Warszawa, 7 grudnia 2022 r.

dr hab. inż. Andrzej Herman, profesor instytutu

Zakład Inżynierii Genetycznej

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Instytucka 3
05-110 Jabłonna

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Karola G. Makowczenki pt. „Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świni domowej (*Sus scrofa domestica L.*)"

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Tadeusza Kamińskiego oraz promotora pomocniczego dr. Jana Pawła Jastrzębskiego.

U samic proces rozrodu i metabolizm są ze sobą ściśle powiązane i wzajemnie regulowane. Chociaż znacząca część tych interakcji zachodzi na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, jednakże co raz więcej badań wskazuje na bezpośredni wpływ mediatorów związanych ze statusem metabolicznym organizmu na funkcje gonad. Stwierdzono między innymi, że wytwarzane przez tkankę tłuszczową adipokiny takie jak adiponektyna, chemaryna, leptyna, omentyna, czy wisfatyna oddziałując poprzez swoiste receptory mogą bezpośrednio regulować procesy zachodzące w gonadach samic, w tym rozwój i aktywność sekrecyjną ciałka żółtego oraz proces jego luteolizy. Jednak dokładne mechanizmy, poprzez które adipokiny wpływają na funkcje jajnika są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Tematyka przedłożonej do oceny pracy doktorskiej mgr. Karola G. Makowczenki wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt przez zespół prof. dr. hab. Tadeusza Kamińskiego dotyczących między innymi określenia roli adipokin w układzie rozrodczym świń w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Badania opisane w obu publikacjach wchodzących w skład pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na realizację projektu nr 2015/17/B/NZ9/03595

pt. „Wpływ chemeryny na funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jajniki świń w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży", którego kierownikiem był promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. Tadeusz Kamiński.

CHARAKTERYSTYKA PRACY

Przedłożona do oceny praca doktorska liczy 38 stron i została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla rozpraw naukowych. Zawiera stronę tytułową, spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, cel i zakres badań, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Zestawienie cytowanego piśmiennictwa obejmuje aż 100 pozycji. Do pracy doktorskiej dołączono dwie kopie publikacji naukowych oraz oświadczenia współautorów prac.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2020 – 2022 w dwóch czasopismach:

1. **Makowczenko K.G.**, Jastrzębski J.P., Szeszko K., Smolińska N., Paukszto Ł., Dobrzyń K., Kieżun M., Rytelewska E., Kamińska B., Kamiński T. 2020 Transcription analysis of the chemerin impact on gene expression profile in the luteal cells of gilts. Genes, 11:651. doi: 10.3390/genes11060651

   IF_{2020} = 3,759; pkt. MEiN = 100

2. **Makowczenko K.G.**, Jastrzębski J.P., Paukszto Ł., Dobrzyń K., Kieżun M., Smolińska N., Kamiński T. 2022 Chemerin impact on alternative mRNA transcription in the porcine luteal cells. Cells, 11:715. doi: 10.3390/cells11040715

   IF_{2021} = 7,666; pkt.MEiN = 140

Należy zaznaczyć, że obie publikacje ukazały się w uznanych, wysoko punktowanych czasopismach. Sumaryczny IF liczony odpowiednio dla roku opublikowania pracy (dla roku 2022 przyjęto wartość IF opublikowaną przez Web of Science dla roku 2021) wynosi 11,425. Natomiast liczba punktów liczona zgodnie z Komunikatem Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 21 grudnia 2021 roku wynosi 240. Publikacje wchodzące w skład ocenianej pracy doktorskiej są wieloautorskie, ale w każdej z nich Kandydat jest pierwszym autorem, co świadczy o jego ważnym udziale w ich powstaniu. Na postawie dostarczonych wraz z rozprawą doktorską oświadczeń pozostałych współautorów, jak również deklaracji autorów składanych w procesie publikowania prac w czasopismach **udział mgr. Karola**

G. Makowczenki w powstaniu obu prac wchodzących w skład pracy doktorskiej należy uznać za wysoki. Brał On udział między innymi w opracowaniu koncepcji i metodyki badań; przeprowadzeniu doświadczeń; analizie, opracowaniu i wizualizacji wyników; przygotowaniu obu manuskryptów i korespondencji z recenzentami w trakcie procesu publikacyjnego. Pełnienie przez Kandydata tak znaczącej pozycji wśród współautorów prac świadczy z pewnością o jego wysokich kompetencjach merytorycznych i zdolnościach organizacyjnych, a do pewnego stopnia również liczba współautorów odpowiednio 10 i 7 autorów jest w pełni uzasadniona szerokim zakresem opublikowanych w tych pracach badań, które z pewnością wymagały zaangażowania specjalistów z różnych dziedzin.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Forma przygotowania rozprawy doktorskiej na podstawie opublikowanych prac naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ułatwia recenzentowi ocenę merytoryczną opublikowanych badań, gdyż publikacje przed przyjęciem do druku uzyskały pozytywne opinie niezależnych ekspertów powołanych w obu czasopismach, co świadczy o ich dużej wartości naukowej.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy wpływu plejotropowej adipokiny - chemeryny na ekspresję genów i długich niekodujących RNA (lncRNA) oraz modyfikacje procesów alternatywnego składania transkryptów, a także allelicznej specyficzności ekspresji w komórkach lutealnych jajnika świni domowej (*Sus scrofa domestica L.)* w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego. Podjęcie tych badań było uzasadnione, gdyż wcześniej przeprowadzone eksperymenty wykazały, że chemeryna wpływa nie tylko na status metaboliczny organizmu, ale również na funkcje układu immunologicznego oraz proces rozrodu, w tym hamowanie steroidogenezy w jajniku. Ponadto w komórkach jajnika stwierdzono także obecność transkryptów oraz białek chemeryny i jej receptorów.

W krótkim ***Wstępie***, którego długość jest odpowiednia dla rozprawy doktorskiej opracowywanej na podstawie publikacji, mgr Karol G. Makowczenko charakteryzuje chemerynę, opisuje jej budowę, proces biosyntezy z uwzględnieniem powstawiania różnych izoform tego białka, a także krótko charakteryzuje trzy odkryte do tej pory receptory chemeryny tj. CMKLR1, GPR1 i CCRL. Następnie wspomina również o zidentyfikowanych do tej pory funkcjach chemeryny, biorąc pod uwagę jej rolę w regulacji procesów metabolicznych, odpornościowych oraz rozrodu. Kandydat przytacza m.in. badania świadczące o wpływie chemeryny na procesy zachodzące na różnych piętrach kontrolującej proces rozrodu samic neurohormonalnej osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG), w tym prace, w których

wykazano obecność receptorów chemeryny w różnych obszarach podwzgórza, gruczołowej części przysadki oraz jajnikach. Jak podkreśla, w większości prac traktujących o wpływie chemeryny na procesy zachodzące na różnych poziomach osi HPG ograniczono się do określenia ekspresji pojedynczych genów lub produkcji wąskiej gamy metabolitów, w natomiast ciągle brakuje badań, które umożliwiłyby uzyskanie możliwie pełnego obrazu efektów oddziaływania chemeryny na transkryptom, proteom i metabolom poszczególnych komórek, tkanek i narządów wchodzących w skład osi HPG. Zdaniem Doktoranta, te luki w dotychczasowej wiedzy wymagały uzupełnienia, dlatego w swoich badaniach chciał spojrzeć szerzej na rolę chemeryny w regulacji ekspresji genów w komórkach lutealnych z jednoczesnym uwzględnieniem zjawisk towarzyszących modyfikacjom transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym. W dalszej części tego rozdziału, mgr Karol G. Makowczenko wspomina o istotnej roli w regulacji ekspresji genów, które pełnią długie niekodujące RNA (lncRNA), stanowiące najliczniejszą grupę transkryptów w komórkach ssaków. Cząsteczki te wpływają na ekspresję genów w komórkach ssaków poprzez kontrolę procesu transkrypcji wpływając na stabilność mRNA oraz przebieg translacji i obróbki posttranslacyjnej białek. Ponieważ, co raz więcej publikacji wskazuje na istotną rolę lncRNA w regulacji funkcji rozrodczych u ssaków, w tym funkcji ciałka żółtego, dlatego w swoich badaniach postanowił również określić wpływ chemeryny na ekspresję lncRNA w komórkach lutealnych. W dalszej części tekstu opisuje mechanizm alternatywnego składania transkryptów, a także jego znaczenie dla różnorodności proteomu w komórkach. Ponieważ w opublikowanych wcześniej badaniach stwierdzono w komórkach lutealnych przypadki alternatywnego splicingu genów m.in. zaangażowanych w luteolizę, mgr Karol G. Makowczenko zdecydował się na określenie ewentualnego wpływu chemeryny na proces alternatywnego składnia transkryptów, wykazujących różnice frekwencji. W oparciu o przesłanki związane ze stwierdzoną korelacją stężenia chemeryny we krwi i wzrostem angiogenezy u ludzi spowodowanej występowaniem specyficznych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, zdaniem Kandydata celowe wydało się zastosowania procedur eksperymentalnych umożliwiających wykrycie przypadków allelicznej specyficzności ekspresji pośród wariantów pojedynczych nukleotydów wykazujących dysproporcje frekwencji w obrębie genów o zróżnicowanej ekspresji.

Ta część pracy doktorskiej jest napisana w sposób zwięzły, przy odpowiednim doborze piśmiennictwa, a co najbardziej istotne zastosowany sposób opisu w sposób klarowny uzasadnia potrzebę wykonania kolejnych analiz mających na celu możliwie szerokiego poznania wpływu chemeryny na profil strukturalny oraz ekspresyjny transkryptomu w komórkach lutealnych świni.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym ***Cel i Zakres Badań***, Doktorant precyzyjnie formułuje cel pracy i przyjęte hipotezy badawcze. Przyjmuje założenia, że chemeryna w fizjologicznych stężeniach:

1) wpływa na globalną ekspresję genów,
2) jest odpowiedzialna za modyfikacje ekspresji długich niekodujących RNA oraz ich interakcje z produktami genów kodujących białka,
3) reguluje proces allelicznej specyficzności ekspresji,
4) moduluje procesy posttranskrypcyjne, takie jak alternatywne składanie transkryptów.

Wspomina również o technikach badawczych i metodach zastosowanych do weryfikacji przyjętych hipotez badawczych. Natomiast nie do końca jasny jest dla mnie powód, dla którego w tej części, w moim odczuciu po raz kolejny w tej samej pracy, Kandydat pisze o fragmentaryczności wiedzy dotyczącej roli chemeryny w modulacji transkryptomu w komórkach lutealnych świni. W mojej opinii problem ten został w sposób dosadny opisany we ***Wstępie***.

W rozdziale pracy doktorskiej pt. ***Materiały i Metody***, Kandydat w obszerny i wyczerpujący sposób opisuje sposób pozyskania materiału biologicznego – jajników od pięciu dojrzałych samic świni domowej (*S. scrofa domestica L.*) oraz procedury związane z izolacją i hodowlą *in vitro* komórek lutealnych jajnika. W sposób wystarczająco wyczerpujący, dla pracy doktorskiej opartej na publikacjach naukowych, opisuje kolejne metody badawcze - izolację RNA oraz wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu, a także wykonane analizy bioinformatyczne. Opisuje sposób kontroli jakości sekwencjonowania oraz wstępnego przetwarzanie odczytów, proces mapowania odczytów oraz analiza różnic ekspresji genów, identyfikację oraz analizę różnic ekspresji długich niekodujących RNA, analizę zmienności miejsc alternatywnego składania transkryptów, analizę allelicznej specyficzności ekspresji, analizę funkcjonalną zidentyfikowanych przypadków DEG, DEL, DAS i ASE, a także walidację ekspresji wybranych genów oraz długich niekodujących RNA metodą qPCR. Na podstawie lektury tej części pracy doktorskiej można ocenić prawidłowość przyjętego modelu badawczego oraz wiedzę Doktoranta w zakresie wykorzystanych technik badawczych. **W mojej opinii sposób opisu i liczba detali zawarta w tej części pracy wskazuje na dużą i dogłębną znajomość zastosowanych metod badawczych oraz, co również istotne, na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr Karola G. Makowczenkę**. Z pewnością zastosowane metody badawcze są adekwatne dla weryfikacji postawionych hipotez.

Jednak mam pewne uwagi do podrozdziału pt. ***Walidacja ekspresji wybranych genów oraz długich niekodujących RNA metodą qPCR***, w którym Doktorant opisuje sposób walidacji uzyskanych wyników techniką Real-Time PCR. W opisie dotyczącym przygotowania mieszaniny reakcyjnej pada stwierdzenie „Do qPCR przygotowano mieszaniny o objętości 20 µL, składające się z 40 µg (publikacja 1) lub 30 µg (publikacja 2) cDNA (...)" natomiast, w poprzednim akapicie Kandydat stwierdza, że „Do syntezy matryc cDNA wykorzystano po 500 ng każdej z próbek użytej w RNA-Seq (...) uzyskując całkowitą objętość 10 µL każdej z mieszanin". Nie jest możliwe, aby z mieszaniny po reakcji odwrotnej transkrypcji, do przeprowadzenia której użyto 500 ng RNA udało się pobrać 30 lub 40 µg cDNA. Dlatego moim zdaniem, w opisie tym i także w publikacji nr 1 wdarła się pomyłka podanych jednostkach masy, gdyż zapewne „ng" omyłkowo zamieniono na „µg". Natomiast zapis jednostek jest prawidłowy w publikacji nr 2 i został błędnie zacytowany w pracy doktorskiej. Mam również uwagę co do metodologii zastosowanej do weryfikacji specyficzności reakcji PCR, w przypadku analizy ekspresji genów, dla których zastosowano startery, w obecności których amplifikowano fragmenty mRNA o długości większej niż 250 pz. Zastosowana w badaniach metoda określania specyficzności amplifikacji oparta na analizie krzywych topnienia (ang. melting-curve analysis) końcowych produktów reakcji PCR jest w tym przypadku nie do końca precyzyjna. Zakładając około 50% udział par GC w sekwencji produktów PCR, będą one ulegały dysocjacji w z temperaturze zbliżonej do temperatury dysocjacji długich cząsteczek DNA. Dlatego na podstawie wyłącznie analizy krzywych topnienia nie można wykryć ko-amplifikacji niespecyficznych dłuższych produktów PCR w mieszaninie reakcyjnej. Ponadto w przypadku reakcji prowadzonych w obecności barwnika interkalującego SYBR Green zaleca się projektowanie starterów amplifikujących produkty wielkości około 150 pz, gdyż wiele prac wskazuje, że wydajność reakcji amplifikacji znacząco spada dla produktów większych niż 200 pz. Dlatego zastanawia mnie dlaczego Doktorant zastosował startery o takiej charakterystyce?

W kolejnym rozdziale rozprawy pt. ***Wyniki*** Kandydat przedstawia wyniki swoich badań. Liczba uzyskanych i przetworzonych danych jest imponująca. Podczas lektury tej części rozprawy i prac mgr Karola G. Makowczenki można zdać sobie sprawę z ogromu wykonanej pracy, a także nowatorskiego charakteru uzyskanych wyników i zaawansowania metod, którymi swobodnie posługuje się doktorant. Wykazał on między innymi indukowane przez chemerynę zmiany ekspresji 509 genów oraz 24 transkryptów lnc RNA, a także 137 przypadków modyfikacji procesu alternatywnego składania transkryptów i 18 przypadków zmienności allelicznej specyficzności ekspresji w komórkach lutealnych świni.

Przeprowadzone następnie analizy funkcjonalne pozwoliły na przypisanie genów o zmiennej ekspresji m.in. do takich procesów jak interakcje cytokin z receptorami cytokin, apoptoza, przetwarzanie i prezentacja antygenu, różnicowanie limfocytów Th1 i Th2, metabolizm kwasu arachidonowego oraz ścieżki transdukcji sygnałów chemokin, TNF, MAPK, Jak-STAT i wiele innych. W oparciu o uzyskane dane Kandydat sporządził niezwykle złożone ryciny obrazujące wpływ chemeryny na procesy metaboliczne i szlaki sygnałowe wpływające na fizjologię ciałka żółtego, które zamieścił w materiałach suplementowych.

W kolejnej części pracy pt. ***Podsumowanie i Wnioski*** Doktorant dokonuje zwięzłego podsumowania uzyskanych wyników i formułuje cztery wnioski:

1) 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,
2) zmiany ekspresji genów oraz procesów regulujących transkrypcję, pod wpływem chemeryny, mogą aktywować zarówno mechanizmy pro-apoptotyczne (lub nawet pro-nekroptyczne) oraz pro-przeżyciowe w komórkach lutealnych,
3) chemeryna, wpływając poprzez transkryptom na regulację steroidogenezy, lokalną produkcję czynników prozapalnych, angiogenezę oraz produkcję prostaglandyn, kontroluje funkcjonowanie ciałka żółtego,
4) chemeryna wydaje się być hormonem łączącym regulację procesów metabolicznych i rozrodczych.

Taki układ sugeruje, że wnioski te będą odnosiły się wprost do postawionych wcześniej hipotez badawczych, jednak tak nie jest. We wnioskach Doktorant skupia się przede wszystkim na wymienieniu procesów i szlaków sygnałowych, na które wpływa chemeryna w komórkach lutealnych świni domowej. Natomiast w mojej opinii sposób sformułowana hipotez roboczych sugerował, że wnioski odpowiedzą na pytanie na jakie procesy towarzyszące ekspresji i dojrzewaniu makromolekuł tworzących transkryptom w komórkach lutealnych świni wpływa chemeryna. Dlatego uważam, że w tej części Kandydat powinien raczej sformułować wnioski bezpośrednio nawiązujące do hipotez, które sam postawił. Natomiast cenne obserwacje, dotyczące procesów zachodzących w komórkach lutealnych, które mogą być potencjalnie regulowane przez chemerynę powinny stanowić istotną część posumowania. Sądzę również, że warto by było w tym miejscu pracy nawiązać do ograniczeń zastosowanych metod i wskazać, na konieczność prowadzenia dalszych badań mających na celu jeszcze głębsze poznanie roli chemeryny w modulacji procesów zachodzących w jajniku świni, m.in. na poziomie proteomu.

Kandydat słusznie zaznaczył we ***Wstępie***, że istnieje istotna korelacja pomiędzy zmianami w poziomie mRNA a ekspresją kodujących je białek, jednak na pewno nie jest ona pełna.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świni domowej (Sus scrofa domestica L.)" jest zwartym opracowaniem przygotowanym w oparciu o dwie monotematyczne, wzajemnie uzupełniające się publikacje stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Zastosowanie interesujących i przemyślanych rozwiązań metodycznych pozwoliło Kandydatowi w pełni wykonać postawione zadania i osiągnąć zamierzony cel. Wykonanie tak ambitnych badań wymagało dobrego przygotowania teoretycznego, specjalistycznego sprzętu, dużych umiejętności manualnych oraz analitycznych. Z pewnością podjęte przez Doktoranta badania są istotne z naukowego punktu widzenia i ma duże znaczenie poznawcze. Z pewnością lepsze zrozumienie mechanizmów poprzez które adipokiny wpływają na procesy zachodzące w komórkach lutealnych przyczyniają się do rozwoju badań w dyscyplinie biologia, a nawet w dyscyplinach pokrewnych. Świnia jest uznanym modelem zwierzęcym, a wyniki przeprowadzonych na tym zwierzęciu badań mogą być do pewnego stopnia ekstrapolowane dla człowieka. Dlatego w mojej opinii badania przeprowadzone przez Karola G. Makowczenkę mają zauważalny potencjał praktyczny i mogą być również użyteczne dla medycyny ludzkiej, gdyż uzyskane wyniki wskazują na chemerynę, jako potencjalny czynnik promujący proces zapalny i regresję ciałka żółtego, co sugeruje, że adipokina ta jest odpowiedzialna za zaburzenia interakcji pomiędzy jajnikami i macicą. Wydaje się, że chemeryna może być jednym z czynników odpowiedzialnych za wywoływanie zaburzeń rozrodu, a jej wpływ na komórki lutealne może przyczynić się do nie udanej implantacji zarodka i prowadzić do utraty ciąży.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr Karola G. Makowczenki pt. „Wpływ chemeryny na transkryptom komórek lutealnych jajnika świni domowej (Sus scrofa domestica L.)" odpowiada warunkom 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.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie o dopuszczenie Jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A Hennau