

Dr hab. inż. Maria Siwek – Gapińska
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy
Bydgoszcz

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Eweliny Semik zatytułowanej: „**Analiza poziomu metylacji wysp CpG regionów kodujących w DNA tkanki sarkoidów końskich**” zrealizowanej pod kierunkiem dr hab. Tomasza Ząbka

wykonana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego.

Guzy sarkoidowe są najczęściej występującymi nowotworami skóry u zwierząt z rodziny koniowatych. Obecnie stosowane metody diagnostyczne oparte są głównie o analizy histologiczne. W przypadku potwierdzenia obecności guza jest on najczęściej usuwany chirurgicznie. Ingerencja chirurgiczna lekarza weterynarii może nie być w pełni skuteczna, a pozostawione komórki nowotworowe mogą zostać pobudzone do rozwoju złośliwego typu sarkoidu. Etiologia transformacji nowotworowej komórek i powstania sarkoidów jest znana. Jako główny onkogenny czynnik etiologiczny, poza wiekiem, ekspozycją komórek na toksyczne związki, uważane jest wirusy z rodziny *Papillomaviridae*, a zwłaszcza wirus brodawczaka bydła typu 1. Jak do tej pory nie wykazano jednoznacznej genetycznej predyspozycji do występowania sarkoidów u koni. Stąd też, tak ważna jest właściwa diagnostyka tego schorzenia na bardzo wczesnym etapie rozwoju, preferencyjnie w oparciu o inne tkanki niż te pochodzące z biopsji guza. Możliwości takiej diagnostyki stwarzają nowoczesne, szybkie i dokładne techniki molekularne, które umożliwiają pozyskanie informacji z niewielkiej ilości materiału biologicznego. Aby możliwe było opracowanie skutecznej metody diagnostyki molekularnej konieczne jest poznanie i zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za nowotworzenie tkanki. Mechanizmem ściśle związanym z regulacją ekspresji genów jest metylacja DNA. W tkankach nowotworowych metylacja DNA ulega zakłóceniu co przekłada się na zmianę aktywności transkrypcyjnej genów.

Rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Semik wykonana w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym pod kierunkiem dr hab. Tomasza Ząbka podejmuje problematykę zmian metylacji DNA w tkance sarkoidowej koni. Oceniana dysertacja doktorska dotyczy istotnych i bardzo aktualnych problemów naukowych a jej wydzwięk jest zarówno poznawczy jak i praktyczny.

1. Uwagi ogólne i charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska ma charakter eksperymentalny, napisana została w sposób zrozumiały, precyzyjny i poprawny od strony językowej. Cała treść dysertacji zawarta jest na 164 stronach. Praca podzielona jest na 7 podstawowych rozdziałów: „Przegląd literatury”, „Cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Literatura” i dwa rozdziały uzupełniające: „Suplement 1”, „Suplement 2”. Pracę uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim jak również wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w dysertacji.

2. Analiza poszczególnych części pracy

Rozdział „Przegląd literatury” w sposób bardzo szczegółowy prezentuje problem dotyczący guzów skóry występujących u koniowatych, które od 1936 r. nazywane są sarkoidami. W kolejnych podrozdziałach Autorka precyzyjnie opisuje kliniczne typy sarkoidów koni, jak również wskazuje na etiologię sarkoidów końskich. Wśród czynników onkogennych, poza wiekiem i ekspozycją komórek na związki toksyczne wskazane są patogeny a zwłaszcza wirusy z rodziny *Papillomaviridae*. Kolejne podrozdziały dysertacji doktorskiej poświęcone są charakterystyce wirusów brodawczaka bydła (BPV) wśród których BPV1 i BPV2 uznane zostały jako czynnik etiologiczny sarkoidów u koniowatych. Ostatni podrozdział „Przeglądu literatury” dotyczy procesu metylacji DNA, który odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów w tym również w procesie nowotworzenia. Autorka prezentuje w formie tabelarycznej listy genów, w których zaburzony proces metylacji w regionie promotorowym prowadzi do kancerogenezy. Ostatnie z omówionych w tym podrozdziale zagadnień to prezentacja technik molekularnych umożliwiających jakościowe i ilościowe oznaczenie metylocytozyny zarówno na poziomie pojedynczego genu jak i całego genomu. Rozdział „Przegląd literatury” wzbogacają dwie ryciny prezentujące: zaburzenia procesu metylacji DNA (Rycina 1) i klasyfikację metod analizy metylacji DNA (Rycina 2).

Cele pracy („Cel pracy”) zostały przedstawione w sposób logiczny i zrozumiały. Są one zgodne z tytułem dysertacji doktorskiej.

Rozdział „Materiał i metody” to 26 stron bardzo szczegółowego przedstawienia wszystkich metod i zastosowanych w nich protokołów poczynszty od:

- izolacji DNA i RNA,
- syntezy cDNA,
- konwersji bisulfitowej genomowego DNA,

- sekwencjonowania metodą dideoxy Sangera,
- sekwencjonowania frakcji metylomu metodą RRBA,

aż do:

- walidacji wyników sekwencjonowania bibliotek RRBA i weryfikacji uzyskanych wyników na większej grupie badawczej,
- klonowania w wektorze plazmidowym
- analizy transkryptomu z użyciem mikromacierzy GE 4x44K wraz z walidacją poziomu ekspresji wybranych genów metodą real – time qPCR.

Poza wymienionymi powyżej technikami laboratoryjnymi, Autorka wykorzystuje również szereg programów bioinformatycznych do obróbki i analizy sekwencji, czy też identyfikacji genów wskazujących różnice w poziomie ekspresji.

Treść rozdziału „Materiał i metody” dopełnia 29 tabel (Tabela 3 – Tabela 32) prezentujących szczegóły protokołów (m. in.: warunki termiczne reakcji, skład mieszaniny reakcyjnej, sekwencje starterów) i dwa zdjęcia żeli agarozowego (Rysunek 3) i poliakrylamidowego (Rysunek 4).

Rezultaty przeprowadzonych analiz (Rozdział „Wyniki”) zaprezentowane są w postaci tabelarycznej (Tabela 33 – Tabela 44) i uzupełnione 14 rycinami (Rysunek 5 – Rysunek 19). Bardziej szczegółowe wyniki Autorka umieściła w materiałach uzupełniających (Suplement 1 i 2).

Rozdział „Dyskusja” podzielony został na 11 podrozdziałów w których Autorka w sposób wysoce merytoryczny, konkretny i bardzo logiczny ustosunkowuje się do wyników swoich badań w kontekście literatury. Dyskusja prowadzona jest w sposób bardzo dojrzały a cytowana w pracy literatura obejmuje imponującą liczbę 351 pozycji z czego znakomita większość to pozycje z obiegu międzynarodowego.

Wnioski są sformułowane bardzo precyzyjnie, przedstawione bardzo prawidłowo i wynikają bezpośrednio z rezultatów uzyskanych w trakcie realizacji doświadczeń. Mam drobną sugestię dotyczącą wniosku nr 1 (punkt recenzji: uwagi krytyczne).

3. Uwagi krytyczne

Do zadań recenzenta należy również wskazanie ewentualnych merytorycznych i formalnych nieścisłości zauważonych w ocenianej dysertacji. Nieścisłości te omówione są poniżej w kolejności chronologicznej:

- W streszczeniu Autorka w odniesieniu do porównania profilu metylacji pomiędzy tkanką zdrową i chorą posługując się określeniem „większej grupy badawczej”. Określenie to jest bardzo mało precyzyjnie, nie wskazuje ile

tkanek zdrowych i chorych było poddanych analizie, ani od jakich zwierząt te tkanki zostały pobrane.

- W pracy brakuje jasno sformułowanej hipotezy badawczej, czy też głównego celu prowadzonych badań. Zdanie z rozdziału „Dyskusja” (strona 87): *„Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej, których celem była identyfikacja miejsc podlegających zmianom poziomu metylacji w komórkach nowotworowych oraz nieprawidłowości w poziomie ekspresji genów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w sarkoidach końskich”* proponuję wyodrębnić jako cel główny który poprzedzi cele cząstkowe sformułowane na stronie 33.
- Opis materiału badawczego (strona 34) wykorzystanego w pracy wymaga uściślenia. Do badań poziomu metylacji DNA materiał biologiczny (tkanka zdrowa i próby guza sarkoidowego) pobrane zostały od 8 koni. Do oceny poziomu ekspresji pobrano materiał od czterech koni. Czy w obu przypadkach były to te same osobniki? Jaka tkanka traktowana była jako kontrola (tkanka zdrowa)? W rozdziale 3.2.10 Autorka podaje iż weryfikacja wyników sekwencjonowania bibliotek RRBS przeprowadzona została na *„większej grupie badawczej”*, która to grupa nie została zdefiniowana w rozdziale 3.1. „Materiał badawczy”.
- W rozdziale „Dyskusja” (strona 86) Autorka pracy umieściła następujące stwierdzenie: *„Ważnym staje się więc, opracowanie nowych minimalnie inwazyjnych metod diagnostycznych, które umożliwią szybką i dokładną diagnostykę sarkoidów, a równocześnie cechować się będą wysoką specyficznością i czułością w materiale pobranym z łatwo dostępnych tkanek takich jak: krew, mocz bądź ślina”*. O ile zgadzam się z Autorką, iż krew jest tkanką o tyle ślina i mocz są to płyny ustrojowe.
- Wniosek 1 (strona 33) wymaga uściślenia. Jego obecne brzmienie sugeruje iż brak różnic w poziomie metylacji sekwencji CpG pomiędzy guzem sarkoidowym a tkanką zdrową w panelu 9 analizowanych genów związane jest jedynie z zastosowaną techniką BS – PCR. Autorka nie wskazuje w tym wniosku iż panel 9 genów powiązany jest z nowotworami skóry u ludzi. Akcent we wniosku powinien być raczej położony na to iż, panel 9 genów odrywających istotną rolę w procesie karcenogenezy tkanki skórnej u człowieka nie jest powiązany z powstawaniem sarkoidów u koni, co oznacza, że zmiany w innych genach odpowiedzialne są z czerniakiem i rakiem kolczystokomórkowym u ludzi, a sarkoidami u koni. Tę tezę potwierdzają również wyniki całogenomowej analizy transkryptomu tkanki guza sarkoidowego i tkanki zdrowej.

W pracy dostrzeżono też drobne błędy redakcyjne:

- Spis treści i Strona 9 – angielskie określenie streszczenia to: „Abstract” , Autorka omyłkowo napisała ‘Abstrakt’.
- Rysunek 17 (strona 81), brakuje legendy wyjaśniającej co oznaczają numery pod kolejnymi próbami na osi OX.
- Tabela 8 (strona 39) – brakuje w niej jednego genu (*TRPM1*)
- Tabela 9 (strona 40) – użyte sformułowanie „mix reakcyjny” jest określeniem potocznym, poprawne określenie to „mieszanina reakcyjna”
- We wszystkich tabelach w których wymieniony jest chlorek magnezu, chemiczny zapis tego związku powinien mieć format „MgCl₂”. W obecnym zapisie brakuje indeksu dolnego dla cyfry „2”.
- Strona 54 – błąd w pisowni słowa „przeprowadzono” (aktualny zapis: „przeprowadzono”)
- Strona 93 – błąd w pisowni. W zdaniu: „Rozbieżności te wymagają dodatkowych badań, choć jedną z ich przyczyn może być mała grupa badawcza wykorzystana w niemniejszej pracy,” zamiast „niemniejszej” powinno być „niniejszej”.
- Strona 101 – błąd w pisowni. W zdaniu: „Podobną dencję zaobserwowaniu w przypadku raka nerki...” zamiast „dencję” powinno być „tencję”.
- Strona 101 – błąd w pisowni. W zadaniu: „Były to zarówno czynniki transkrypsyjne...” zamiast „transkrypsyjne” powinno być „transkrypcyjne”.
- Listę stosowanej w doświadczeniach aparatury (rozdział 3.2.1 strona 34) proponuję przenieść do suplementu.
- W spisie literatury publikacje tego samego autora powinny być umieszczone w kolejności chronologicznej (nie we wszystkich przypadkach zasada ta jest przestrzegana).
- Dwie pozycje ze spisu literatury (335, 342) nie są cytowane w tekście.

Wymienione uwagi mają charakter redakcyjny. Zastosowane metody badawcze, dobór materiału do badań, analiza i późniejsza interpretacja uzyskanych wyników wskazuje iż mgr inż. Ewelina Semik wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem merytorycznym i opanowaniem warsztatu badawczego.

M. S.

4. Wartość merytoryczna pracy

Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska ma charakter eksperymentalny. Autorka wykorzystuje wiele nowoczesnych technik molekularnych w tym całogenomowe analizy wysokoprzepustowe dotyczące szczegółowej analizy transkryptomu i metylomu. W dostępnej literaturze nie ma informacji o tak szeroko prowadzonych badaniach dotyczących guzów sarkoidowych u koni wykorzystujących całogenomowe techniki molekularne. Duża swoboda w opisie wymagających technik molekularnych (mikromacierze ekspresyjne, klonowanie molekularne, sekwencjonowanie następnej generacji) świadczy o bardzo dobrym warsztacie laboratoryjnym Autorki. Mgr inż. Ewelina Semik z dużym obeznaniem posługuje się zarówno protokołami laboratoryjnymi jak i równie wymagającymi protokołami bioinformatycznymi.

Dysertacja doktorska mgr inż. Eweliny Semik ma dużą wartość nowatorską a na szczególne podkreślenie zasługuje:

- Zaproponowanie nowych genów markerowych, które po weryfikacji w badaniach na większej liczbie osobników będą mogły być wykorzystane we wczesnej diagnostyce zmian sarkoidowych u koni
- Zastosowanie wysoko przepustowych analiz transkryptomu, które pozwoliło na wskazanie szeregu genów mających wpływ na zmiany metaboliczne jakie są związane z chorobą sarkoidową
- Wykazanie iż geny: *APC*, *CCND2*, *CDNK2B*, *DCC*, *RARB*, *RASSF1*, *RASSF5*, *THBS1*, *TRPM1*, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju nowotworów skóry u człowieka nie są powiązane z rozwojem sarkoidów u koni.

Uzyskane w pracy wyniki dostarczają nowej, bardzo wartościowej wiedzy na temat mechanizmu metylacji DNA w procesach kancerogenezy. Przedstawione rezultaty doświadczeń stanowią przyczynek do zmian w metodyce diagnozowania nowotworowej choroby sarkoidowej u koni, co ma znaczenie z poznawczego ale również praktycznego punktu widzenia.

Po lekturze dysertacji doktorskiej mgr. E. Semik nasuwa się spostrzeżenie iż interesujące i wartościowe byłoby zweryfikowanie obu metod diagnostycznych: klasycznej w oparciu o analizę histologiczną i techniki molekularne.

M. S. 6

5. Wnioski końcowe

Dysertacja doktorska mgr inż. Eweliny Semik zatytułowana: „**Analiza poziomu metylacji wysp CpG regionów kodujących w DNA tkanki sarkoidów końskich**” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia 18 marca 2011 r. (Dz.U. 84 poz. 455).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytut Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Semik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz 4.03.2016



Dr hab. Maria Siwek – Gapińska