Prof. dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. Grzegorza Tomasza Kopija

zatytułowanej: "Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji"

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Recenzja została przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 11 lipca 2024 r.

Zasadność podjętej tematyki:

Rozprawa doktorska Pana mgr. Grzegorza Kopija wpisuje się w tematykę badań Katedry Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, dotyczących produkowanych przez tkankę tłuszczową adipokin, prowadzonych w zespole prof. dr hab. Niny Magdaleny Smolińskiej, promotora niniejszej rozprawy. Przedmiotem badań jest wisfatyna, adipokina o działaniu plejotropowym. Obecność wisfatyny w strukturach osi podwzgórze-przysadka-jajniki różnych gatunków ssaków sugeruje jej zaangażowanie w regulację funkcji żeńskiego układu rozrodczego. Wiele aspektów funkcjonowania tej adipokiny zostało już opisanych, jednak mechanizmy, poprzez które może ona oddziaływać w okresie implantacji, nie są jeszcze poznane. Problematyka ta jest interesująca, gdyż okres implantacji jest jednym z krytycznych momentów dla przeżycia zarodków. U świni, aż do 40% embrionów jest traconych w okresie matczynego rozpoznania ciąży i następującej po nim implantacji. Z tego względu uważam, że podjęcie badań zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat wpływu wisfatyny na globalną ekspresję genów, na poziomie transkryptów i białek, w komórkach lutealnych jajnika świni w okresie implantacji jest jak najbardziej zasadne.

Struktura rozprawy doktorskiej:

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską, wykonaną w ramach projektu badawczego OPUS16 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, stanowią dwa opublikowane w czasopismach naukowych *International*

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel./fax: +48 12 664 50 98

Journal of Molecular Science oraz *Scientific Reports* w 2024 roku spójne tematycznie artykuły, prezentujące oryginalne wyniki badań dotyczące zmian transkryptomicznych i proteomicznych zachodzących pod wpływem wisfatyny w komórkach lutealnych świni w okresie implantacji. Sumaryczny współczynnik wpływu (*impact factor*) czasopism wynosi 10,2, a suma punktów zgodnie z aktualnym komunikatem Ministra Edukacji i Nauki to 280. Obie publikacje zawierają również obszerne dane uzupełniające (tzw. *supplementary data*). Prace mają charakter zespołowy i liczą odpowiednio dziewięciu i dwunastu współautorów.

Zgodnie z wytycznymi dla przewodów prowadzonych w oparciu o prace wieloautorskie, mgr Kopij przedstawił oświadczenia, w których opisano indywidualny wkład każdej z osób w powstawanie publikacji. W każdym z artykułów Doktorant jest pierwszym autorem, a z informacji zawartych w oświadczeniach wynika, że Jego udział w powstaniu prac polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, analizie formalnej i redagowaniu tekstu, przygotowaniu manuskryptu oraz udzieleniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji. Zgodnie z oświadczeniami, ośmiu współautorów publikacji 1. i jedenastu współautorów publikacji 2., ich wkład polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji, przeprowadzaniu badań, walidacji wyników, weryfikacji danych, preparatyce, wykonaniu chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, redagowaniu tekstu i pozyskaniu finansowania. Na tej podstawie stwierdzam, że wkład Doktoranta w prowadzenie badań oraz przygotowanie publikacji jest znaczący, aczkolwiek trudno ocenić jego skalę, biorąc pod uwagę liczbę współautorów i zakres zadeklarowanego przez nich wkładu. Na Jego wiodący udział wskazuje fakt, że jest on pierwszym autorem w obu pracach, jednak łatwiejsze w interpretacji byłoby wskazanie procentowego udziału Doktoranta w powstanie każdego z artykułów. W tym miejscu bardzo proszę o doprecyzowanie, które dokładnie etapy określenia wpływu wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych były wykonywane przez Doktoranta.

Oprócz artykułów naukowych oraz oświadczeń autora rozprawy doktorskiej i współautorów publikacji, rozprawa zawiera liczące 36 stron polskojęzyczne autorskie opracowanie, które rozpoczyna przedstawienie streszczeń, w języku polskim i angielskim, oraz spis publikacji składających się na rozprawę doktorską. Rozdział kolejny – *Wstęp*, będący syntetycznym przeglądem literatury, wprowadza czytelnika w tematykę związaną z rozprawą i prowadzi do klarownie zdefiniowanej hipotezy badawczej oraz celu i zakresu badań. Doktorant zwrócił w nim uwagę, że wisfatyna może pełnić istotną funkcję w procesie implantacji i wytwarzaniu łożyska, a mechanizmy, poprzez które może ona oddziaływać na komórki jajników, nie zostały poznane. Zakres

przedstawionych danych uważam za wystarczający do zrozumienia zasadności podjętych badań.

Szczegółowy opis materiału badawczego i stosowanej metodyki badań został zawarty w rozdziale *Materiały i Metody*. Analizę profilu transkryptomicznego i proteomicznego pod wpływem wisfatyny badano w komórkach lutealnych świni wyizolowanych w 15-16 dniu ciąży, co pokrywa się z okresem implantacji. Stosowano następujące metody badawcze: hodowle *in vitro* komórek lutealnych, analizę transkryptomu obejmująca konstruowanie bibliotek, sekwencjonowanie RNA, kontrolę jakości odczytów, analizę różnicową i funkcjonalną genów o zmienionej ekspresji, identyfikację długich niekodujących RNA i ich przewidywanych genów docelowych, analizę zdarzeń alternatywnego składania transkryptów, real-time PCR i PCR w celu walidacji wyników z analizy transkryptomicznej, analizę proteomiczną obejmującą frakcjonowanie białek metodą chromatografii cieczowej, analizę spektrometrii mas, analizę funkcjonalną danych, oraz Western blotting w celu walidacji wyników z analizy proteomicznej. Dobór metod uważam za odpowiedni do weryfikacji hipotezy badawczej i osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktoranta celów badawczych.

W kolejnym rozdziale w przejrzysty sposób opisano wyniki z odniesieniem do poszczególnych rycin i tabel w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Polskojęzyczne opracowanie zamyka podsumowanie wyników i wnioski oraz spis literatury obejmujący 57 pozycji. W moim odczuciu zabrakło kompleksowego podsumowania wyników obu prac pozwalającego stwierdzić, czy zmiany w poziomie mRNA były odzwierciedlone w zmianie poziomu białek oraz czy zmienione pod wpływem wisfatyny mRNA i białka były zaangażowane w te same procesy.

Lekturę polskojęzycznego opracowania utrudniają liczne błędy edytorskie, stylistyczne i interpunkcyjne, pozwolę sobie przytoczyć tylko kilka przykładów: „regulacja przebieg cyklu", „przypuszcza się, że wisfatyny wywiera wpływ", „paramaterach", „znajdowało się regionach", „szlak nekropoptyczny", „weryfikacje postawionych w pracy hipotezy", „reguluje komórek lutealnych" itp. Ponadto, symbole wielkości fizycznych zapisujemy bez kropek, a w języku polskim części dziesiętne piszemy po przecinku, nie zaś po kropce. Z obowiązku recenzenta chciałabym również zwrócić uwagę na braki w spisie literatury (np. brak zacytowanej pozycji Andrews 2010) oraz brak konsekwencji w przyjętej konwencji cytacji prac (np. w podrozdziale 3.3.2).

Podsumowując, **dysertacja zawiera wszystkie ustawowo i zwyczajowo wymagane elementy w rozprawach doktorskich, a tym samym spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.**

Ocena wartości merytorycznej rozprawy:

Celem rozprawy doktorskiej mgr. Kopija była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że wisfatyna, hormon o działaniu plejotropowym, uczestniczy w kontroli funkcjonowania jajników poprzez regulację ekspresji genów oraz białek w komórkach lutealnych świni domowej w okresie implantacji. W ramach weryfikacji tej hipotezy Doktorant zaplanował dwa zadania badawcze. Pierwsze zadanie badawcze obejmowało określenie wpływu wisfatyny na transkryptom i spliceosom komórek lutealnych wyizolowanych w 15-16 dniu ciąży. Zakres tego zadania obejmował analizę genów o zmienionych profilach ekspresji, długich niekodujących RNA oraz zdarzeń alternatywnego składania transkryptów przy użyciu metody sekwencjonowania następnej generacji. Wyniki tego zadania zostały przedstawione w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy. Drugie zadanie badawcze dotyczyło określenia wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych wyizolowanych w 15-16 dniu ciąży. Analizy przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wyniki tego zadania zostały przedstawione w drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy.

Cel pracy został klarownie sformułowany, a kompleksowe badania omiczne stanowią doskonałe uzupełnienie wcześniejszych badań zespołu. Realizacja celu naukowego dysertacji mgr. Grzegorza Kopija prowadzi do poszerzenia dotychczasowego stanu wiedzy oraz stanowi przyczynek do rozwiązania oryginalnego problemu badawczego, **spełniając tym samym wymóg, o którym mowa w art. 187 punkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce**.

Publikacje naukowe zawarte w recenzowanej rozprawie prezentują zebrane dane w sposób przejrzysty, rozsądny i krytyczny. Ich wartość merytoryczną oceniam wysoko. W **publikacji 1.**, stosując metody transkryptomiczne wraz z odpowiednią walidacją, wykazano, że wisfatyna pełni ważną rolę w regulacji funkcji komórek lutealnych, regulując ekspresję genów, których produkty zaangażowane są w takie procesy jak steroidogeneza, proliferacja, angiogeneza, procesy zapalne, regulacja cyklu oraz migracja i adhezja komórek. W **publikacji 2.**, analizując profil proteomiczny komórek lutealnych poddanych działaniu wisfatyny, wykazano, że hormon ten, poprzez regulację ekspresji odpowiednich białek, może być zaangażowany w procesy steroidogenezy, lipogenezy, cholesterologenezy oraz regulacji szlaku insulinowego. Ponadto wisfatyna regulowała ekspresję białek związanych z procesami proliferacji, apoptozy, angiogenezy i różnicowania komórek, jak również przebudowy tkanek. Powyższe prace stanowią logiczną całość, są napisane zrozumiale i zawierają szczegółowy opis metod, wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusję. Obejmują, w moim odczuciu, badania

ważne z punktu widzenia dyscypliny nauki biologiczne. Zastosowanie wysokoprzepustowych metod pozwoliło na kompleksowe scharakteryzowanie zmian zachodzących w komórkach lutealnych w obecności wisfatyny, poprzez wskazanie określonych genów, procesów i szlaków regulacyjnych, na które może wpływać ta adipokina. Są to wyniki ciekawe i nowatorskie.

Podsumowując, uważam, że zamierzony cel badawczy został osiągnięty. Wyniki zaprezentowane w rozprawie są wartościowe i znacząco poszerzają wiedzę na temat roli adipokin w regulacji procesów związanych z rozrodem, wskazując, że wisfatyna może być istotnym czynnikiem regulującym procesy rozrodcze i prawidłowe funkcjonowanie jajników w okresie implantacji, a tym samym wpływać na prawidłowy przebieg wczesnej ciąży. Uzyskana wiedza może w przyszłości pozwolić na wykorzystanie wisfatyny w terapiach związanych z leczeniem zaburzeń rozrodu. Ocena merytoryczna rozprawy, a zwłaszcza krytyczne dyskusje przedstawione w publikacjach, pozwalają na stwierdzenie, że mgr Kopij prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną dotyczącą omawianego problemu badawczego oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, **spełniając tym samym wymagania, o którym mowa w art. 187 punkt 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce**.

Pytania:

1. Podczas analizy nie wykazano statystycznie istotnych interakcji między genami o zmienionej ekspresji (DEGs) a długimi niekodującymi RNA o zróżnicowanej ekspresji (DELs). Jak można wytłumaczyć to zjawisko i jaki w takim razie był cel analizy interakcji pomiędzy DELs a ich genami docelowymi, skoro geny te nie miały zmienionej ekspresji? Czy Doktorant może zaproponować wyjaśnienie, dlaczego analiza interakcji między lncRNAs a ich docelowymi mRNA przedstawiona na Figurze 7 b i c w publikacji 1 nie wykazała oczekiwanych rezultatów? Czy istnieją inne czynniki, które mogłyby wpływać na te wyniki?

2. Jakie dodatkowe analizy Doktorant mógłby zaproponować jako kontynuację badań?

Inne uwagi:

1. W polskojęzycznym opracowaniu w opisie zwierząt doświadczalnych na stronie 17 autor pisze, że „dzień po inseminacji określono jako pierwszy dzień ciąży", a w zdaniu poprzednim, że „krycie następowało naturalnie". Proszę o sprecyzowanie, czy zapłodnienie odbywało się poprzez krycie naturalne, czy inseminację sztuczną.

2. Doktorant w wielu miejscach używa określenia „ekspresja genów i białek". Pojęcie ekspresja genów odnosi się do procesu, w którym informacja z genu jest używana do syntezy funkcjonalnego produktu, którym może być zarówno

mRNA jak i białko. Sugerowałabym raczej użycia określenia „ekspresja genów na poziomie transkryptów i białek".

3. Również w polskojęzycznym opracowaniu na stronie 34, w podsumowaniu wyników Doktorant używa określenia „funkcje komórek lutealnych i jajników". Komórki lutealne są częścią jajnika, więc sformułowanie to nie jest poprawne.

4. Proszę o wyjaśnienie, co oznacza kolor szary na figurze 4 w publikacji 1, ponieważ obecny opis figury jest niejasny i sprzeczny z przedstawioną na figurze skalą kolorymetryczną.

Ocena końcowa:

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Grzegorza Kopija stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dostarczając nowych informacji mających znaczący wkład w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy z zakresu biologii rozrodu, będących podstawą do planowania i kontynuowania zapoczątkowanych badań. Uwagi przedstawione w niniejszej recenzji nie wpływają na merytoryczną wartość pracy. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym **wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr. Grzegorza Tomasza Kopija do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Kraków 26.08.2024

Katarzyna Knapczyk-Stwora