



INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Poznań, 17.06.2021 r.

ul. Strzeszyńska
32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00

e-mail:

igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Pławski

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Sikorskiej pt.: „Analiza molekularna genów TP53, CSF1R i WISP1 świń będących modelem rodzinnej polipowatości jelita grubego człowieka.” w związku z postępowaniem o nadanie Jej stopnia doktora w dziedzinie nauki biologiczne, dyscyplinie biologia

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Sikorskiej pt. „Analiza molekularna genów TP53, CSF1R i WISP1 świń będących modelem rodzinnej polipowatości jelita grubego człowieka.” została wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Świtońskiego. W postępowaniu tym powołano również ko-promotora pana dr. hab. Krzysztofa Flisikowskiego. Rozprawa liczy 55 stron w druku jednostronnym, gdzie w poszczególnych rozdziałach zamieszczono: streszczenie, streszczenie w języku angielskim, wstęp, hipotezę i cel pracy, materiał badawczy, metody badawcze, wyniki, dyskusję, piśmiennictwo oświadczenia współautorów prac oraz załączono pełne teksty dwóch publikacji będące podstawą rozprawy doktorskiej

1. Sikorska A, Flisikowska T, Stachowiak M, Kind A, Schnieke A, Flisikowski K, Switonski M. Elevated expression of p53 in early colon polyps in a pig model of human familial adenomatous polyposis. *J Appl Genet.* 2018 Nov;59(4):485-491. doi: 10.1007/s13353-018-0461-6. Epub 2018 Aug 25.

2. Sikorska A, Stachowiak M, Flisikowska T, Stachecka J, Flisikowski K, Switonski M. Polymorphisms of CSF1R and WISP1 genes are associated

with severity of familial adenomatous polyposis in APC1311 pigs. Gene. 2020 Oct 30;759:144988. doi: 10.1016/j.gene.2020.144988. Epub 2020 Jul 25.

Taki układ rozprawy doktorskiej, na podstawie opublikowanych wcześniej prac oceniam jako bardzo dobry. Jakość badań potwierdza prestiż czasopism, w których zamieszczono ich wyniki. W przedstawionych do rozprawy publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, a promotor jest ostatnim autorem korespondencyjnym. Taki układ współautorstwa wskazuje na kluczowe role tych dwóch osób w prezentowanych pracach. Kopromotor jest również współautorem tych prac.

Ocena merytoryczna

Nowotwór jelita jest jedną z najczęściej występujących chorób nowotworowych u ludzi i przez to ciągle budzi zainteresowanie badaczy. Występowanie nowotworów jelita na tle silnej dziedzicznej predyspozycji wstępuje w kilku procentach przypadków, a jedną z tych predyspozycji jest FAP. FAP jest predyspozycją do występowania mnogich polipów w jelicie grubym opisaną już dość dawno, bo prawie 300 lat temu. Pierwsze obserwacje nie były liczne ale dość szybko zorientowano się, że choroba ta występuje rodzinnie. Do określenia czynników genetycznych jej występowania należało w pierwszej kolejności odkryć geny i DNA, co z czasem nastąpiło. Wieloletnie obserwacje rodzin z polipowatością rodzinną pozwoliły na odnotowanie zmienności w przebiegu choroby od łagodnej formy do ciężkiego przebiegu z licznymi objawami pozajelitowymi. W części ma to związek z lokalizacją mutacji w genie APC. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji gdy białko utraciło zdolność do tworzenia dimerów w wyniku mutacji lub mutacja występuje na końcu genu gdzie ma mniejszy wpływ na aktywność białka APC. Jednak zmienność w zakresie występowania objawów jak i wieku ich wystąpienia obserwuje się nawet u członków jednej rodziny czyli nosicieli tej samej mutacji. Obserwacja ta pozwala wnioskować, że istnieją czynniki modyfikujące przebieg choroby. Poszukiwanie takich czynników jest w pełni uzasadnione, zwłaszcza o obliczu możliwości korzystania z modelowego organizmu, który daje dużo lepsze możliwości niż badania pacjentów. W związku z tym uważam podjęcie badań w ramach rozprawy doktorskiej za w pełni uzasadnione.

W pracy wykorzystano materiał od zwierząt dwóch grup o niskiej liczbie polipów i grupie i wysokiej liczbie polipów. Świnie te były jednak różnych ras. Cel pracy określono jako poszukiwanie polimorfizmów w genach TP53, CDF1 i WISP1 i ocena związku wybranych wariantów z poziomem transkryptów. W mojej ocenie

to jest to bardziej sposób wykonania badań. W pracy cały czas przewija wątek związku badanych genów ze „stopniem polipowatości” (autorce zapewne chodziło o liczebność polipów) po zapoznaniu się z pracą uważam, że celem pracy w większym stopniu było określenie genetycznych uwarunkowań zmienności przebiegu rodzinnej polipowatości jelit w organizmie modelowym poprzez identyfikację wariantów polimorficznych wybranych genów z analizą funkcjonalną i statyczną ich związku z obserwowanym obrazem choroby

Praca opiera się na dwóch niezależnych publikacjach oryginalnych powiązanych tematycznie. Pierwsza z nich, zatytułowana: “Elevated expression of p53 in early colon polyps in a pig model of human familial adenomatous polyposis” ukazała się w *Journal of Applied Genetics* w 2018 roku. Przebadano tu sekwencje całego genu TP53 wraz z promotorem w badanych grupach świń. Nie zaobserwowano różnic w częstościach występujących polimorfizmów w grupach o niskiej liczbie polipów w porównaniu z grupą o wysokiej liczbie polipów. Odnotowano natomiast statystycznie istotny, prawie dwukrotnie wyższy poziom transkryptu TP53 w materiale z polipów o wyższym stopniu rozwoju nowotworu.

W drugiej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Gene* w 2020 roku analizowano związek wariantów genów CFS1R i WISP1 z przebiegiem polipowatości. Przebadano częstości występowania wariantów tych genów w grupie świń z niską liczbą polipów, w grupie z licznymi polipami oraz w grupie kontrolnej. W genie CSFF1R zidentyfikowano 32 polimorfizmy z czego 8 dotychczas nie było opisanych. Zidentyfikowano dwa holotypy, które występowały ze statystycznie istotną, różną częstością w badanych grupach świń z FAP. Dodatkowo holotyp zawierający warianty polimorficzne wykazywał wyższą aktywność promotora.

Z kolei, w genie WISP1 zidentyfikowano 36 polimorfizmów, a w czterech z nich zaobserwowano różnice w częstościach ich występowania w badanych grupach. Ponadto zaobserwowano, że tworzą one holotypy o podobnych właściwościach, co było do przewidzenia. Z badań wywnioskowano o możliwym związku miejsc polimorficznych promotora genu CSF1R i w sekwencji kodującej promotora CSF1R z przebiegiem polipowatości u świń.

Układ pracy w postaci manuskryptu i załączonych publikacji oceniam jako bardzo dobry. Wstęp pozwala na poszerzone zapoznanie się z naukowym podłożem podjęcia tematu prac. Opis metodyki oraz wyniki przedstawiono prawidłowo. W mojej ocenie zastosowane metody były adekwatne dla osiągnięcia założonych w pracy celów. Doktorantka podsumowała wyniki badań we wspólnej

dyskusji dla obu prac, co oceniam jako wskazane, bo prace te tworzą całość. Wyciągnięte wnioski oceniam jako prawidłowe. Literatura obejmuje 115 pozycji dobranych optymalnie i aktualnych. W pracy dołączono oświadczenia współautorów o udziale w pracy i zgodzie użycia pracy w postępowaniu promocyjnym.

Manuskrypt został przygotowany bardzo profesjonalnie w twardej oprawie. Ryciny jak i tabele są dobrze opisane, w sposób czytelny i logiczny uzupełniają tekst rozprawy.

Uwagi krytyczne

1. Sentencja „...w stosunku do dominującej mutacji człowieka” jest nieprawidłowa. Zapewne chodzi o najczęstszą mutację. Użycie w tym kontekście określenia „dominująca” nie jest najtrafniejsze.
2. Pojęcie „zmiennosc polipowatosci” nie jest jasne. W polipowatosci obserwuje sie zroznicowanie z zakresie wystepowania objawow pozajelitowych i zroznicowanie pod wzgledem liczebnosci i wieku wystapienia polipow.
3. Zastosowana nomenklatura „wysoka polipowatosc” i „niska polipowatosc” jest calkowicie nietrafna i mylaca dla czytelnika. Dodatkowo polipy moga byc liczne lub nie a dysplazja moze miec kolejne stopnie. Dla mnie polipowatosc wysoka w wiekszym, stopniu kojarzy sie w wyzszych odcinkami przewodu pokarmowego niz liczebnoscia.
4. Sformulowanie celu nie jest adekwatne w stosunku do tresci publikacji i pracy. W hipotezie manuskryptu autorka opisuje linie z LP i HP a celem pracy jest poszukiwanie polimorfizmow wybranych genow oraz ocena związku wybranych wariantow DNA z poziomem transkrypcji. W obu publikacjach będucych podstawa rozprawy celem jest poszukiwanie podloza zmiennosci przebiegu choroby; publikacja nr 1 „Uzyskane w pracy wyniki pozwolily na sformulowanie wniosku o mozliwym wplywie miejsc (...) na obserwowane roznice w polipowatosci jelita grubego”. W drugiej pracy wniosek brzmi, cytuję ze wstepu: „We analysed groups of pigs carrying a truncating mutation in APC (APC1311/+; orthologous to human APC1309/+) to study the influence of TP53 polymorphisms and expression on the frequency of polyp formation and polyp progression in early-stage FAP.” Wnioskowanie w manuskrypcie rowniez dotyczy wplywu badanych wariantow na przebieg choroby a celem pracy jest ocena związku wariantow z poziomem transkrypcji.

Powyższe uwagi nie dyskredytują doniosłości i poziomu wykonanych badań jednak właściwa nomenklatura jak i precyzyjne określenia ułatwiają komunikację i pozwalają dotrzeć do szerszego grona odbiorców.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Sikorskiej pt. „Analiza molekularna genów TP53, CSF1R i WISP1 świń będących modelem rodzinnej polipowatości jelita grubego człowieka.” opiera się na dwóch publikacjach oryginalnych. Opublikowane wyniki przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów zróżnicowania przebiegu FAP u zwierząt modelowych. Podjęty temat badań jest bardzo interesujący. W pracach dokonano nie tylko oceny związku wariantów badanych genów z przebiegiem choroby, ale wykonano zaawansowane badania funkcjonalne, co podnosi jakość i wartość naukową prezentowanych prac. Przygotowany manuskrypt rozminął się niestety w celach z publikacjami będącymi jego podstawą. W pewnym stopniu obniża to ogólną bardzo wysoką moją ocenę przedstawionych w ramach rozprawy dwóch prac oryginalnych, co stwierdzam z żalem.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Sikorskiej pt.: „Analiza molekularna genów *TP53*, *CSF1R* i *WISP1* świń będących modelem rodzinnej polipowatości jelita grubego człowieka” spełnia wymagania określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym” i wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Sikorskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Poznań, 2021.06.17

Andrzej Pławski
Andrzej Pławski
Prof. dr hab. n. med. inż.
ANDRZEJ PŁAWSKI
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej
05420