

mpj 8.04.2019



KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA
Wydział Nauk o Środowisku
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Prof. dr hab. Paweł Brzuzan, prof. zw.

ul. Słoneczna 45G 10 – 709 Olsztyn; tel.: (prefix 89) 523 41 87; e-mail: brzuzan@uwm.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Małachowicz
pod tytułem
„Transkryptomika porównawcza wybranych gatunków zwierząt morskich”**

**Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Romana Wenne w Zakładzie Genetyki i
Biotechnologii Morskiej Instytutu Oceanologii PAN w Sopotcie.**

Recenzję wykonano w związku z uchwałą rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
Pismo Dziekana Wydziału prof. dr hab. Włodzimierza Meissnera z dnia 22 lutego 2019 roku

Uwagi ogólne – zasadność wyboru tematu rozprawy

W erze wysokoprzepustowych badań genomów do profilowania transkryptomicznego, czyli określania pełnego zestawu transkryptów obecnych w danej komórce lub tkance, używane są dwie techniki – sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) i mikromacierze ekspresyjne. W połączeniu z bioinformatyką i biostatystyką, metody te mogą dostarczać unikalnych informacji o globalnym profilu ekspresji genów, ich funkcji i regulacji, są też szczególnie użyteczne w badaniach ukierunkowanych na odkrywanie różnorodności biologicznej. Coraz częściej i z powodzeniem analizy wielkoskalowe na poziomie genomu i transkryptomu umożliwiają wnioskowanie o stanie zdrowia organizmu, znajdując liczne zastosowania w medycynie spersonalizowanej. Ze względu na ograniczenia występujące w technice mikromacierzy, przewagę stopniowo zyskuje sekwencjonowanie RNA. Wysoka przepustowość obecnych platform RNA-seq o dużej czułości dzięki stale rozwijającym się technologiom, umożliwia już nie tylko wszechstronną analizę genów i ich ekspresji, ale także detekcję izoform, badania splicingu, jest użyteczne w studiach nad organizmami niemodelowymi. Te zalety sprawiają, że profilowanie transkryptomiczne staje się głównym narzędziem biologii ewolucyjnej, ułatwiającym wgląd w procesy fizjologiczne i rozwój organizmu, strukturę i zmienność genetyczną populacji, by wyjaśnić przystosowania roślin i zwierząt do środowiska oraz przyczyny ich zróżnicowania.

Pomimo ogromnego postępu technologicznego w naukach omnicznych, w tym w transkryptomice, i ich zastosowań w medycynie czy w badaniach eksperymentalnych na modelowych gatunkach zwierząt i roślin, studia nad podłożem bioróżnorodności organizmów niemodelowych są nieliczne, nawet w przypadku gatunków które mają znaczenie gospodarcze. Równie odczuwalny jest brak informacji o podłożu zmian adaptacyjnych organizmów wodnych, w tym morskich gatunków ryb i małży; to jak poszczególne gatunki o różnych historiach życiowych, na przykład ryby podejmujące wędrówki, reagują na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, jak zachowują się komórki ich narządów (skrzeli, skóry, wątroby, mięśni, serca) poddane długotrwałemu, chronicznemu stresowi, i to które determinanty genetyczne i epigenetyczne określają „punkt bez powrotu”- początek rozwoju choroby, wciąż nie jest wiadome. Stąd konieczne są badania, które stopniowo wypełniałyby luki w naszej wiedzy o różnorodności genetycznej ważnych i mniej ważnych taksonów. Uzyskane informacje nie tylko umożliwiłyby lepsze poznanie biologii i fizjologii badanych zwierząt, ale pozwalałyby lepiej zrozumieć zagadnienia biologii systemowej. Co więcej, służyłyby także opracowaniu lepszych metod przewidywania zagrożenia i oceny skutków zmian ich środowiska bytowania, spowodowanych na przykład zanieczyszczeniami termicznymi albo chemicznymi.

Z formalnego punktu widzenia stwierdzam, że cykl publikacji zgłoszony przez Kandydatkę jako rozprawa doktorska spełnia Wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Ocena merytoryczna rozprawy

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Małachowicz ukazały się w dobrych czasopiśmie naukowych; a co się z tym wiąże zostały już poddane gruntownej ocenie merytorycznej i formalnej. W związku z powyższym moja rola recenzenta może ograniczyć się przede wszystkim do ocenienia spójności tematycznej rzeczonych publikacji i zasadności potraktowania ich jako monotematycznego cyklu publikacji składających się na rozprawę doktorską (w myśl wymagań Obowiązującej Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki)

Zasadniczym celem rozprawy było opisanie różnorodności genetycznej wybranych gatunków morskich organizmów, dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) z Morza Bałtyckiego, troci wędrowej (*Salmo trutta m. trutta*), oraz małży z rodzaju *Mytilus* (4 gatunki). Aby zrealizować ten cel, w każdym z badań Autorka przygotowała próbki RNA do sekwencjonowania (pirosekwencjonowanie 454; Roche GS-FLX; usługę wykonywał dostawca zewnętrzny), wykonała analizę złożonych *de novo* genomów wybranych tkanek z użyciem dobrze dobranych, różnorodnych narzędzi bioinformatycznych (BLAST, BLAST2GO i KAAS), przeprowadziła analizy filogenetyczne (MEGA). Badania opublikowane w cyklu artykułów naukowych zostały metodycznie przemyślane i ciekawie zaprojektowane. Opracowanie uzyskanych wyników niewątpliwie było bardzo pracowite, szczególnie część analityczna dotycząca adnotacji kontigów i genów, klasyfikacji funkcjonalnej czy transkryptomiki porównawczej. We wszystkich trzech pracach stosowane narzędzia i analizy bioinformatyczne opisane są szczegółowo, z dbałością o czytelność i dostarczają ważnych i ciekawych informacji o badanych transkryptomach. Wszystkie sekwencje zostały zdeponowane w specjalistycznych bazach danych i są dostępne dla badaczy zainteresowanych tematyką.

Wysoko oceniam trafność tematyki badań i koncepcyjne atrybuty pracy. Autorka scharakteryzowała transkryptomy trzech różnych tkanek: skrzeli (dorsz; praca 1) i skóry (troć; praca 2) ryb, oraz płaszcza małża (praca 3), które mają istotne znaczenie w kontakcie i odpowiedzi organizmów morskich na zmieniające się warunki środowiska. W istocie, wszystkie trzy prace w całości wpisują się w cel zasadniczy przedmiotowej rozprawy. W pełni uzasadnia to potraktowanie przedłożonych publikacji składających się na rozprawę doktorską jako spójnego tematycznie dzieła naukowego.

Badania przeprowadzone przez Kandydatkę zaowocowały oryginalnymi, bardzo ciekawymi wynikami i to zarówno w kontekście poznawczym, jak i aplikacyjnym. Za szczególnie wartościowe uważam:

- i. Scharakteryzowanie, po raz pierwszy w skrzelach dorsza bałtyckiego, profilu ekspresji genów i wykazanie jego odrębności od dorsza atlantyckiego dla 170 genów; w przyszłości, te kodujące białka geny mogą stanowić punkt wyjścia w badaniach ukierunkowanych na poznanie mechanizmów adaptacji do zmieniających się warunków termicznych lub zasolenia w miejscach bytowania tych ryb.
- ii. Scharakteryzowanie, po raz pierwszy w skórze troci wędrowej, profilu ekspresji mRNA z zauważalną reprezentacją genów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej i w reakcji na stres.
- iii. Zidentyfikowanie, opis struktury molekularnej i powiązań ewolucyjnych, po raz pierwszy u troci wędrowej, 8 rodzajów mucyn – glikoprotein, stanowiących główny składnik śluzu ryb,

lokalizacjach, nad funkcjonowaniem barier środowisko-ryba, z zastosowaniem metody RNA-seq, innych analiz molekularnych (peptydomika, metabolomika) a także metod obrazowania. Pozwoli to nam lepiej poznać szlaki komórkowe, które ulegają zaburzeniom pod wpływem czynników stresujących, w tym patogenów, i zrozumieć konsekwencje ich perturbacji dla dobrostanu ryb.

Moją uwagę zwrócił też drobny szczegół. O ile w rozdziałach Materiał i Metody każdej publikacji składających się na recenzowaną rozprawę, stosowane narzędzia i analizy bioinformatyczne i filogenetyczne przedstawione są szczegółowo, o tyle niewątpliwie słabą stroną opisu jest brak istotnych informacji dotyczących obiektów badań - ryb (praca 1 i 2), od których pochodziły próby wzięte do analiz oraz samych prób. Nie znalazłem tutaj (ani w suplementach) podstawowych danych (długość całkowita, masa, wiek, płeć) dotyczących wszystkich odłowionych ryb, miejsca i sposobu odłowu, rzeka (Pomorza, czy Wisła) z której pochodziły (troć), ani daty odłowu. Dobrą praktyką jest by Autorzy podawali także z którego łuku skrzelowego („skrzela”; zapewne chodzi o blaszki skrzelowe) albo ciała ryby (próbka skóry) materiał do badań jest preparowany. Brak tak wielu danych może istotnie ograniczać w przyszłości sensowne analizy porównawcze.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr. Magdaleny Małachowicz bezsprzecznie jest dziełem oryginalnym. Składający się nań cykl trzech publikacji jest spójny tematycznie. Uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny, nie tylko biologii ale innych nauk pokrewnych, na przykład rybactwa.

Analiza przesłanej dokumentacji jednoznacznie wskazuje, że Doktorantka we wszystkich trzech publikacjach, składających się na rozprawę doktorską, pełniła funkcję lidera zespołu sygnującego te prace. Dowodzi to, że posiada ona istotne dla pracownika nauki umiejętności planowania i realizacji ambitnych zamierzeń naukowych.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr. Magdaleny Małachowicz w pełni spełnia wymagania stawiane tego rodzaju opracowaniom w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej, pod warunkiem pomyślnego przebiegu jej obrony, stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Paweł Brzuzan, prof. zw.
1 kwietnia 2019 roku