznie wiąże się ze znanymi mi zainteresowaniami badawczymi Katedry, a szczególnie Promotora pracy dotyczącymi stosunkowo niedawno odkrytego genu *WWOX*, zidentyfikowanego na długim ramieniu chromosomu 16 człowieka w obszarze 16q23.3-24.1 w odkryciu którego Promotor miał znaczący udział o czym świadczą nie tylko opublikowane, w czasopismach wysoko impaktowanych prace ale również, uzyskany wspólnie z prof. M. C. Aldazem, patent USA o numerze 09/978,318 dotyczący wykorzystania *WWOX* w diagnostyce terapii nowotworów.
Główna część badań w dysertacji była nakierowana na wykonanie analiz mikromacierzowych wykorzystujących sondy cDNA w celu identyfikacji zmian ekspresji genów biorących udział w szlakach sygnałowych, funkcjonalnych i metabolicznych w zależności od zmian ekspresji genu *WWOX*.

Rozprawa jest skonstruowana w sposób typowy dla prac promocyjnych. Dodatkowo, otrzymałem płytę CD zwierającą „DANE ŹRÓDŁOWE" dla każdego z eksperymentów mikromacierzowych, zestawienie publikacji (2 - jedna oryginalna i jedna poglądowa), doniesień zjazdowych (10) i projektów badawczych – grant promotorski MNiSzW i „stypendium wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów" powstałych/otrzymanych w związku z realizacją tematu stanowiącego przedmiot rozprawy.

Ogólnie dysertacja mieści się w tematyce biologii nowotworów gruczołu mlekowego. Jest to zagadnienie budzące zainteresowanie zarówno klinicystów, jak też przedstawicieli badań podstawowych gdyż praktycznie od wielu lat zachorowalność na raka piersi wykazuje tendencje wzrostowe, a jego wyleczalność jest niezadowalająca. Dlatego każdy nowy wkład, czy to po stronie klinicznej, czy czysto poznawczej jest cenny sam w sobie i stwarza nadzieje dla chorych. Zatem podjęcie badań, które zmaterializowały się w rozprawie doktorskiej było w pełni uzasadnione.

Wprowadzenie opracowane w oparciu o najnowsze piśmiennictwo dobrze naświetla problem raka piersi jego epidemiologię i etiologie, patologię, diagnostykę wraz z czynnikami rokowniczymi. Autorka dysertacji zwraca także uwagę na przełom jaki dokonał się w ostatnich latach w profilowaniu molekularnym nowotworów w tym raku piersi w oparciu o porównawcze analizy mikromacierzowe

ekspresji genów, które obecnie wykorzystywane są do opracowywania nowych klasyfikacji nowotworów, a nawet jak pisze we wstępie do oferowania przez firmy nowych testów prognostycznych opartych o profilowanie molekularne.
Fragment wstępu dotyczący genu *WWOX* i jego białkowego produktu stanowi zdecydowanie najlepszą część rozprawy, bardzo dojrzałą w warstwie merytorycznej, prezentując najnowsze dane o charakterystyce (genu i białka), możliwych alternatywnych transkryptach genu i jego partnerach (m. in. P73, P53, Bcl-2, Bax, P21, CDK2, CDK4, YAP, RUNX2, białek rodziny AP-2, ErbB2, ErbB4, Jun, białek oddziałujących z cytoszkieletem komórki – ezryną). Autorka we wstępie podsumowuje również znaczenie biologiczne i kliniczne *WWOX*/WWOX w raku piersi w oparciu o piśmiennictwo przedstawiające jego badania w eksperymatach *in vivo* i *in vitro*. Wstęp kończy opisem linii nowotworowej raka piersi MDA-MB-231, który uzasadnia jej wybór do przeprowadzonych w dysertacji badań.

W metodyce Doktorantka posługuje się nowoczesnymi, wymagającymi dużego zaangażowania i umiejętności technikami. Poczynając od hodowli komórek raka piersi, które poddawała transdukcji z użyciem wektora pLNCX2 (pusty dla kontroli negatywnej) i przenoszący cDNA genu *WWOX*. Przeprowadzenie z sukcesem analiz mikromacierzowych wymagało również otrzymania wysokiej jakości, dobrze skwantyfikowanego RNA i wysokiej jakości cDNA, w którym do tych analiz po reakcji odwrotnej transkrypcji neutralizowano nie przepisaną matrycę RNA, oczyszczano i kwantyfikowano jednoniciowe cDNA, a następnie poddawano je znakowaniu metodą nieenzymatyczną za pomocą barwników fluorescencyjnych Cy3 i Cy5. Jak podkreśla Autorka ten sposób znakowania pozwalał na pełną kontrolę procesu znakowania i określenie procentowego stopnia wyznakowania cDNA. Do oznaczeń zmian ekspresji genów Doktorantka użyła dwa rodzaje mikromacierzy o niskiej gęstości Human Disccover Chips (ArrayIt, Telechem), które zawierają 380 genów reprezentujących główne szlaki komórkowe i mikromacierzy wysokiej gęstości Human OneArray (Phalanx Biotech) zawierających 30968 sond odpowiadających genom ludzkim opisanych aktualnie w światowych bazach danych. Przygotowane do analiz cDNA pochodziło z transdukowanych komórek MDA-MB-231 pozyskiwanych przez Doktorantkę samodzielnie i tkanek raka piersi otrzymanych wcześniej w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej. Sama analiza macierzowa wymagała przeprowadzenia w optymalnych warunkach procesu prehybrydyzacji, hybrydyzacji, odmycia niezwiązanego, wyznakowanego cDNA skanowania mikromacierzy. Tak przeprowadzony z sukcesem eksperyment musiał zostać poddany obróbce statystycznej wyników, w której Doktorantka wykazała się dużą inwencją ale i pracowitością gdyż opanowała nową i trudną specjalność naukową jaką jest bioinformatyka. Wyrazem tego jest wykorzystanie do analiz dostępnych oprogramowań komercyjnych jak również szeregu oprogramowań dostępnych on-line.
Wyselekcjonowane w eksperymentach mikromacierzowych geny o zmienionym poziomie ekspresji poddano weryfikacji techniką Real-time PCR (QRT-PCR). Analizie poddano 19 genów badanych, których poziomy zostały odniesione do 3 genów referencyjnych. Do weryfikacji wpływu wywieranego przez gen *WWOX* na nowotworowe komórki raka piersi (linia MDA-MB-231), oceny cytotoksyczności oraz nietrwałych zmian wywołanych transdukcją, Doktorantka posługuje się testem żywotności komórek – opartym o alamar Blue, testem badającym potencjał proliferacyjny – bazującym na wbudowywaniu do DNA 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) oraz testem umożliwiającym detekcję komórek apoptotycznych. Wszystkie ww. testy są nowymi, wysokiej czułości testami fluorescencyjnymi. Dla potwierdzenia danych mikromacierzowych dla dwóch produktów białkowych, metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) zastosowano technikę zymograficzną.

Z omówieniem uzyskanych wyników, pomimo ogromu informacji jakie niosą za sobą analizy mikromacierzowe Doktorantka poradziła sobie dobrze. Dla mikromacierzy o niskiej gęstości Human Disccover Chips zdołała wyselekcjonować 7 genów, które przy obecności genu *WWOX* w komórkach MDA-MB-231 wykazywały zwiększoną ekspresję oraz 10 których poziom ekspresji był wyraźnie obniżony. Dokonała również klasteryzacji hierarchicznej genów przedstawiając uzyskane wyniki w postaci tzw. dendrogramu, tj. wykresu obrazującego hierarchię kolejnych łączonych przez algorytm klastrów. Dla zidentyfikowanych genów o zmienionej ekspresji zaproponowała mapy zależności pomiędzy nimi co pozwoliło na zidentyfikowanie 7 szlaków sygnałowych w które te geny są zaangażowane oraz określenie kierunku ich modulacji.

Te same mikromacierze i te same opracowania statystyczne posłużyły do wyselekcjonowania genów z pooperacyjnych tkanek raka piersi, które wstępnie zróżnicowano na przypadki o wysokiej i niskiej ekspresji genu *WWOX*. Znaczące obniżenie ekspresji zaobserwowano dla 21 genów, a znaczące jej podwyższenie dla 9 genów. Zaproponowano sieć powiązań pomiędzy zidentyfikowanymi genami. Autorka dla 4 szlaków sygnałowych (dla komórek MDA-MB-231 i pooperacyjnych raków piersi) zaobserwowała możliwość ich modulacji przez gen *WWOX*, z których 3 ujawniły identyczny kierunek zmian (szlak apoptozy, integrynowy szlak sygnałowy i szlak sygnałowy receptora EGF).

Następnym krokiem prowadzonych przez Doktorantkę analiz był eksperyment z wykorzystaniem ludzkich macierzy genomowych Human OneArray zawierających 30968 sond pokrywających aktualnie opisane geny i transkryptomy w którym dokonano porównawczej analizy ich ekspresji dla komórek MDA-MB-231 trandukowanych cDNA dla genu *WWOX* i komórek referencyjnych. Analizy statystyczne ujawniły znaczące różnice w poziomach ekspresji dla 507 genów z których 325 ujawniło zwiększoną, a 182 zmniejszoną ekspresję. Analiza możliwych szlaków sygnałowych modulowanych przez gen *WWOX* ujawniła, że z 20 zaprezentowanych szlaków największą liczbę genów o zmienionej ekspresji odnotowano dla szlaku WNT, szlaku sygnałowego stanu zapalnego i szlaku integrynowego.
Po wykonaniu pracochłonnych badań mikromacierzowych i nie mniej trudnych analizach statystycznych Autorka dysertacji dokonała weryfikacji poziomu ekspresji 18 wybranych genów techniką ilościowego PCR uzyskując potwierdzenie badań mikromacierzowych. Przeprowadziła także badania biologiczne (żywotność, proliferacja, apoptoza), które wykazały, że zwiększona ekspresja genu *WWOX* wpływa korzystnie na rutynowe leczenie raka piersi (doksorubicyna, cisplatyna). Badając techniką zymograficzną aktywność dwóch metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) w linii MDA-MB-231 trandukowanych cDNA dla genu *WWOX* wykazała zmniejszoną aktywność MMP-2, co wiąże się z lepszą prognozą dla pacjenta.

W obszernej, 19 stronicowej dyskusji Doktorantka bardzo wnikliwie odnosi uzyskane w swojej dysertacji wyniki do dotychczas dostępnych w piśmiennictwie światowym. Bardzo szczegółowo dyskutuje wpływ genu *WWOX* na apoptozę, cykl komórkowy, cytotoksyczność wybranych leków, na ekspresję genów kodujących białka strukturalne oraz białka związane z rozwojem i różnicowaniem. Na podstawie wyników globalnej analizy zmian ekspresji genów w komórkach MDA-MB-231 transdukowanych cDNA genu *WWOX* przedstawia i dyskutuje najsilniej modulowane dodatnio przez ten gen szlaki wśród których znalazły się szlak WNT i apoptoza oraz modulowane ujemnie (obniżona ekspresja genów) - szlak integrynowy, szlak sygnałowy r. EGF i angiogeneza. Zestawia również procesy biologiczne, które zostały wyselekcjonowane na bazie zmian poziomu ekspresji genów na które ma wpływ obecność genu *WWOX*.

Przeprowadzone w dysertacji analizy pozwoliły na sprecyzowanie 4 wniosków końcowych oraz konkluzji, że gen *WWOX* nie jest typowym genem supresorowym nowotworów, ale może odgrywać rolę w prawidłowym różnicowaniu komórek i modelowaniu tkanek.

Pracę kończy dwustronicowe streszczenie, wykaz piśmiennictwa obejmujący 280 pozycji i oświadczenie Doktorantki.

Stwierdzam staranne przygotowanie rozprawy nie tylko w znaczeniu poprawności, ale również estetyki. Szczęśliwie doktorant zawsze zostawi trochę miejsca dla czepliwego recenzenta. Przykładowo:

- Wyłowiono pewną liczbę błędów edytorskich np.: str. 9 linia 4 od dołu „...opornienie pojawiania się pierwszej miesiączki" raczej opóźnienie; str 11 linia 2 i 7 od dołu zamiast „...z angielskiego: ductal carcinoma ..." powinno być „(ang. ductal carcinoma...)"; str. 14 linia 3 od góry ."...bezpośredni związane..." powinno być „...bezpośrednio związane..."; str. 17 „Pierwszym i jednym..." powinno być „Pierwszym i jedynym..."; str. 21 gen WWOX – w podtytule 2.1 i w pierwszym zdaniu jak również na str. 23 w podpisie Ryc. 4. powinien być napisany *italikiem*, podobnie na str 37 linia 3 od góry. W podpisie tej ryciny 4 warto byłoby wyróżnić eksony i introny. Przyjmując zasady pisowni genów ludzkich i ich produktów białkowych, białka P73, P53, P21 na str. 26, 27 powinny być napisane dużą literą. Sugerowałbym przeredagowanie zdań rozpoczynającego się w linii 3 i linii 11 na str. 37; str. 38 linia 3 od dołu „...ze względu obecność..." powinno być „...ze względu na obecność..."; str. 39 linia 2 podrozdział 2.3.5. „...myszy bezgranicznych...' powinno być „...myszy bezgrasiczych...", podobnie na str. 40 linia 2 „...u bezgasicznych..." powinno być „...u bezgrasiczych; str. 45 zdanie pierwsze w 3 akapicie wymaga usunięcia słowa przeprowadził i poprawienia pisowni genu *WWOX*; w opisie reakcji Real-time PCR na str. 55 wyjaśnienia wymaga zastosowany skrót bufor GTPB; zdanie drugie na str. 66 wymaga przeredagowania; str. 103 linia 4 zamiast hetrodimery winno być heterodimery; str. 109 w streszczeniu linia 9 przeszczepy ksenograficzne a nie kserograficzne; w rozdziale wyniki na str. 78 podrozdział 5.4. podano, że oznaczenie poziomu ekspresji wykonano dla 18 genów podczas gdy w streszczeniu podana liczba wynosi 20 a w Tabeli 8 (Materiały i Metody) – 19; w pozycji 53 w wykazie piśmiennictwa brakuje roku wydania.
- Myślę, że byłoby dobrze gdyby Doktorantka zamieściła w swojej dysertacji streszczenie w języku angielskim oraz zgodę Komisji Bioetycznej na wykonanie badań na materiale ludzkim ponieważ używała cDNA, który co prawda został wyizolowany przez inną osobę w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej ale z tkanek pooperacyjnych.

W podsumowaniu chciałbym podkreślić nowatorski charakter badań prowadzonych przez mgr inż. Karolinę Seta, który polegał na wykorzystaniu nowoczesnego narzędzia jakim są mikromacierze w celu identyfikacji zmian ekspresji genów biorących udział w szlakach sygnałowych, funkcjonalnych i metabolicznych w zależności od zmian ekspresji genu *WWOX*. Uzyskane wyniki wniosły nowe informacje o genie *WWOX*, który do tej pory był identyfikowany z typowym genem supresorowym nowotworów podczas gdy uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na wykazanie, że jest on raczej zaangażowany w prawidłowe różnicowanie komórek i modelowanie tkanek, a obniżenie jego ekspresji zaburza szlaki sygnałowe prowadząc do utraty zdolności prawidłowego różnicowania i integralności tkanki co jest cechą charakterystyczną procesu nowotworowego. Obok analiz mikromacierzowych Doktorantka opanowała technikę pomiaru poziomu ekspresji genów w czasie rzeczywistym, hodowle komórkowe i nowoczesne techniki badania cytotoksyczności, żywotności komórek, ich proliferacji, apoptozy oraz technikę zymograficzną.

Opanowała nową i trudną specjalność naukową jaką jest bioinformatyka. Zrealizowane przez Doktorantkę badania polegające na profilowaniu ekspresji genów dają nadzieję na opracowanie testu genomowego który może prowadzić do poprawy prognozowania przebiegu choroby jak również doboru najlepszej dla pacjenta strategii terapeutycznej. Dlatego pomysł badań, i ich wykonanie oceniam bardzo

wysoko. Podkreślić należy znaczną aktywność Doktorantki dotyczącą publikowania i prezentowania wyników prowadzonych badań i fakt, że dysertacja zawiera jeszcze znaczny arsenał danych nieopublikowanych. Badania tego typu wymagają znacznego finansowania i docenić należy fakt uzyskania przez Doktorantkę dwóch prestiżowych grantów na realizacji pracy doktorskiej.

Czuję się zatem zobowiązane do sformułowania dwóch wniosków adresowanych do Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego:

- stwierdzając, że praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Seta do dalszych etapów przewodu doktorskiego,
- uprzejmie proszę o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy doktorskiej, w której element NOVUM stanowi istotny wkład w badania stosunkowo niedawno odkrytego genu *WWOX* i biologię nowotworów gruczołu mlekowego.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski