

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii Pawliny pt. „Charakterystyka mutacji w komórkach nowotworowych sarkoidu końskiego”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Klaudii Pawliny została wykonana w Dziale Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki–PIB w Balicach pod kierunkiem pani prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej, promotorem pomocniczym był dr inż. Artur Gurgul. Przeprowadzone przez Autorkę rozprawy doświadczenie jest kontynuacją zainicjowanych przez promotora badań niestabilności genomu konia oraz ich roli w procesach nowotworzenia i dotyczą etiopatogenezy nowotworów skóry (sarkoidów) u koni. Problematyka ta ma istotne znaczenie dla efektywności hodowli koni jak również dla wykorzystania koni jako zwierząt modelowych w badaniach etiologii, możliwości wczesnego diagnozowania i leczenia chorób nowotworowych człowieka. Sarkoidy są najczęstszym nowotworem u koni, w ich patogenezie zasadniczą rolę pełni wirus brodawczaka bydłowego (BPV) ale czynniki genetyczne są również bardzo ważną determinantą ich rozwoju. Jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych jest niestabilność genomu, dlatego uwaga badaczy skupia się na poszukiwaniu przyczyn tej niestabilności i wykryciu biomarkerów do wczesnego diagnozowania nowotworu. W ostatnich latach nastąpiło znaczne przyspieszenie tych badań w związku z wykryciem nowych cząsteczek RNA – mikroRNA i nowego rodzaju polimorfizmu długości DNA zwanego zmiennością liczby kopii (CNV). Wiadomo już, że cząsteczki mikroRNA biorą udział w regulacji ekspresji blisko 1/3 genów człowieka, stwierdzono ich rolę w regulacji procesów proliferacji, różnicowania komórek i apoptozy. Nieprawidłowe działanie mikroRNA może prowadzić do niekontrolowanego podziału komórek, którym charakteryzują się komórki nowotworowe. Wyniki badań CNV również wskazują na ich związek z występowaniem u ludzi chorób nowotworowych. CNV są nie tylko ważnym elementem zmienności genetycznej, obejmującym znacznie większy obszar genomu niż polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), ale mogą pełnić istotną rolę w patogenezie chorób. Podjęcie takich badań u konia zasługuje na uznanie. Wyniki tych badań nie tylko wzbogacają wiedzę o zmienności genomu konia ale wnoszą cenne informacje o nowo zidentyfikowanych cząsteczkach mikroRNA oraz ich roli jak również roli CNV w procesach transformacji neoplastycznej. Mogą być one także pomocne w zrozumieniu mechanizmów patogenezy oraz w precyzyjnym rozpoznaniu indywidualnej podatności na choroby nowotworowe.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Pawliny ma układ charakterystyczny dla dysertacji naukowych z zakresu nauk rolniczych, jest napisana jasno i przejrzysto. Cała praca liczy 164 strony, w tym 16 stron to materiały uzupełniające, zasadnicza część rozprawy zawiera 35 tabel i 14 rysunków. Materiały uzupełniające składają się z 13 rysunków przedstawiających aberracje zidentyfikowane w 13 próbkach z guzów sarkoidu oraz ich opis. Obszernym uzupełnieniem tych materiałów jest dołączony na CD zbiór plików elektronicznych zawierających graficzną ilustrację wyników z uwzględnieniem rezultatów dla 31 chromosomów w próbkach z sarkoidu i w próbkach tkanki zdrowej oraz dwa schematy obrazujące asocjacje mikroRNA z różnymi rodzajami nowotworów.

Uwagi szczegółowe

Przegląd literatury

Pani mgr inż. Klaudia Pawlina bardzo starannie zgromadziła literaturę naukową dotyczącą problematyki badawczej rozprawy, łącznie 307 prac, głównie z ostatnich lat. Mimo tak pokaźnej liczby prac doświadczenie doktorskie nie stanowi powtórzenia dotychczasowych badań, jest dziełem oryginalnym ze względu na nowatorstwo technik badawczych i kompleksowe podejście do zagadnienia. W rozdziale Przegląd literatury Autorka przedstawiła modele inicjacji i rozwoju procesów nowotworzenia, zaproponowane przez różnych badaczy. Modele te łączy wspólna właściwość – zmiany na poziomie informacji genetycznej komórek (zachodzące w długim okresie czasu pojedyncze mutacje lub rearanżacje chromosomowe). W dalszej części rozdziału Autorka omawia czynniki patogenne, biologiczne i genetyczne, warunkujące powstanie i rozwój nowotworu skóry u koni oraz przedstawia charakterystykę różnych rodzajów sarkoidów.

Dobrym wprowadzeniem do przedstawionych w pracy badań jest szczegółowa charakterystyka CNV i mikroRNA, wskazująca na możliwość ich wykorzystania jako biomarkerów we wczesnym stadium rozwoju sarkoidu. Zawarte w tym rozdziale wnikliwe i wszechstronne omówienie dotychczasowych dokonań z zakresu problematyki pracy wskazuje kierunki dalszych poszukiwań, doskonale podkreślając zasadność badań podjętych przez panią mgr inż. Klaudię Pawlinę. W rozdziale tym zabrakło jednak opisu niestabilności allelicznej (utrata heterozygotyczności – LOH) w komórkach nowotworowych, której identyfikacja i charakterystyka w tkance sarkoidu była jednym z celów badawczych. Krótka wzmianka o tym jest na str. 23 w podrozdz. 3.3. Zmienność liczby kopii DNA (CNV) jako potencjalny czynnik etiologiczny sarkoidu.

Rozdział jest napisany w sposób interesujący, Autorka wykazała dobrą znajomość problematyki badawczej rozprawy ale nie uniknęła drobnych uchybień. Uwagi recenzenta

dotyczące braku powołania w tekście na prace źródłowe lub braku w spisie literatury cytowanej pracy są zamieszczone oddzielnie do wglądu dla Autorki rozprawy.

Cel pracy

Cele badawcze zostały przez panią mgr Pawlinę sprecyzowane jasno i logicznie. Obejmują one analizę porównawczą aberracji chromosomowych oraz profilu ekspresji mikroRNA w tkance sarkoidu i tkance zdrowej tych samych koni, identyfikację cząsteczek mikroRNA ulegających zróżnicowanej ekspresji w obu rodzajach tkanek a także określenie szlaków biologicznych, w których regulację są one zaangażowane. Ponadto Autorka podjęła się identyfikacji genów znajdujących się w obrębie aberracji w tkance sarkoidu i prześledzenia szlaków metabolicznych, w których te geny biorą udział.

W mojej ocenie w tej części rozprawy zabrakło hipotezy badawczej, jakkolwiek wynika ona z treści pracy jednak nie została sformułowana.

Materiał i metody

Materiał biologiczny stanowiły wycinki sarkoidu i tkanki zdrowej (jako kontrola) pochodzące od 2 koni ze Szpitala Koni na Służewcu i 16 koni z Uniwersytetu w Bernie. Szczególnie należy podkreślić zastosowanie najnowocześniejszych metod analitycznych cytogenetyki i genetyki molekularnej oraz jakość materiału biologicznego - próbki tkanki nowotworowej i zdrowej pochodzące od tych samych osobników. Całe doświadczenie zostało zaplanowane kompleksowo, Autorka konsekwentnie dążyła do uzyskania odpowiedzi na główne pytanie – jakie są różnice na poziomie genomu między komórką nowotworową i zdrową oraz jakie cząsteczki mikroRNA są szczególnie istotne dla procesu nowotworzenia.

W badaniach aberracji chromosomowych w obu rodzajach tkanek Autorka zastosowała technikę hybrydyzacji na mikromacierzach genotypowych, wykorzystując komercyjne mikromacierze SNP firmy Illumina. Natomiast do analizy wyników zastosowała trzy dostępne obecnie programy, co wynikało z dociekliwości badawczej Autorki i chęci uzyskania wiarygodnych wyników.

Kolejnym etapem badań była hybrydyzacja z wykorzystaniem mikromacierzy CGH i walidacja uzyskanych wyników z wykorzystaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzona dla dziesięciu losowo wybranych regionów, obejmujących amplifikacje i delecje zidentyfikowane metodą hybrydyzacji na mikromacierzach.

Pani mgr Pawlina podjęła także próbę identyfikacji cząsteczek mikroRNA i przeanalizowania profilu ekspresji mikroRNA. W tym celu wykorzystwała materiał biologiczny pochodzący od pięciu koni i zastosowała najnowocześniejszą metodę - sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Identyfikację cząsteczek mikroRNA o zróżnicowanej ekspresji w obu tkankach Autorka przeprowadziła za pomocą dwóch różnych algorytmów, a do dalszych analiz wybrała tylko cząsteczki mikroRNA o statystycznie istotnej zróżnicowanej ekspresji między tkankami,

wspólne dla obu algorytmów. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych analiz, również tym razem pani mgr Pawlina przeprowadziła walidację wyników sekwencjonowania, tym razem za pomocą metody RT-qPCR.

Ostatnim, ogromnie ważnym etapem badań, była identyfikacja genów docelowych dla miRNA i ścieżek biologicznych regulowanych przez te cząsteczki. Pani mgr Pawlina wykorzystała do tego aplikację DNA Intelligent Analysis DIANA-miRPath v2.0. Ponieważ badania mikroRNA konia dopiero zapoczątkowano, w celu przeprowadzenia analizy Autorka musiała skorzystać z bazy genów docelowych dla mikroRNA człowieka.

Zakres przeprowadzonych przez panią mgr Klaudię Pawlinę badań, mnogość analiz, zastosowanie najnowocześniejszych metod analitycznych i pakietów statystycznych świadczą o Jej doskonałym przygotowaniu merytorycznym i praktycznym. Autorka wykorzystała w swoich badaniach niezwykle bogaty warsztat naukowy macierzystej jednostki, wymagający nie tylko dużej wiedzy ale również doświadczenia laboratoryjnego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że każdy etap badań został przeprowadzony z zastosowaniem alternatywnych metod, co umożliwiło walidację uzyskanych wyników i zapewniło ich wiarygodność. Również statystyczna weryfikacja wyników była przeprowadzana z wykorzystaniem alternatywnych programów.

Rozdział Materiał i metody jest obszerny, został napisany niezwykle szczegółowo, z dokładnym przedstawieniem wszystkich zastosowanych procedur analitycznych i statystycznych. Uważam, że aż tak szczegółowe przedstawianie procedur jest zbędne bowiem każdorazowo producent dostarcza protokół wraz z zestawem odczynników. Celowe byłoby opisanie ewentualnych modyfikacji procedur wprowadzonych przez Autora rozprawy, jeśli takowe by były. Zamieszczony na początku schemat doświadczenia ułatwia zrozumienie przebiegu wszystkich badań, ale uważam, że mógłby być wzbogacony informacją o liczbie koni badanych w poszczególnych etapach.

Jako recenzent mam do tego rozdziału uwagę i pytanie. Uwaga - nie podano rasy i wieku koni, od których pobrano próbki tkanek do badań oraz czy znane było stadium choroby i rodzaj sarkoidu. Informacje te uważam za wskazane ze względu na stwierdzone różnice rasowe w podatności koni do nowotworów skóry i różne formy tych nowotworów różniące się stopniem agresywności. Pytanie dotyczy pięciu koni, od których materiał biologiczny wykorzystano do identyfikacji cząsteczek mikroRNA i analizy profilu mikroRNA – czy były to konie ze Szpitala Koni Służewiec (2) i Kliniki w Bernie (3), jak może wynikać z danych w tabeli 1 ?

Wyniki

Badania aberracji w tkance sarkoidowej i zdrowej z wykorzystaniem mikromacierzy SNP wykazały znacznie większą niestabilność genomu tkanki nowotworowej niż tkanki zdrowej. Średnia i maksymalna długość CNV (wyrażona w parach zasad), średnia długość delecji

i amplifikacji były znacznie większe w tkance nowotworowej. Z kolei analiza niestabilności allelicznej (cnLOH, czyli miejsc genomu, w których nastąpiła utrata heterozygotyczności) wykazała, że liczba cnLOH była zbliżona w obu rodzajach tkanek ale w tkance sarkoidowej były one zdecydowanie dłuższe. Badania zmienności liczby kopii (CNV) u konia są prowadzone od niedawna (pierwsze prace ukazały się w 2012 roku), dlatego uzyskane w ocenianej pracy wyniki mają duże znaczenie poznawcze, wskazują na większą niestabilność genomu tkanki nowotworowej oraz wzbogacają tworzoną genomową mapę CNV i cnLOH konia. Identyfikacja aberracji z wykorzystaniem mikromacierzy CGH dała wyniki w 97-99% zgodne z uzyskanymi z hybrydyzacji na mikromacierzach SNP.

Bardzo ciekawych wyników dostarczyła analiza genów występujących w obrębie zidentyfikowanych aberracji. Wykazała ona obecność blisko dwukrotnie większej (1593) liczby genów w tkance nowotworowej w porównaniu ze zdrową (818 genów), wśród nich prawie 40% stanowiły geny mikroRNA. Prześledzenie szlaków biologicznych, z którymi są związane geny mikroRNA, dało również ciekawe wyniki - najwięcej spośród nich jest związanych z transformacją nowotworową. Rezultat ten potwierdziła porównawcza analiza miRNA ulegających zróżnicowanej ekspresji między sarkoidem i tkanką zdrową. Za poważne osiągnięcie naukowe pani mgr Pawliny uważam również wykrycie potencjalnie nowych cząsteczek mikroRNA, w tym wielu (144) obecnych tylko w tkance nowotworowej. Autorka stwierdziła także obecność wariantów polimorficznych miRNA, różniących się końcami 3' lub 5' bądź substytucją zasad w obrębie cząsteczki, zwanych izomiRami. Poziom ekspresji izomiRów był wyższy w tkance nowotworowej niż w tkance zdrowej, choć odsetek miRNA ulegających wyższej ekspresji był niewiele większy (44% vs 41%). Interesującym wynikiem jest także identyfikacja obecności zmian liczby kopii (CNV) w *loci* genów kodujących niektóre miRNA, które mogą odpowiadać za nieprawidłową ekspresję tych genów.

Uzyskane przez panią mgr Pawlinę wyniki mają wybitnie poznawczy charakter, inspirują do dalszych szczegółowych badań, wskazując ich kierunek. O ogromnym znaczeniu dla medycyny, poznanych stosunkowo niedawno, cząsteczek mikroRNA świadczą opublikowane w ubiegłym roku wyniki badań prowadzonych w klinice Mayo na Florydzie, ukazujące ogromny potencjał tych cząsteczek w zwalczaniu nowotworów. Włączenie się przez panią mgr Klaudię Pawlinę do tych badań uważam za niezaprzeczalny walor ocenianej rozprawy.

Wyniki zostały opisane przejrzyście i szczegółowo, wzbogacone są materiałami uzupełniającymi, starannie przygotowane od strony formalnej i graficznej. Mam jednak uwagę dotyczącą informacji, a raczej jej braku w tym rozdziale, o zidentyfikowanych w niniejszej pracy genach zlokalizowanych w obrębie aberracji. Szczegółowy opis tych genów znajduje się dopiero w rozdziale Dyskusja. Zidentyfikowane przez Autorkę amplifikacje i cnLOH obejmowały różne geny, jak np. *NRAS*, *PAX5* i inne, związane z onkogenezą. Identyfikację danych genów

w obrębie aberracji uważam za znaczące osiągnięcie, w Dyskusji mogła się znaleźć jedynie charakterystyka ich udziału w różnych szlakach biologicznych. Uważam to za drobne niedociągnięcie, które podobnie jak inne zasygnalizowane przeze mnie wcześniej, nie obniża mojej wysokiej oceny recenzowanej rozprawy.

Dyskusja

Jest to bardzo interesująca część rozprawy, zawierająca obszerne omówienie uzyskanych w ocenianej pracy wyników w porównaniu ze stanem wiedzy z literatury, sugestie kierunku i zakresu dalszych badań. Pani mgr Pawlina wykazała dużą znajomość tematyki rozprawy oraz umiejętność łączenia i analizowania zjawisk i procesów z różnych dziedzin biologii, genetyki molekularnej a także z zakresu onkogenezy.

Wnioski

Rozprawa zakończona jest ośmioma wnioskami, które podsumowują uzyskane w trakcie doświadczenia doktorskiego wyniki. Uważam, że Autorka mogła dodać jeszcze wniosek dotyczący zidentyfikowanych genów zlokalizowanych w obrębie aberracji w komórkach nowotworowych i ich roli w patogenezie sarkoidu.

Podsumowanie

Problematyka badawcza ocenianej rozprawy jest wyjątkowo istotna zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia, przede wszystkim dla nowych terapii onkologicznych. Szczególnie należy podkreślić nowatorstwo badań przeprowadzonych przez panią mgr inż. Klaudię Pawlinę, wykorzystanie najnowszych, wysokospecjalistycznych i alternatywnych metod badawczych i bioinformatycznych, co umożliwiło uzyskanie ciekawych i wiarygodnych wyników. Za główne osiągnięcie naukowe pani mgr inż. Klaudii Pawliny uważam identyfikację aberracji w komórkach sarkoidu, wykrycie nowych mikroRNA, określenie profilu ich ekspresji w komórkach nowotworowych oraz identyfikację genów zlokalizowanych w regionach objętych aberracjami. Wszechstronność i kompleksowość przeprowadzonych przez panią mgr Pawlinę analiz świadczy o Jej dobrym przygotowaniu merytorycznym, świetnym opanowaniu technik analitycznych i oraz umiejętności prowadzenia przez Nią samodzielnej pracy naukowej.

Wniosek

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Klaudii Pawliny spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 z 2003 r., poz. 595 z późn. zm.). Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki – PIB w Balicach wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr inż. Klaudii Pawliny do

dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo przeprowadzonych badań i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój nauk stosowanych wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Justyna Kucharau