UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Prof. dr hab. Dorota A. Zięba-Przybylska
Tel. 12 429 72 24
Kom. 601 415 283
Fax: 12 429 75 47
e-mail: rzzieba@cyf-kr.edu.pl

OCENA

PRACY DOKTORSKIEJ MGR KAROLA G. MAKOWCZENKO

wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie,
pod opieką naukową Pana prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego i promotora pomocniczego
dr Jana Pawła Jastrzębskiego
nt.:

WPŁYW CHEMERYNY NA TRANSKRYPTOM KOMÓREK LUTEALNYCH JAJNIKA ŚWINI DOMOWEJ (*SUS SCROFA DOMESTICA L.*)

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Rozprawa doktorska Pana mgr Karola Makuszenko nt. "Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świnidomowej (*Sus scrofa domestica L.*)" została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod opieką naukową Pana prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego i promotora pomocniczego Pan dr Pawła Jastrzębskiego. Praca doktorska była realizowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr 2015/17/B/NZ9/03595.

Podstawą ocenianej dysertacji są dwie oryginalne publikacje naukowe, oraz poprzedzające je polskojęzyczne opracowanie. Przedstawione do oceny publikacje naukowe ukazały się w latach 2020 i 2022 w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach, indeksowanych w bazie JCR *(Journal Citation Reports)* oraz umieszczonych w wykazie czasopism naukowych MNiSW. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) czasopism, w których zamieszczono prace wynosi 11,499, natomiast suma punktów MNiSW (wg komunikatu MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 31 lipca 2019 r.) to 240.

Powyższe publikacje są wieloautorskie (odpowiednio 10 autorów w pracy 1 i 7 autorów w pracy 2), co jest w pełni zrozumiałe biorąc pod uwagę przeprowadzenie doświadczeń *in vitro* na materiale

pozyskanym od zwierząt gospodarskich, ilości prezentowanych wyników oraz ich szczegółowego i kompleksowego bioinformatycznego opracowania. Chciałabym podkreślić, że Pan mgr Karol Makowczenko jest pierwszym i wiodącym autorem w opublikowanych pracach. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Pana mgr Karola Makowczenko w każdej z prac to opracowanie koncepcji pracy i metodyki badań, przeprowadzenie analizy danych, zarządzanie danymi i oprogramowaniem, opracowanie i wizualizacja wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i udzielenie odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikowania i przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu do druku. A zatem, znaczący wkład Doktoranta w powstanie każdej z prac nie budzi żadnych wątpliwości Recenzenta.

Przedłożone do oceny publikacje – pierwsza opublikowana w czasopiśmie *Genes* i druga w czasopiśmie *Cells* są spójne tematycznie i omawiają wpływ chemeryny na profile ekspresji genów oraz na mechanizmy towarzyszące transkrypcji, tj. zmiany ekspresji długich niekodujących RNA i ich interakcje z genami o znacząco zmodyfikowanej ekspresji, a także zmienność procesów alternatywnego składania transkryptów oraz allelicznej specyficzności ekspresji związanej z frekwencją wariantów pojedynczych nukleotydów w komórkach lutealnych jajnika świni domowej pozyskanych w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego.

Obecnie poznano już ponad 50 adipokin i nadal stale rośnie ich liczba. Adipokiny są definiowane jako sygnałowe, białkopochodne czynniki, których produkcja lub wydzielanie następuje głównie w tkance tłuszczowej. Jedną z kolejnych odkrytych adipokin jest chemeryna. Wittamer i współpracownicy w 2003 roku opisali chemerynę jako nowy czynnik chemotaktyczny, a w roku 2008 Cash i współpracownicy potwierdzili właściwości chemotaktyczne tego białka. W 2012 roku zauważono bezpośredni wpływ chemeryny na funkcjonowanie układu rozrodczego ssaków. Autor rozprawy przeprowadził swoje badania na modelu *in vitro* – komórkach lutealnych pochodzących z 72 godzinnej hodowli, a poddanych 24 godzinnemu działaniu chemeryny. Celem przedstawionej do recenzji rozprawy była analiza wpływu chemeryny na profil strukturalny oraz ekspresyjny transkryptomu komórek lutealnych świni domowej pozyskanych pomiędzy 10 a 12 dniem cyklu rujowego. Argumentem przemawiającym za podjęciem się w/w badań był brak informacji w literaturze dotyczący oddziaływania chemeryny na ekspresję genów oraz towarzyszące mechanizmy molekularne zachodzące w komórkach ciałka żółtego świni. Pan mgr Karol Makowczenko w swojej dysertacji postawił cztery hipotezy badawcze: 1. chemeryna w fizjologicznych stężeniach wpływa na globalną ekspresję genów, 2. chemeryna jest odpowiedzialna za modyfikacje ekspresji długich niekodujących RNA oraz ich interakcje z produktami genów kodujących białka, 3. chemeryna regulujeproces allelicznej specyficzności ekspresji, 4. chemeryna moduluje procesy posttranskrypcyjne, takie jak alternatywne składanie transkryptów. Hipotezy te zweryfikowano stosując metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomów komórek lutealnych świni hodowanych *in vitro* pod wpływem rekombinowanej ludzkiej chemeryny. Wyniki analiz *in silico* zweryfikowano poprzez pomiar przyrostu ilości produktu reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, z wykorzystaniem RNA użytego do sekwencjonowania.

Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest nowatorska i wypełnia lukę w bazie wiedzy dotyczącej działania chemeryny w komórkach ciałka żółtego świni na poziomie molekularnym.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w postaci dwóch spójnych tematycznie prac uzupełnia wiedzę o inne niż znamy do tej pory oddziaływania chemeryny. Ponadto, dzięki zastosowaniu sekwencjonowania wysokoprzepustowego transkryptomu oraz narzędzi bioinformatycznych przeprowadzono w szerokim zakresie badania ekspresji genów oraz dokonano charakterystyki transkryptów w genomie komórek lutealnych poddanych działaniu chemeryny. W wyniku doświadczeń otrzymano unikatowe wyniki dotyczące tkankowo-specyficznych zmian w transkryptomie komórek lutealnych świni – co należy podkreślić szczególnie, gdyż ten charakterystyczny i właściwy dla człowieka model badawczy w tego typu badaniach – wykorzystywany jest bardzo rzadko. Ogólnie w trakcie analiz zaobserwowano istotne zmiany ekspresji 509 genów oraz 24 transkryptów zakwalifikowanych jako długie niekodujące RNA, a także 137 przypadków modyfikacji procesu alternatywnego składania transkryptów i 18 przypadków zmienności allelicznej specyficzności ekspresji. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono szczegółowe analizy funkcjonalne, których efektem było przypisanie genów do takich procesów wewnątrzkomórkowych, jak: interakcje cytokin z ich receptorami, apoptoza, metabolizm kwasu arachidonowego oraz ścieżki transdukcji sygnałów chemokin i wiele innych. Na podstawie pozyskanych danych funkcjonalnych sporządzono dokładne mapy prezentujące ujednolicony wpływ chemeryny na szlaki sygnałowe oraz metaboliczne w komórkach lutealnych świni domowej. Wyniki uzyskane metodami *in silico* walidowano na bazie materiału użytego do RNA-Seq, z zastosowaniem ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, opublikowanej w *Genes,* Doktorant podjął sie zbadania, czy chemeryna wpływa na trnskryptom komórek lutealnych świni pozyskanych w środkowej fazie cyklu rujowego. Doświadczenia przeprowadził na komórkach lutealnych pozyskanych z ciałek żółtych jajników od 5 loch, w prywatnej rzeźni. Komórki lutealne były hodowane przez 48-godzin tzw. wstępnej hodowli, a następnie przez 24 godziny w obecności lub bez rekombinowanej ludzkiej chemeryny w dawce 200 ng/ml w pożywce F12 wzbogaconej 1% udziałem BSA.

W tym miejscu mam pytanie do Doktoranta:

1. Czy komórki „pulowano" od 5 osobników? W ilu powtórzeniach zakładano hodowlę?
2. Dawka 200 ng/ml wydaje się być wysoka, zatem jak pisze Pan w pracy wybrano ją na podstawie literatury: zatem jakie jest stężenie endogennej chemeryny u świń a także u kobiet, bowiem tę informację także brano pod uwagę przy wyborze dawki hormonu.

Wyniki zamieszczone w pierwszej publikacji wskazują na to, iż analiza ekspresji genów ujawniła zmiany 509 DEG (z ang. differentially expressed genes, DEGs) i 721 transkryptów. Wśród wszystkich zidentyfikowanych DEG, 301 wykazało wzrost ekspresji w próbach inkubowanych z chemeryną, natomiast 208 wykazało obniżenie ekspresji. Na podstawie analizy funkcjonalnej, stwierdzono, iż z puli wszystkich DEG, 457 powiązano z co najmniej jedną funkcją (terminem) w obrębie trzech kategorii: proces biologiczny, funkcja molekularna oraz komponent komórkowy. W obrębie kategorii o nazwie proces biologiczny DEG przypisano do 407 podkategorii, takich jak np. odpowiedź komórkowa na bodziec, regulacja transdukcji sygnału, funkcjonowanie układu odpornościowego, programowana śmierć komórki, odpowiedź na cytokiny, produkcja cytokin i sygnalizacja kinazy jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B. W zakresie kategorii o nazwie funkcja molekularna, największą ilość DEG przypisano następującym podkategoriom:

receptora cytokinowego i aktywność regulatora receptora, wiązanie receptora czynnika wzrostu i wiązanie receptora chemokinowego CCR. W kategorii o nazwie komponent komórkowy, spośród 15 podkategorii, do których przypisano DEG, istotnymi biologicznie wydały się być: region zewnątrzkomórkowy, powierzchnia komórki, cytoplazma i połączenie komórka-komórka.

Analiza ścieżek metabolicznych i sygnałowych ujawniła, iż produkty 286 DEG biorą udział w 51 ścieżkach biologicznych. Wśród nich, 32 szlaki były bezpośrednio związane z procesami patologicznymi, takimi jak kancerogeneza, choroby autoimmunologiczne, infekcje wywoływane przez różne patogeny. Pracę w *Genes* zakończono konkluzją, iż zmiany w transkryptomie wywołane działaniem chemeryny mogą prowadzić do aktywacji szlaków transdukcji sygnałów MAPK (w tym czynników transkrypcyjnych NF-κB) i JAK/STAT oraz pośrednio do wzrostu produkcji wielu cytokin i chemokin przez komórki lutealne, oraz, że zmiany ekspresji genów oraz procesów regulujących transkrypcję pod wpływem chemeryny, mogą aktywować zarówno mechanizmy pro-apoptotyczne oraz równolegle pro-przeżyciowe w komórkach lutealnych, co wg Autora może wynikać z pozyskania komórek środkowej fazie cyklu rujowego. Autor umieścił także informację, iż chemeryna prawdopodobnie jest zaangażowana w procesy metaboliczne powiązane z rozrodem poprzez wpływ na produkcję progesteronu, wzrost czynników prozapalnych i angażować się w proces luteolizy.

Chciałabym zadać pytanie Doktorantowi na jakich przesłankach opierała się ostatnia konkluzja, gdyż w paragrafie powyżej konkluzji Autor pisze, iż faza środkowo-lutealna to okres w którym komórki nie rozwijają jeszcze aktywności luteolitycznej, a zatem skąd zaangażowanie chemeryny w proces luteolizy?

Celem drugiej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Cells* było poszerzenie analiz i precyzyjne opisanie mechanizmu molekularnego w wyniku którego chemeryna wpływa i reguluje procesy na poziomie transkryptomu w komórkach lutealnych świni. W pracy doświadczenia objęły identyfikację przypadków alternatywnego składnia transkryptów, wykazujących różnice frekwencji (ang. *differential alternative splicing events*, DAS) pod wpływem chemeryny, z zamiarem wykrycia zmian w obrębie transkryptomu niewidocznych podczas eksperymentów bazujących na modyfikacji ekspresji genów/transkryptów. Ponadto, w publikacji zastosowano procedurę umożliwiającą wykrycie przypadków allelicznej specyficzności ekspresji (ang. *allele-specific expression*, ASE) pośród wariantów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide variants*, SNV) wykazujących dysproporcje frekwencji w obrębie DEG.

Wyniki zamieszczone w drugiej publikacji wskazują na to, iż analiza różnic ekspresji przeprowadzona na łączonej puli nowopoznanych długich niekodujących lncRNA oraz makromolekuł uprzednio opisanych w bazie Ensembl wykazała, iż ekspresja 24 cząsteczek (kodowanych przez 12 genów) uległa modyfikacji pod wpływem chemeryny. Spośród nich, 20 lncRNA poznano wcześniej, a pozostałe 4 zidentyfikowano w niniejszym badaniu. Pod wpływem badanej chemokiny ekspresja 16 DEL (lncRNA o zróżnicowanej ekspresji (ang. *differentially expressed lncRNA*, DEL) uległa obniżeniu, a 8 podwyższeniu. Analiza *cis*-interakcji ujawniła 11 przypadków DEL oddziaływujących z 6 DEG na podstawie ich ko-lokalizacji w genomie świni domowej. Wśród nich 3 interakcje zaklasyfikowano jako pokrywające się z DEG. Wykryto 137 przypadków DAS, zaobserwowanych na podstawie porównania frekwencji przypadków alternatywnego splicingu między grupą badaną oraz kontrolną. Wszystkie zidentyfikowane przypadki DAS zlokalizowano w obrębie 92 DEG oraz

przypisano do 7 grup. W grupie wyników przedstawiono także wyniki dotyczące oddziaływania chemeryny na zmienność allelicznej specyficzności ekspresji i wpływ chemeryny na ekspresję genów kodujących funkcjonalne białka. Wykryte DEL, DAS i ASE zgrupowano w klastry odpowiadające przynależności do ścieżek KEGG oraz ponownie przeprowadzono analizę statystyczną przegrupowanych danych. Założony poziom istotności statystycznej spełniły 84 szlaki metaboliczne lub transdukcji sygnałów, skupiając się na przeanalizowaniu szlaków wpływających na funkcjonowanie jajnika, ciałka żółtego lub samych komórek lutealnych.

W trakcie lektury powyższych publikacji, które były już uprzednio recenzowane, nie znalazłam elementów problematycznych. Prace stanowią logiczny i spójny układ, są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem zastosowanych analiz oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną obszerną dyskusją. Dane przedstawione w publikacjach mają charakter nowatorski. Publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach ułatwiają zadanie recenzentowi. Zarówna strona merytoryczna, jak i wartość naukowa uzyskanych wyników została potwierdzona wcześniej przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali te prace do druku.

Jak wspomniałam, oryginalne prace badawcze, które składają sie na rozprawę, opatrzone są dobrze zredagowanym 34 stronnicowym omówieniem zawierającym: streszczenia w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp będący syntetycznym przeglądem literatury, cel i zakres pracy z zawartymi w nim hipotezami badawczymi, materiał i metody, syntetycznie przedstawione wyniki, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię w liczbie 100 pozycji. Opracowanie to jest przygotowane w sposób przejrzysty, chociaż zdarzają się nieliczne błędy edytorskie, skróty myślowe czy zapożyczenia z języka angielskiego. Nie wpływają one jednak na wysoką ocenę dysertacji.

W krótkim 6 stronicowym *Wstępie* Doktorant przedstawił dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia oraz wyjaśnił unikatowość modelu badawczego - świni - dla tego typu badań. Rozdział ten jest napisany dojrzale i doskonale prowadzi do postawionego *Celu pracy* i hipotez badawczych, co świadczy o pełnym zrozumieniu tematu przez Doktoranta.

W rozdziale *Materiał i Metody* Doktorant przedstawił w sposób zwięzły opis materiału doświadczalnego, izolację i hodowle *in vitro* komórek lutealnych jajnika, izolację RNA i wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu, analizy *in silico*, walidację ekspresji wybranych genów i długich niekodujących RNA metodą qPCR.

W rozdziale *Wyniki* opisano w 7 punktach główne wyniki zawarte w pracach stanowiących rozprawę doktorską.

Polskojęzyczne opracowanie zamyka *Podsumowanie i wnioski*, które wskazują na fakt, iż chemeryna, wpływając poprzez transkryptom na regulację steroidogenezy, lokalną produkcję czynników prozapalnych, angiogenezę oraz produkcję prostaglandyn, kontroluje funkcjonowanie ciałka żółtego i wydaje się być hormonem łączącym regulację procesów metabolicznych i rozrodczych.
To, czego z oczywistych powodów brakuje w polskojęzycznym opracowaniu to Dyskusja. Można ją znaleźć w obu pracach i stanowi ona bardzo dobre opracowanie i bogate źródło wcześniejszych

i obecnych informacji dotyczących działania chemeryny na poziomie molekularnym. Jestem pod dużym wrażeniem dyskusji w obu pracach i liczebności cytowanych referencji, odpowiednio 79 i 134 w bibliografiach prac w *Genes* i *Cells*, co świadczy o dobrym poruszaniu się Doktoranta w problemach fizjologicznych, zachodzących w ciałku żółtym świni. Uważam, że dobrze opracowane dyskusje stanowią o wyjątkowej dociekliwości naukowej Doktoranta i Jego ogromnej pracy w opracowaniu manuskryptów.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgr Karola Makowczenko stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Starannie przemyślana, a następnie konsekwentnie zrealizowana koncepcja pracy, opartej na zastosowaniu technik hodowli *in vitro*, sekwencjonowania wysokoprzepustowego RNA-seq oraz narzędzi bioinformatycznych pozwoliła na obiektywną i krytyczną ocenę problemów postawionych w hipotezach badawczych. Prace wchodzące w skład dysertacji doktorskiej świadczą o dużej biegłości Autora w poruszanej przez Niego tematyce biologicznej odnoszącej się do działania chemeryny w ciałku żółtym świni. Umiejętność krytycznej dyskusji otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Autora.

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską nt. *„Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świni domowej Sus scrofa domestica L.*" oceniam wysoko. Podjęty przez Doktoranta, mgr Karola Makowczenko temat jest istotny z naukowego, biologicznego punktu widzenia. Pragnę podkreślić, iż wykorzystane analizy bioinformatyczne umożliwiły uzyskanie nowatorskich wyników.
Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska nt. *„Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świni domowej Sus scrofa domestica L.*" **i indywidualny wkład Doktoranta WBiB UWM w Olsztynie spełniają wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022r. poz. 574 ze zm.) i zwraca się do Wysokiej Rady Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr Karola G. Makowczenko i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ze względu na innowacyjność zastosowanych metod i bardzo dobrą biegłość tematu, co przejawiło się w obszernych Dyskusjach nad otrzymanymi wynikami wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,

Kraków, 31 października 2022 roku

prof. dr hab. Dorota Zięba-Przybylska