

Olsztyn, 03.03.2016 r.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik
Katedra Genetyki Zwierząt
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
UWM w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Klaudii Pawliny
pt. **Charakterystyka mutacji w komórkach nowotworowych sarkoidu końskiego**,
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej
i promotora pomocniczego dr inż. Artura Gurgula

Sarkoidy są najczęściej występującymi nowotworami skóry u koni. Szacuje się, że stanowią prawie połowę wszystkich nowotworów u tego gatunku zwierząt. Mimo iż charakteryzują się małą złośliwością i w większości przypadków choroba ta nie stanowi zagrożenia dla życia zwierzęcia, jednak z racji umiejscowienia zmian, często utrudnia normalne użytkowanie oraz obniża wartość ekonomiczną konia. Przyczyną choroby jest infekcja wirusowa powodowana brodawczakiem krowim typu 1 i 2, jednak dotychczas nieznanne są mechanizmy molekularne zainicjowania procesu onkogenezy i transformacji neoplastycznej. Wpisując się w nurt badań światowych mgr inż. Klaudia Pawlina podjęła ważny naukowo i aplikacyjnie temat identyfikacji zmian liczby kopi genomowego DNA (CNV, ang. *copy number variation*) jako potencjalnego czynnika etiologicznego oraz uwzględniając udział genów kodujących mikroRNA w tych sekwencjach podjęła próbę określenia profilu ekspresji mikroRNA w komórkach nowotworowych sarkoidu końskiego.

Charakterystyka pracy

Praca doktorska mgr inż. Klaudii Pawliny ma formę klasycznej rozprawy naukowej i obejmuje rozdziały: Przegląd literatury, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literatura. W pracy zamieszczono również „Materiały uzupełniające”, będące graficzną prezentacją zidentyfikowanych aberracji w 13. próbkach sarkoidu końskiego. Do całości opracowania liczącego 164 strony zostały dołączone na nośniku elektronicznym dodatkowe materiały uzupełniające dotyczące części wynikowej pracy. Szkoda natomiast, że w maszynopisie nie został zamieszczony indeks skrótów, co znacznie

ułatwiłoby studiowanie przedłożonej dysertacji. Praca jest napisana językiem naukowym w dobrym stylu z zachowaniem właściwej sekwencji omawianych zagadnień. Na podkreślenie zasługuje staranność przygotowania strony graficznej i wydawniczej. Wykaz cytowanej literatury jest obszerny i obejmuje 307 pozycji, z których tylko 3 są polskojęzyczne. Przytłaczająca większość prac została opublikowana w ostatnich 10 latach w znanych i cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pozycje piśmiennictwa, mimo ich dużej liczby, dobrane zostały w sposób przemyślany ograniczony głównie do zakresu badań.

Mimo dużej staranności opracowania Autorka nie uniknęła drobnych błędów redakcyjnych i niefortunnych sformułowań, np. „choroby mendlowskie”, „mieszając co jakiś czas”, „o najwyższej liczbie”.

W rozdziale Przegląd literatury w części wstępnej Autorka zamieściła podstawowe informacje z zakresu genetycznych przyczyn powstawania chorób nowotworowych. W dalszej części przedstawiła kompletną wiedzę na temat sarkoidu końskiego z uwzględnieniem patogenezy, typów klinicznych, czynników predysponujących, metod diagnostycznych oraz transmisji wirusa BPV (ang. *bovine papillomavirus*). W kolejnych podrozdziałach dokonała starannej i wielowątkowej kompilacji dotychczasowych wyników badań dotyczących występowania w genomie zmiennej liczby kopii DNA (CNV) jako potencjalnego czynnika etiologicznego sarkoidu oraz roli mikroRNA w transformacji nowotworowej. Należy uznać, że opracowany przegląd piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w obszarze badawczym, w którym mieści się przygotowana rozprawa, a część dotycząca zmiennej liczby kopii DNA i roli mikroRNA w komórce potwierdza właściwe przygotowanie merytoryczne do prowadzenia tego typu badań. W tej części pracy zabrakło mi natomiast szerszej informacji na temat znaczenia utraty heterozygotyczności (tzw. *cnLOH*, ang. *copy neutral Loss of Heterozygosity*) w procesie onkogenezy, ponieważ w części wynikowej pracy aberracja ta stanowi przedmiot szczegółowej analizy.

Właściwy dobór pozycji bibliograficznych i umiejętność argumentowania pozwoliły Autorce wytyczyć siedem bardzo szczegółowych celów pracy, które odzwierciedlają poszczególne etapy przeprowadzonych badań i analiz. Szkoda, że przy tak szerokim spektrum badań Autorka nie podjęła się trudu sprecyzowania celu nadrzędnego.

W rozdziale Materiał i metody Autorka opisała zgromadzony do badań materiał biologiczny, zastosowane techniki molekularne, przeprowadzone analizy laboratoryjne,

bioinformatyczne i statystyczne. Godnym uznania jest liczba i opis zastosowanych analiz bioinformatycznych i statystycznych, w którym Autorka podaje pełną argumentację wykorzystanych narzędzi. Podane w tym rozdziale informacje upoważniają do stwierdzenia, że doświadczenie zostało zaprojektowane profesjonalnie z uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych i analitycznych. Na podkreślenie zasługuje ogromna czaso - i pracochłonność zastosowanych metod badawczych, ich analiza oraz trud w pozyskanie materiału biologicznego, gdyż 16 próbek udostępnionych zostało przez Klinikę Koni oraz Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Bernie (Szwajcaria). W opisie materiału zwierzęcego należało zamieścić informację o rasie koni i ich wieku, gdyż jak podaje sama Autorka w przeglądzie piśmiennictwa, są to istotne czynniki predysponujące do występowania sarkoidu skórniego. Brakuje również informacji na temat typów klinicznych sarkoidu. Pewien niedosyt budzi również brak uzasadnienia dlaczego w kolejnych etapach badań uwzględniano różne liczby próbek. W mojej ocenie informacja dotycząca liczby próbek powinna zostać zamieszczona na przedstawionym schemacie dotyczącym kolejności działań objętych metodyką, zmierzających do osiągnięcia przyjętych celów pracy.

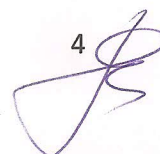
Uważam również, że zbędnym było zamieszczanie bardzo szczegółowych opisów procedur, których wykonanie przeprowadzono w oparciu o protokoły producenta dołączone do zestawów odczynników, zwłaszcza że podawane nazwy odczynników, a najczęściej symbole literowe, czytającemu niewiele wnoszą, ponieważ są one charakterystyczne dla poszczególnych protokołów.

W następnej części opracowania (Wyniki) Autorka zamieściła wyniki uzyskane z kolejnych etapów badań zmierzających do wskazania mutacji w komórkach nowotworowych sarkoidu końskiego. Stosując metodę mikromacierzy SNP dokonała identyfikacji aberracji liczby kopii genomowego DNA występujących w tkance zdrowej a następnie sarkoidowej koni. Analizę otrzymanych danych Autorka przeprowadziła z bardzo dużą dbałością o wiarygodność uzyskanych wyników, stosując dwie niezależne metody obliczeniowe (algorytm *cnvPartition* i *PennCNV*), co pozwoliło Jej na wskazanie w genomie tkanki zdrowej regionów wspólnych (tzw. konsensusów). W celu identyfikacji aberracji powstających *de novo* w komórkach nowotworowych zastosowała program *OncoSNP*, jako jedyny uwzględniający heterogeniczną naturę guza oraz CNV germinalne. Walidacja uzyskanych wyników z zastosowaniem metody ilościowego PCR (qPCR) oraz dodatkowo w przypadku tkanki sarkoidowej metody

mikromacierzy CGH potwierdziła dużą zgodność z wynikami uzyskanymi z pierwszego etapu badań (tkanka zdrowa 60%, tkanka nowotworowa 80%). Na podstawie tak kompleksowo przeprowadzonych analiz Autorka wykazała, że tkanka sarkoidu charakteryzuje się w stosunku do tkanki zdrowej dwukrotnie większą liczbą aberracji, co może wskazywać na podwyższoną niestabilność materiału genetycznego w komórkach nowotworowych. W obrębie rozpoznanych aberracji dokonała identyfikacji genów pod kątem szlaków biologicznych, w których biorą udział ich produkty i wykazała, że największy udział stanowiły geny związane ze ścieżkami mikroRNA zaangażowanymi w proces transformacji neoplastycznej. Skłoniło to Autorkę do podjęcia dalszych badań mających na celu określenie zmian profilu ich ekspresji między obiema badanymi tkankami. Zastosowanie metody sekwencjonowania następnej generacji umożliwiło Autorce identyfikację 249 znanych oraz 568 potencjalnie nowych mikroRNA, z których 144 występowało wyłącznie w tkance nowotworowej. Jest to bardzo ważna informacja, zważywszy na fakt, że badania mikroRNA u koni są w fazie początkowej. Analiza bioinformatyczna mikroRNA ulegających różnicowej ekspresji między sarkoidem a tkanką kontrolną pozwoliła Autorce na wskazanie 77 szlaków biologicznych, z pośród których wytypowała 10 o największej liczbie genów docelowych dla mikroRNA związanych z inicjacją i progresją procesu nowotworowego. Rozdział ten mimo, że zawiera bardzo dużo informacji liczbowych jest czytelny ze względu na dobrze opracowane tabele oraz ryciny.

Dyskusja wyników nawiązuje do zakresu przeprowadzonych badań i została napisana z dużą znajomością zagadnienia i literatury źródłowej. Pani mgr inż. Klaudia Pawlina wyniki własnych analiz przedstawiła na tle badań przeprowadzonych przez innych badaczy. Uważam, że jest to bardzo interesująca część rozprawy, gdyż Autorka podjęła się wyjaśnienia uzyskanych przez siebie rezultatów nie tylko w odniesieniu zmiennej liczby kopii genomowego DNA i ekspresji genów zidentyfikowanych w obrębie ich sekwencji występujących u koni, ale także doszukuje się powiązań z procesem onkogenezy u ludzi, zwłaszcza że rola mikroRNA w tym procesie jest stosunkowo mało poznana.

Rozprawa zakończona jest ośmioma logicznie sformułowanymi wnioskami, odzwierciedlającymi osiągnięcia naukowe wykonanej pracy i odnoszącymi się do celów badań. Należy podkreślić zachowanie dużej ostrożności Autorki przy ich formułowaniu.



Podsumowanie

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. mgr inż. Klaudii Pawliny jest cenną pozycją piśmiennictwa naukowego. Uzyskane wyniki mają nie tylko duże znaczenie naukowe ale są perspektywicznie ważne aplikacyjne, gdyż przybliżają nas do poznania podłoża molekularnego transformacji neoplastycznej, nie tylko w przypadku sarkoidu skórno u koni, ale również chorób nowotworowych występujących u ludzi. Niepodważalnym walorem tej pracy jest kompleksowość przeprowadzonych analiz oraz wszechstronna dbałość o wiarygodność uzyskanych wyników. Z pewnością będzie to cytowana pozycja literatury naukowej. Zakres przeprowadzonych analiz świadczy o dużej wiedzy merytorycznej oraz opanowaniu nowoczesnych technik analitycznych mgr inż. Klaudii Pawliny. Wymienione w recenzji uwagi mają wyłącznie charakter porządkowy i dyskusyjny i nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania.

Wniosek końcowy

Oceniając wysoko poziom naukowy, oryginalność i perspektywicznie ważność uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. mgr inż. Klaudii Pawliny pt. *Charakterystyka mutacji w komórkach nowotworowych sarkoidu końskiego* spełnia wymogi określone Ustawą 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 póź. zmianami). Dlatego zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB w Krakowie o przyjęcie pracy mgr inż. Klaudii Pawliny bez zastrzeżeń i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik