Prof. dr hab. Roman Wenne
Instytut Oceanologii PAN
Ul. Powstańców Warszawy 55
Sopot

7.08.2022

Recenzja opracowana na prośbę Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej.

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr. Macieja Florczyka
pt. "MikroRNA i lncRNA jako biomarkery wpływu mikrocystyny-LR na wątrobę i mózg siei (*Coregonus lavaretus*)"

Oceniana praca doktorska została przygotowana pod opieką promotora prof. dr hab. Pawła Brzuzana w Katedrze Biotechnologii w Ochronie Środowiska Wydziału Biotechnologii i Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Składa się ze strony tytułowej, podziękowań, spisu treści, spisu publikacji tworzących pracę, streszczenia w j. polskim i angielskim, opisu wyników pracy doktorskiej z wyróżnionym wstępem, opisem celów i hipotez badawczych, części zawierającej weryfikację hipotez badawczych w tym przedstawienie zadań badawczych i metod, podsumowania, wniosków, bibliografii oraz załączonych 3 prac wchodzących w skład cyklu publikacji. Do pracy doktorskiej zostały również załączone oświadczenia współautorów i mgr Macieja Florczyka dotyczące ich wkładu w poszczególnych publikacjach. Opis wyników pracy doktorskiej zawiera wprowadzenie do części głównej tworzonej przez zbiór 3 opublikowanych artykułów, których mgr Florczyk jest pierwszym autorem. Główną częścią opisu przygotowanego w j. polskim jest przedstawienie problemu badawczego i hipotez, które doktorant postanowił przetestować oraz prezentację własnych wyników na tle dotychczasowej wiedzy.

Cyjanobakterie mają duże znaczenie ekologiczne w środowisku wodnym. Część gatunków wydziela toksyczne związki chemiczne określane, jako cyjanotoksyny. Hepatotoksyny mikrocystyny LR (MC-LR) są peptydami utrzymującymi się w wodzie do kilku miesięcy. Badania szkodliwego oddziaływania MC-LR lub innych toksyn na wątrobę człowieka i zwierząt metodą biopsji jest uciążliwe, a stosowane dotychczas biomarkery enzymatyczne krwi jak np. aminotransferaza alaninowa (ALT) i aminotransferaza argininowa (AST) nie są wystarczająco diagnostyczne. Ich podwyższony poziom we krwi może być

również spowodowany uszkodzeniem mięśni lub serca. Rolę bardziej rozdzielczych biomarkerów, czyli bardziej specyficznych dla poszczególnych narządów wewnętrznych mogą pełnić niekodujące krótkołańcuchowe cząsteczki microRNA (miRNA), których obecność lub brak (tzn. ekspresja) może regulować ekspresję genów kontrolujących ważne procesy biologiczne. Mają one również potencjalne zastosowanie w nowych metodach leczenia raka różnych narządów (Alwani A. i Baj-Krzyworzeka M. 2021. Postępy Biochemii 67 (3): 259-267). Wiedza o miRNA ryb i możliwościach ich zastosowania, jako biomarkerów jest nadal tylko fragmentaryczna. Oceniana praca doktorska przyczynia się do jej cennego rozszerzenia.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej zatytułowana „miR-122-5p as a plasma biomarker of liver injury in fish exposed to microcystin-LR" ukazała się w 2016 roku w czasopiśmie Journal of Fish Diseases (39: 741-751) z IF = 2,138 i mającym 30 w skali do 50 punktów wg. listy MNiSW w roku publikacji. Przed powstaniem publikacji, badania miRNA, jako biomarkerów uszkodzeń wątroby powodowanych przez leki (DILI) lub toksyny były prowadzone na modelowych gatunkach ssaków, jakimi są mysz i szczur. W efekcie tych badań stwierdzono wpływ poziomu toksyczności na zwiększenie ekspresji niektórych miRNA w osoczu. Badania mające na celu charakterystykę miRNA u ryb (np. danio) były prowadzone w niektórych ośrodkach naukowych zagranicą. Jednak w kontekście reakcji miRNA na toksyny badania zapoczątkował zespół prof. Brzuzana w Zakładzie Biotechnologii Środowiskowej UWM. Celem badań przedstawionych w publikacji było zbadanie poziomów ekspresji wybranych miRNA w odpowiedzi na działanie mikrocystyny LR siei (*Coregonus lavaretus*). Ekspozycję ryb na toksynę przeprowadzono w warunkach hodowlanych. Eksperyment polegał na obserwacji skutków dootrzewnowej iniekcji toksyny. Ekspresję wybranych czterech miRNA zbadano z zastosowaniem RT-PCR. Stwierdzono zmiany rozmiarów lub wyglądu wątroby u wszystkich ryb eksponowanych na działanie mikrocystyny LR. Ryby wykazywały zwiększony poziom trzech miRNA (miR-122-5p, miR-148-3 i miR-92a-3p), z których tylko pierwszy został wytypowany, jako kandydacki biomarker umożliwiający wczesne wykrycie niekorzystnych skutków działania mikrocystyny LR na wątrobę siei.

Druga publikacja z 2019 r. jest zatytułowana "Microcystin-LR-Triggered Neuronal Toxicity in Whitefish Does Not Involve MiR124-3p" i została zamieszczona w czasopiśmie Neurotoxicity Research (35: 29–40), które miało IF = 0,889 i 70 punktów w skali do 200 punktów z listy czasopism MNiSW w roku publikacji. Celem badań było rozpoznanie mechanizmu neurotoksyczności mikrocystyny LR. Wskaźnikiem działania czynników

toksycznych dla komórek nerwowych (śródmózgowia) zwierząt jest zwiększona aktywność genu gafp, która mogła być związana z zaburzeniami ekspresji miRNA, w tym szczególnie MiR124-3p mogącym mieć miejsce wiązania w tym genie u łososia. Stosując metody molekularne uzyskano sekwencję genu gafp siei i zidentyfikowano potencjalne miejsce przyłączania się MiR124-3p metodami bioinformatycznymi. Przeprowadzono eksperymentalną ekspozycję ryb na działanie mikrocystyny LR poprzez dootrzewne wstrzykiwanie. Scharakteryzowano białko Gfap i wykazano, że ekspresja genu gfap była zwiększona tylko w 7 dniu eksperymentu. W przeciwieństwie do tego poziom MiR124-3p w mózgu badanych ryb pozostawał bez zmian. Następnie stosując podwójny test reporterowy lucyferazy potwierdzono, że badany MiR124-3p nie wchodzi w interakcje z rejonem gfap 3'UTR u siei w przeprowadzonym eksperymencie. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie wszechstronnej metodologii badań bioinformatycznych i molekularnych w omawianej publikacji.

Trzecia publikacja, „De Novo Profiling of Long Non-Coding RNAs Involved in MC-LR-Induced Liver Injury in Whitefish: Discovery and Perspectives" z 2021r. została zamieszczona w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences (22: 941) z IF = 5,542 i przyznanymi 140 punktami w skali do 200 punktów z listy czasopism MNiSW w roku publikacji. Toksyczne działanie MC-LR oprócz zmian ekspresji krótkich RNA (w tym miRNA), indukuje również odpowiedź na poziomie długich niekodujących RNA (lncRNA), które są zbudowane z ponad 200 nukleotydów i pełnią funkcje regulatorowe. Część z nich może wchodzić w interakcje z miRNA i ograniczać ich aktywność. Ekspozycję siei na MC-LR przeprowadzono w warunkach hodowli w Zakładzie Hodowli Ryb Łososiowatych w IRŚ w Rutkach. Ekspozycja polegała na dootrzewnym powtórzonym wstrzykiwaniu toksyny. Wyizolowano RNA z wątroby ryb referencyjnych oraz ryb poddanych działaniu toksyny. W pierwszym etapie analizy wyników sekwencjonowania skonstruowano transkryptom referencyjny siei. Następnie przeprowadzono analizę informatyczną lncRNA siei. Przeprowadzono identyfikację wielu nowych lncRNA, w tym o zmienionej ekspresji pod wpływem MC-LR. Stosując dodatkowo Real-Time PCR potwierdzono dla wybranych lncRNA prawidłową identyfikację ich podwyższonej ekspresji w wątrobach siei eksponowanych na działanie MC-LR. W publikacji zastosowano znane oraz nowoopracowane zaawansowane metody bioinformatyczne do opracowania wyników analiz transkryptomu siei. Zidentyfikowano wiele markerów niekodującego RNA, które mogą być zastosowane, jako bezinwazyjne biomarkery w diagnostyce uszkodzeń wątroby przez MC-LR.

Chciałbym poprosić doktoranta o ocenę na ile zastosowana metoda ekspozycji siei na działanie MC-LR przez iniekcje dootrzewnowe odzwierciedla ekspozycję na toksyny produkowane przez cyanobakterie, na którą mogą być narażone ryby w warunkach naturalnych.

Uwagi drobne: w części napisanej w j. polskim można zauważyć bardzo rzadkie niewielkie nieścisłości stylistyczne, np. na str. 18 – czy gatunek ryby może być biomarkerem oraz na str. 19 – „analiza bioinformatyczna prowadzona na sekwencji gfap". Oświadczenie autora pracy doktorskiej zamieszczono po części zatytułowanej „Oświadczenia współautorów", jednak bez wyraźnego oddzielenia od niej.

Mgr Maciej Florczyk jest pierwszy autorem trzech publikacji stanowiących jego pracę doktorską. W pierwszej i w drugiej publikacji ma po 4. współautorów, w trzeciej tylko 2. Artykuły składające się na zestaw zostały opublikowane w uznanych międzynarodowych czasopismach. Jego udział w przygotowaniu publikacji obejmował udział w poborze części prób osocza, izolacji RNA, uzyskaniu cDNA i wykonaniu RT-PCR, uzyskaniu sekwencji genu gfap, pracę z wektorem plazmidowym, zastosowanie metody reporterowej, analizie wyników, ich opracowaniu i interpretacji, wykonaniu znacznej części analiz bioinformatycznych. Mgr Florczyk miał znaczny udział w pisaniu manuskryptów i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Miał dominujący udział w przygotowaniu wszystkich trzech publikacji. Publikacja 2. Została sfinansowana głównie z projektu NCN: „miR-124 jako potencjalny negatywny modulator ekspresji genu gfap w odpowiedzi na neurotoksyczne działanie mikrocystyny-LR u ryb" w konkursie PRELUDIUM 8 (NZ9), którego kierownikiem był mgr Florczyk. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami jego udział w powstaniu tych publikacji wynosi odpowiednio 68%, 68% i 80%. Artykuły reprezentują jednolitą tematykę. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie różnorodnych zaawansowanych metod bioinformatycznej analizy uzyskanych danych molekularnych. Opublikowane wyniki są nowatorskie w zestawieniu z aktualną wiedzą. Praca doktorska mgr. Macieja Florczyka znacznie rozszerza dotychczasową wiedzę o zależnościach między toksycznym działaniem MC-LR na sieję i poziomem ekspresji niekodującego RNA pełniącego funkcje regulatorowe.

Podsumowanie:

Ogólnie oceniając, praca doktorska Pana mgr. Macieja Florczyka jest napisana w sposób uporządkowany i logiczny. Poszczególne części pracy są ze sobą powiązane. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Kandydat potwierdził w niej ogólną

wiedzę teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca doktorska wnosi wkład do aktualnej wiedzy naukowej i świadczy o dojrzałości kandydata, jako naukowca. Uwzględniając dane bibliometryczne, wg. bazy SCOPUS na dzień 1.08.2022, mgr Florczyk jest współautorem 13 publikacji, ma indeks H = 6 oraz 111 cytatów swoich publikacji, co jest wynikiem bardzo dobrym dla kandydata do stopnia doktora.

Oceniana praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i dlatego przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie mgr. Macieja Florczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjęcie zaawansowanej i nowoczesnej tematyki badawczej, pozyskanie projektu NCN na sfinansowanie części swoich badań, udział w wykonaniu prac doświadczalnych i dominujący udział w przygotowaniu publikacji na bardzo dobrym poziomie merytorycznym, wnioskuję do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia pracy doktorskiej Pana mgr. Macieja Florczyka.

Hanna Roman