

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Semik p.t.: „Analiza poziomu metylacji wysp CpG regionów kodujących w DNA tkanki sarkoidów końskich”

W rodzinie Equidae sarkoidy, których czynnikiem etiologicznym są wirusy brodawczaka bydła, należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów skóry. Nowotwory tego typu są szeroko rozprzestrzenione w świecie u takich gatunków jak konie, osły czy zebry. Choć nie wywołują drastycznego cierpienia zwierząt, jednak sprzyjają powstawaniu uszkodzeń mechanicznych, co może powodować dyskomfort chorych zwierząt, upośledzać ich zdolności ruchowe i przyczyniać się do strat ekonomicznych w hodowli.

W ostatnich latach nastąpił znaczny wzrost zainteresowania ośrodków naukowych chorobami nowotworowymi zwierząt, głównie ssaków, a jedną z przyczyn należy upatrywać w możliwościach przeniesienia wyników badań do onkologii człowieka. Szczególne miejsce w tych badaniach zajmują obserwacje mechanizmów epigenetycznych warunkujących kolejne stadia rozwoju choroby nowotworowej. Badania nad mechanizmami epigenetycznymi, warunkującymi poziom ekspresji genów są lepiej poznane u ludzi, natomiast u zwierząt są znacznie mniej zaawansowane. Dlatego temat podjęty przez Panią mgr Ewelinę Semik – dotyczący jednego z najważniejszych mechanizmów epigenetycznych – metylacji określonych regionów DNA - należy uznać za bardzo nowatorski i ze wszech miar celowy.

Pani mgr Ewelina Semik postawiła sobie bardzo liczne i ambitne cele swoich badań, a mianowicie: ocenę różnic w poziomie metylacji DNA regionów promotorowych 9 wybranych genów, sekwencjonowanie i analizę metylomu tkanki zdrowej i uzyskanej z sarkoidu, identyfikację regionów wykazujących różnice w poziomie metylacji pomiędzy tkanką zdrową a sarkoidalną, analizę transkryptomu sarkoidów, powiązanie zmian w profilu metylacji z różnicami w poziomie ekspresji genu. To ostatnie zagadnienie może mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne dla terapii sarkoidów. Cel pracy bardzo obszerny, ale sformułowany jasno – daje całościowy obraz zaplanowanych badań.

Rozprawa zawiera wszystkie rozdziały charakterystyczne dla tego typu opracowań, między którymi zachowano właściwe proporcje. Bardzo bogaty „Przegląd Literatury” oparty na aktualnych publikacjach, głównie anglojęzycznych zawiera szczegółowe informacje charakteryzujące sarkoidy diagnozowane u koni, ich typy, etiologię choroby jak również zjawisko metylacji DNA z podkreśleniem jego roli w regulacji ekspresji genów. W dalszej części tego przeglądu Autorka opisała hiper i hipometylację DNA w transformacji nowotworowej. Wiele miejsca poświęciła również nowoczesnym technikom oznaczania i oceny poziomu metylacji DNA. Przegląd piśmiennictwa świadczy o doskonałej orientacji Doktorantki w obszarze badawczym, w którym mieści się przygotowana rozprawa doktorska. Ten bardzo dobrze opracowany wstęp może być podstawą interesującego artykułu przeglądowego, który będzie się cieszył zainteresowaniem naukowców, prowadzących badania nad nowotworami u zwierząt. Samej Autorce rozprawy zgromadzenie i dobre poznanie obszernego piśmiennictwa pozwoliło na wybranie genów, które poddano analizie metylacji.

W kolejnym rozdziale pracy „Materiały i metody”, który jest najdłuższym, liczącym 27 stron rozdziałem, metody badawcze zostały opisane bardzo szczegółowo, rozpoczynając od izolacji kwasów nukleinowych DNA i RNA a następnie syntezy cDNA. W badaniach zastosowano konwersję bisulfitową genomowego DNA i podano w tabelach szczegółowe warunki tej reakcji.

Do dalszych analiz wybrano dziewięć genów kandydujących: *APC*, *CCND2*, *CDNK2B*, *RARB*, *RASSF1*, *RASSF5*, *THBS1*, *TRPM1*, *DCC*. Geny te wyłoniono na podstawie opublikowanych wyników badań zmian w poziomie metylacji DNA w różnych typach nowotworów u ludzi. Również w tym przypadku podano szczegółowe parametry amplifikacji określonych regionów promotorowych. Również poprawnie i szczegółowo opisano metody sekwencjonowania wybranych produktów amplifikacji (metoda Sanger’a i RRBS – czyli sekwencjonowanie frakcji genomu o wysokiej zawartości par CG po konwersji bisulfitowej). Metody poddane były walidacji a uzyskane wyniki analizie bioinformatycznej.

Do analizy transkryptomu zastosowano bardzo nowoczesną technikę mikromacierzy ekspresyjnych a wyniki poddano odpowiedniej analizie bioinformatycznej. Narzędzia bioinformatyczne zastosowano także do analizy genów wykazujących zmiany w poziomie ekspresji pod kątem ich potencjalnej funkcji

biologicznej. Nie sposób wymienić tu wszystkie stosowane metody i ich etapy, należy jednak podkreślić, że w badaniach zastosowano nowoczesne techniki analizy genomu, z uwzględnieniem mechanizmów epigenetycznych a metody te były bardzo dobrze dobrane – stąd uzyskane wyniki można uznać za w pełni wiarygodne.

Do rozdziału „Materiały i Metody” mam tylko jedną uwagę – w części dotyczącej opisu materiału badawczego brak informacji z jakiego rodzaju sarkoidu pobrane były biopsje i w jakim stadium choroby. Informacje te bowiem mogą mieć znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników.

Kolejnym rozdziałem pracy są „Wyniki” bogato ilustrowane 12 tabelami i 15 rysunkami. Pozostałe tabele i rysunki zamieszczono w dwóch suplementach, dołączonych do pracy.

Pierwszym etapem badań mgr Eweliny Semik było określenie różnic w poziomie metylacji regionów promotorowych wybranych genów pomiędzy tkanką sarkoidu a tkanką zdrową. Pomimo wielu danych literaturowych opisujących nieprawidłową metylację regionów promotorowych ocenianych genów w nowotworach u ludzi – nie stwierdzono występowania tych różnic w sarkoidach końskich. Potwierdzają to wyniki analizy ekspresji tych samych genów przy użyciu mikromacierzy DNA - i w tym przypadku nie wykazano różnic w poziomie ekspresji pomiędzy tkanką sarkoidu i tkanką zdrową. Być może, jak twierdzi Doktorantka, geny te nie odgrywają istotnej roli w progresji sarkoidów u koni i nie mogą być wykorzystane jako markery diagnostyczne – jednak wniosek taki powinien być poparty szerszymi badaniami, uwzględniającymi różne stadia zaawansowania choroby nowotworowej.

Wynik uzyskany w odniesieniu do genów kandydujących skłonił mgr Ewelinę Semik do identyfikacji regionów genomu charakteryzujących się zróżnicowaniem w poziomie metylacji. W tym celu wykorzystwała technikę RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) i sekwencjonowanie następnej generacji. Metody te pozwalają na identyfikację metylacji loci markerowych, bez konieczności typowania genów kandydujących. W wyniku tych prac Doktorantka zidentyfikowała 136 regionów (DMR) wykazujących różnice w poziomie metylacji miejsc CpG pomiędzy tkankami. Ta niezbyt wysoka liczba regionów może być wynikiem małej liczebności próbek poddanych analizom. W tkance sarkoidu, w obrębie zidentyfikowanych DMR regiony hipometylowane stanowiły 67%. W dalszej części pracy przedstawiono charakterystykę

regionów o zróżnicowanej metylacji (DMR). Należały one do genów *APLF* i *WAPAL*, których produkty pełnią ważną rolę w procesach naprawy pęknięć nici DNA, *NUAK1* zaangażowany w procesach adhezji, proliferacji i starzenia się komórek, *VAV2*, którego produkt uczestniczy w promowaniu migracji komórek czy *BRD4* odgrywający kluczową rolę w przekazywaniu prawidłowego wzoru metylacji komórkom potomnym. Jednakowoż przeprowadzone analizy nie wykazały zaburzeń w ilości transkryptu tych genów w próbkach tkanki sarkoidalnej.

Bardzo interesujące obserwacje dotyczyły genu supresorowego *SFN*, regulatora cyklu komórkowego, proliferacji i apoptozy. Gen ten charakteryzował się obecnością hipometylowanego regionu w obrębie sekwencji 5' UTR i pierwszego eksonu. W nowotworach ludzkich w genie tym często ujawniano obniżoną ekspresję. Stąd metylacja locus *SFN* może być uznana za potencjalny marker diagnostyczny w przypadku sarkoidów końskich.

W celu wyeliminowania zmienności osobniczej w odniesieniu do poziomu metylacji wytypowano regiony leżące w pobliżu lub w obrębie loci *MMRN2*, *ENSECAG00000017778*, *PTOV1*, *SPARC*, *RALGPS1*, *C1orf106* oraz *EFEMP2*. Różnice w poziomie metylacji DNA pomiędzy tkanką zdrową i chorą stwierdzono w obrębie loci *SPARC*, *RALGPS1*, *C1orf106* oraz *EFEMP2*. W tkance sarkoidalnej stwierdzono obniżony istotnie poziom metylacji fragmentu DNA wchodzącego w skład sekwencji promotorowej genu *SPARC* oraz podwyższony poziom transkryptu tego genu. Może to świadczyć o wpływie metylacji na ekspresję *SPARC* w tkance sarkoidu.

Zastosowanie przez mgr Ewelinę Semik jednej z najnowocześniejszych technik – macierzy ekspresyjnych – pozwoliło na identyfikację 901 genów wykazujących istotne różnice w poziomie ekspresji w tkance sarkoidu w porównaniu z tkanką zdrową, wśród nich 628 genów o obniżonej ekspresji oraz 273 geny charakteryzujące się podwyższoną ekspresją. W tkankach sarkoidów u koni Doktorantka zaobserwowała nieprawidłowy profil ekspresji genów zaangażowanych w budowę cytoszkieletu. Wśród genów o obniżonej ekspresji znalazły się geny pełniące funkcję supresorową w transformacji nowotworowej. Szczególnie interesujący jest gen *S100A14*, który działa zarówno jako gen supresorowy, jak i onkogen – w zależności od rodzaju komórek i tkanek. Obniżona ekspresja tego genu może być odpowiedzialna za brak zdolności do przerzutowości sarkoidów. Z kolei w grupie genów charakteryzujących się nadekspresją w tkance

sarkoidów znalazły się loci związane z cyklem komórkowym, proliferacją a także funkcjonowaniem układu odpornościowego. Podwyższoną ilość transkryptu mgr Ewelina Semik zaobserwowała także dla genu *GOLM1* – jak wynika z cytowanego przez Doktorantkę piśmiennictwa ekspresja tego genu jest stymulowana w odpowiedzi na infekcję wirusową.

Pani mgr Ewelina Semik podjęła także próbę analizy funkcjonalnej zidentyfikowanych DEG. To bardzo cenna inicjatywa, ponieważ w piśmiennictwie nie ma zbyt wielu informacji dotyczących zmian w transkryptomie komórek sarkoidów.

Uzyskane przez mgr Semik wyniki zostały bardzo obszernie przedyskutowane na bazie zebranego przez Autorkę piśmiennictwa, w głównej mierze dotyczącego nowotworów diagnozowanych u człowieka. Dyskusja, podzielona na jedenaście podrozdziałów, napisana jest poprawnie, językiem zrozumiałym i uwzględnia wszystkie aspekty przedstawionej do oceny pracy.

Praca kończy się krótkim podsumowaniem i ośmioma dobrze sformułowanymi, logicznymi wnioskami wynikającymi z przeprowadzonych badań. W mojej opinii wniosek pierwszy wymaga uzupełnienia „...na obecnym etapie badań”. Natomiast wniosek 8 powinien brzmieć „Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na istnienie zmian profilu metylacji DNA oraz zmian ekspresji genów w tkance sarkoidów u koni. Ze względu na brak histopatologicznej diagnozy użytych prób biologicznych trudno tu mówić o progresji nowotworu.

Dołączony do pracy spis literatury jest imponujący – liczy 351 pozycji, w znakomitej większości anglojęzycznych i pochodzących z ostatnich 15 lat.

Uwagi redakcyjne:

Praca napisana jest poprawnie, dobrym polskim językiem. Kilka błędów literowych łatwo będzie poprawić, przygotowując pracę do druku.

- s.7 – zamiast zwrotu „u gatunków zwierząt koniowatych” proponuję „u gatunków z rodziny koniowatych”,
- w tabeli 6 brak wyjaśnienia skrótu Tm,
- s.86 – mocz i ślina nie są tkankami.

Rysunki i diagramy wykonane są na ogół starannie i dobrze ilustrują wyniki badań. Niektóre rysunki w tekście pracy (np. 7 i 18) są zbyt pomniejszone i przez to nieczytelne. Uwaga ta dotyczy również rysunków umieszczonych w aneksie.

Podsumowanie:

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Semik jest wynikiem dojrzałej koncepcji i wszechstronnego przygotowania do przeprowadzenia tak skomplikowanych badań. Doktorantka opanowała szereg nowoczesnych metod badawczych (w tym technikę mikromacierzy ekspresyjnych), jak również skomplikowane metody analizy bioinformatycznej. Te nowoczesne i dobrze dobrane metody pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników na światowym poziomie. Można się było obawiać, że tak ogromna liczba uzyskanych wyników utrudni ich interpretację – jednak i z tym problemem mgr Ewelina Semik poradziła sobie doskonale.

Praca niewątpliwie wnosi nowe, cenne wartości do badań nad nowotworami u zwierząt a szczególnie zjawiskami epigenetycznymi towarzyszącymi procesowi nowotworzenia.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Eweliny Semik spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 13 Ustawy 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 późniejszymi zmianami). Zwracam się więc do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Eweliny Semik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na podkreślane przeze mnie w przedstawionej ocenie wartości tej rozprawy, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Semik..



/-/ Prof. dr hab. Ewa Słota