

Olsztyn, 5.06.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Sachajko
pod tytułem**

Dietary effect of polyunsaturated fatty acids on the porcine liver by analyzing the differential gene expression and weighted gene co-expression network analysis of miRNA data in Polish Landrace and Polish Landrace x Duroc pigs

Wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie na wątrobę świń poprzez analizę zróżnicowanej ekspresji genów oraz analizę sieci ważonej koekspresji genów danych miRNA u świń rasy polskiej białej zwislouchej i krzyżówki polskiej białej zwislouchej z duroc

Recenzję wykonano na zlecenie Dziekan Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pismem z dnia 25 kwietnia 2023r.

Ocena tematyki pracy

Na całym świecie wieprzowina jest jednym z najczęściej spożywanych mięs, co czyni świnie (*Sus scrofa*) ważnym gatunkiem zwierząt gospodarskich i ważnym źródłem białka i kwasów tłuszczowych w diecie człowieka. Wieprzowina jest bogata w nasycone kwasy tłuszczowe (SFA), jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) i wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA). Kwas oleinowy, omega-9 (OA, C18:1 cis 9; n-9); kwas linolowy, omega-6 (LA, C18:2 cis 9, 12; n-6); i kwas α -linolenowy, omega-3 (ALA, C18:3 cis-9, 12, 15; n-3) to niektóre z nienasyconych kwasów tłuszczowych, które przynoszą korzyści dla zdrowia człowieka (Zhang i in. 2016). Na przykład MUFA, które są obecne w oliwie z oliwek i oleju rzepakowym, są syntetyzowane w organizmie człowieka i pomagają w profilaktyce chorób układu krążenia.

Wątroba jest centralnym narządem metabolicznym i odgrywa kluczową rolę w ekspresji genów regulowanej przez kwasy tłuszczowe, przy czym PUFA są głównymi regulatorami ekspresji genów kodujących enzymy lipogeniczne w wątrobie. Wiemy już, iż zmiany w równowadze metabolicznej szlaków lipidowych w wątrobie i rozregulowanie kontroli energii prowadzą do stanów patologicznych, takich jak cukrzyca, otyłość i zespół metaboliczny. Ponadto, niektóre składniki odżywcze oraz sygnały hormonalne i neuronalne są odpowiedzialne za regulację metabolizmu lipidów, glukozy i aminokwasów w wątrobie. Aby lepiej zrozumieć wpływ pożądanых kwasów tłuszczowych na zdrowie zwierząt i ludzi od niedawna prowadzi się intensywne badania omiczne nad szlakami związanymi z metabolizmem lipidów (np. Fanalli i in. 2023), wiążącymi ich wyniki z ważnymi cechami fenotypowymi (np. Davoli i in. 2018). Warto tu dodać, iż świnie są uważane za zwierzęta

modelowe do badań naukowych na ludziach, ponieważ wiele aspektów ich fizjologii jest bardzo podobnych do ludzkich.

Należy stwierdzić zatem, że zagadnienie bioinformatycznego opracowania wpływu diety omega-6 i omega-3 na transkryptom mikro RNA w wątrobie u świń rasy polskiej białej zwislouchej (PL) i krzyżówki rasy polskiej białej zwislouchej x Duroc (PL x Duroc), podjęte w rozprawie doktorskiej przez Pana mgr Mateusza Sachajko jest aktualne i mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Aby wypełnić lukę w wiedzy o wpływie diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe omega-6 i omega-3 na ekspresję genów mikro RNA świń PL i PL x Duroc za cele niniejszej pracy Doktorant przyjął:

- Zbadanie profilu ekspresji mikro RNA w wątrobie świń rasy polskiej białej zwislouchej (PL) i krzyżówki rasy polskiej białej zwislouchej x Duroc (PL x Duroc), oraz wariantów żywieniowych (karmienie dietą uzupełniającą wzbogaconą w kwasy tłuszczowe omega-6 i omega-3 (PUFA)). Doktorant zastosował porównawczą analizę ilościową i jakościową transkryptów mikro RNA o zróżnicowanej ekspresji (DEG) na podstawie danych z sekwencjonowania następnej generacji (Illumina MiSeq).
- Zbadanie korelacji między ko-ekspymowanymi miRNA a cechami fenotypowymi, w tym identyfikacja istotnych genów miRNA powiązanych z cechami. Tutaj, Autor przeprowadził porównawczą analizę modułów związanych z cechami hodowlanymi *a priori* (WGCNA).
- Zbadanie dieto-zależnych sieci ekspresji genów mikro RNA w modułach specyficznych dla danej cechy u świń PL i PL x Duroc.

Ocena formalna pracy

Recenzowana rozprawa doktorska, wydana w formie monografii napisanej w języku angielskim, liczy 217 stron, zawiera 79 rysunków i 64 tabele. Zamieszczone w pracy rysunki, w tym diagramy Venna, mapy ciepłe, dendrogramy, wizualizacje sieci oddziaływań molekularnych, są w miarę czytelne (główny problem to różnej wielkości czcionki i ich kolory) i poza jednym (Rys. 1) ilustrują założenia i wyniki badań własnych przeprowadzonych przez Doktoranta. Tabele wnoszą dużo ciekawych informacji, jednak przygotowane są dość chaotycznie a ich nagłówki są często bardzo lakoniczne i nierzadko wprowadzają w błąd czytelnika. Spis literatury liczy 206 pozycji; cytowane piśmiennictwo jest ściśle związane z tematyką rozprawy, jest dobrze wykorzystane do opisu stosowanych metod i ma kluczowe znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników. Układ rozprawy jest klasyczny z podziałem na część literaturową i analityczną, t.j. *Abstract* z polskim streszczeniem (*Abstract (PL)*), *Introduction*, *Dissertations' research objective and goals*, *Materials and Methods*, *Results*, *Discussion*, *Conclusions* i *References* z *Internet sources*. Wymienione części pracy poprzedzają *Acknowledgments* i *Table of content*. Edycja pracy jest dość staranna, napisana jest ona poprawnym językiem. Zdarzają się jednak w tekście czasowniki frazowe, *phrasal verbs*, np. ...were filtered out..., których powinno się unikać w

tekstach formalnych, takich jak rozprawa doktorska. Moją uwagę skupiło też zaniechanie informowania czytelnika o formie badanych mikro RNA, tak, że niejednokrotnie nie mamy pewności, czy opis dotyczy genu kodującego dany mikro RNA, czy jest to niedojrzały mikro RNA (pre-miRNA), czy dojrzały mikro RNA. Także bardzo liczne powtórzenia treści zawartych w tabelach i na rysunkach, w opisujących je akapitach rozprawy (głównie w sekcji *Results*) nie ułatwiają lektury tekstu. Na przykład, w akapicie 4.4.1 wymieniono po kolei 38 terminów z listy ontologii genowych, wywnioskowanych dla miRNA ulegających ko-ekspresji (miRNA-gen targetowy) o najwyższych zależnościach w module czarnym, dokładnie takich samych i w tej samej kolejności jak na odpowiadającym temu wynikowi badania rysunkowi nr 53.

Ocena merytoryczna pracy

Przystępując do analizy dysertacji oczekiwałem pewnej opowieści, która opisując obecny stan wiedzy w tym niewątpliwie ciekawym temacie badań będzie stopniowo implikować działania naukowe Doktoranta. Pan mgr Mateusz Sachajko część 1, *Introduction*, rzeczywiście rozpoczął od krótkiego omówienia budowy i funkcji lipidów, budowy i funkcji wybranych kwasów tłuszczowych. Tuż za tym wstępem (moim zdaniem zbyt wcześnie), Doktorant zaproponował 4 hipotezy badawcze które są bardzo ogólnie sformułowane (*PUFA będą miały wpływ na ekspresję wątrobowych mikro RNA a niektóre z nich mogą okazać się przydatne w optymalizacji żywienia świń*), co jest niestety typowe w pracach badających różnorodne „-omy”, dobrze natomiast wpisują się w obszar badań nutrigenomicznych świń. W kolejnych akapitach Doktorant przedstawia najważniejsze informacje w powiązaniu do tematu rozprawy doktorskiej (1.2), między innymi omawia rolę świni jako modelu badań nutrigenomicznych, przywołuje najważniejsze informacje o wysokoprzepustowych technikach sekwencjonowania z uwzględnieniem miRNA-seq, w (zbyt) telegraficznym skrócie omawia klasę mikro RNA (wśród krótkich niekodujących RNA). Moim zdaniem, ta część powinna zawierać informacje dotyczące form mikro RNA obecnych w komórkach (pri-, pre-, dojrzałych) oraz krótki opis ich biogenezy. Ostatnią część stanowi lista zadań do wykonania w pracy, które w jasny sposób definiują obszar badań objęty rozprawą.

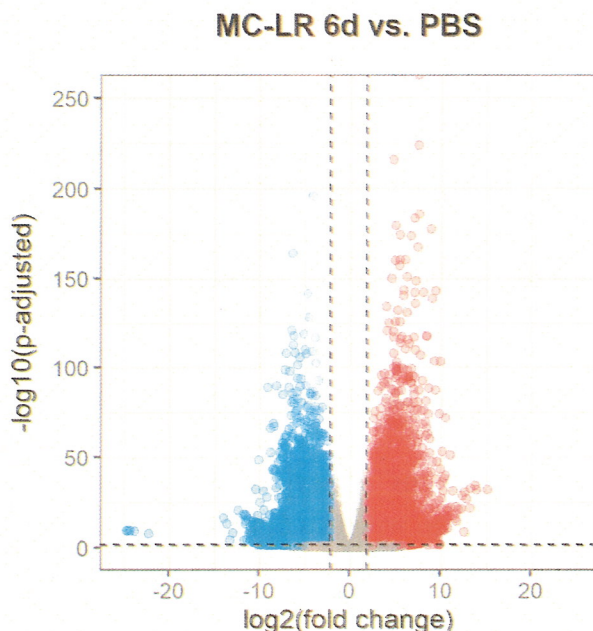
Niestety, nigdzie w pracy nie znalazłem wyjaśnienia, dlaczego obiektem badań ukierunkowanych na poznanie podłoża molekularnego efektów wywoływanych przez badane kwasy PUFA w wątrobie świni ma być transkryptom mikro RNA. Dla mnie było to na tyle zaskakujące, iż niecierpliwie czekałem na odpowiedź, na ile wiarygodne do rozstrzygnięcia hipotez może być oparcie się na stwierdzonej za pomocą metod bioinformatycznych ko-ekspresji genów targetowych w oparciu o ekspresję mikro RNA, gdy reaktom zmienia się tak dynamicznie. System kontroli ekspresji genów mikro RNA na poziomie transkrypcji i jej wpływu na ekspresję mRNA i białka, obejmuje przecież szereg mechanizmów, znanych dla genów eukariotycznych. Do najważniejszych zaliczam regulację przez elementy działające w układzie *cis*, czynniki transkrypcyjne, ko-aktywatory i ko-represory białkowe a także modyfikacje epigenetyczne prowadzące do zmiany struktury chromatyny. Co więcej, ekspresja genów miRNA może podlegać kontroli przez same mikro RNA.

W rozdziale 3, *Material and Methods*, Autor przedstawia najważniejsze informacje metodyczne. Do realizacji poszczególnych celów pracy Pan Mateusz Sachajko wykorzystał próbki wątroby pozyskane wcześniej przez zespół dra Szostaka. Autor dysertacji powołuje się tutaj na publikacje z roku 2016 i 2020; niestety ta ostatnia pozycja nie widnieje w spisie literatury. O ile wysoko oceniam podjęcie się zadania w oparciu o już zdobyte materiały i praktycznym zastosowaniu Zasady 3R, o tyle niewątpliwie słabą stroną tej części pracy jest brak informacji o kryteriach wyboru próbek oraz ich charakterystyk. Do nich zaliczyłbym masę świń, od których pobrano skrawki wątroby, płeć, lokalizację biopsji w płatach wątroby (niejednokrotnie notuje się różnice nie tylko w zawartości tłuszczu między płatami wątroby, ale także profilami ekspresji genów), sposób długoterminowego przechowania próbek, tak ważny dla powodzenia prac z kwasami rybonukleinowymi. Takie dane niewątpliwie wzbogaciłyby opis wyników a w przyszłości stanowiłyby poszukiwane źródło informacji do wykorzystania w porównawczych analizach nutrigenomicznych.

W obszernym podrozdziale 3. 3, *Experimental design of NGS-based miRNA-Seq experiment*, Autor informuje o wybranym przez siebie zestawie analiz bioinformatycznych do wnioskowania na temat profili mikroRNA w wątrobie świni: DEGs to badania ilościowe i jakościowe miRNA o zróżnicowanej ekspresji, powszechnie stosowane w tego typu zadaniach, natomiast WGCNA, to analiza sieci korelacji, której użycie ułatwić ma zrozumienie praktycznego znaczenia uzyskanych wyników dla hodowli. Zgrabnie kontynuując ten wątek Pan mgr Sachajko skupia się na opisie procedur laboratoryjnych i badawczych, niezbędnych dla powodzenia projektu. W tej części opisu zabrakło mi tabeli informującej o wartości wskaźnika RIN we wszystkich badanych próbach (podrozdział 3.3.2.1; można te dane umieścić w Tabeli 1), wyjaśnienia sformułowania „poor quality” i wartości odcięcia dla sekwencji w uzyskanych w 12 plikach FastQC (wykresy podsumowujące surowe dane i tabele załatwiłyby sprawę). Co więcej, uważam, że wszystkie dane sekwencjonowania NGS, powinny być zdeponowane w NCBI Sequence Read Archive (*SRA*) przed opublikowaniem rozprawy/artykułu. Ułatwiłoby to znacznie ocenę jakości uzyskanych danych sekwencjonowania. Doceniając wiedzę zgromadzoną w tym rozdziale przez Doktoranta należy żałować, że zabrakło tutaj informacji wyjaśniających sens niektórych porównań międzygrupowych w analizie DEG. O ile porównania wariantów żywieniowych w ramach jednej rasy oraz tego samego wariantu żywieniowego w dwóch różnych rasach są uzasadnione, o tyle nie rozumiem celu porównania profili mikro RNA wątrób PL x Duroc żywionych paszą eksperymentalną i rasy PL żywionej paszą standardową. W tej części pracy zauważyłem także niefortunny opis kryterium uznania obserwowanych różnic za istotne statystycznie. Na przykład, na stronie 36 jest zapis *Every functional group pathway discovered were filtered out if the p-value after Bonferroni correction was less than 0.05*, sugerujące iż tylko te grupy szlaków wykazujące $p \geq 0.05$, uznać na leży za istotne, co jest nieprawdą. Podobne zapisy mona spotkać jeszcze kilka razy w tekście.

„Results” to czwarty rozdział zestawiający rezultaty badań Doktoranta, pogrupowane w 4 zagadnienia badawcze, odnoszące się do (i) analizy DEG, (ii) analizy WGCNA, (iii) mapowania genów miRNA do zdefiniowanych modułów, oraz (iv) wizualizacje sieci oddziaływań molekularnych. Autor cierpliwie i dokładnie prowadzi czytelnika przez kolejne analizy, załączając tabele, diagramy Venna, mamy cieplne i sieci powiązań. Szkoda, że dane zestawione w oddzielnych tabelach są trudne do porównania, najczęściej z powodu

nieprecyzyjnego opisu w nagłówku (czasem z opisu tabeli nie wynika, którego porównania dotyczy tabela) a także zmieniającej się liczby kolumn i przedstawianych danych. Zdarza się, że w jednej tabeli geny nazywane „upregulated”, mają dodatnie \log_2FC a w następnej wartości ujemne. Problem ten można by rozwiązać stosując symbol wartości bezwzględnej, jak w legendzie Rysunku 1.



Rys. 1. Poziom ekspresji mRNA genów w wątrobie siei (*Coregonus lavaretus*, L.) po 6 dniach dootrzewnowej ekspozycji na mikrocystynę-LR w dawce 100 ug/kg w porównaniu (relatywnie) do grupy kontrolnej (PBS; iniekcja buforem fosforanowym), wytypowanych na podstawie analizy w programie DESeq2 (Love i in. 2014). Wykres przedstawia krotność-zmiany poziomu mRNA (oś x) w zależności od poziomu jej istotności (oś y). Linie przerywane wyznaczają wielkość i istotność statystyczną zmiany, które uznano za znaczące (odpowiednio, $|\text{fold change}| > 2$ oraz $p\text{-adjusted} < 0.05$). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja mRNA uległa znaczącemu wzrostowi/podniesieniu, natomiast kolorem niebieskim oznaczono geny, których ekspresja mRNA uległa znaczącemu spadkowi (Woźny i in. nieublikowane).

Nie mam też pewności czy prawdopodobieństwo p_{adj} raportowane dla każdego genu w niektórych tabelach jest w istocie stosowanym wskaźnikiem FDR- adjusted p-value (False Discovery Rate), który pozwala lepiej skorygować wyniki testów wielokrotnych, biorąc pod uwagę listę niezależnych wartości p, wskazując oczekiwaną proporcję błędów I rodzaju wśród wyników istotnych statystycznie. Jeśli tak, należałoby go nazwać q-value. Odchodząc od tego wątku, zwróciłem tutaj uwagę, iż pośród różnorodnych form krótkich RNA, w tym mikro RNA zamieszczonych w tabelach, znalazły się także długie niekodujące RNA (lncRNA), których ekspresję warto w przyszłości zweryfikować pod kątem ich funkcji biologicznej. Wielka szkoda, że na końcu każdego wątku Autor nie formułuje swojej opinii dotyczącej uzyskanego wyniku. Czasem, nawet bardzo ogólne stwierdzenie pomogłoby lepiej zrozumieć sens uzyskanych wyników.

Wyniki analizy WGCNA, mapowania genów i sieci powiązań molekularnych dostarczają szeregu nowych informacji o korelacjach zidentyfikowanych modułów z cechami

fenotypowymi, wskazują na silne powiązania pomiędzy ekspresją miRNA. Co więcej miRNA będące węzłami klastrów można uznać za kandydujące geny miRNA związane z analizowanymi cechami hodowlanymi np. barwą mięsa, grubością podskórnego tłuszczu łopatki i popiołem. Dodatkowo, miRNA ulegające koekspresji wpływają pośrednio na inne szlaki funkcjonalne, poprzez regulację ich targetów. W tej części rozprawy Doktorant identyfikuje geny docelowe dla klastrów miRNA, których funkcje wskazują na udział rozwoju układu mięśniowego, procesach rozwoju komórki i organizmu, w zaangażowanie w procesy metaboliczne, a także w rozwój tkanki mięśniowej.

Rozdział 5, „Discussion”, jest czytelny w odbiorze, podzielony na podrozdziały, odpowiadające 2 podejściom bioinformatycznym wykorzystanym w pracy. Doktorantowi udało się dokonać obszernego porównania i sformułować ważne wnioski. Wśród wyników pracy zainteresowały mnie te dotyczące porównań międzyrasowych profili mikro RNA, a przedstawionych w diagramach Venna. Wynika z nich jednoznacznie, że porównywane rasy świń różnią się istotnie między sobą repertuarem aktywnych transkrypcyjnie genów mikro RNA. Szkoda, że zabrakło tu pogłębionej analizy czynników środowiskowych/hodowlanych i/lub izolujących mechanizmów, które mogłyby tłumaczyć te różnice.

Rozprawę kończy rozdział „Conclusions”. Z wyjątkiem wniosku 1, który moim zdaniem skróconym wynikiem pracy i ważnego wniosku 6, którego treść warto dopracować, zostały one poprawnie sformułowane, mają uzasadnienie w recenzowanej pracy. We wnioskach Autor potwierdza użyteczność markerów mikro RNA w powiązaniu z wybranymi cechami hodowlanymi badanych ras świń, wskazuje też ich ważne funkcje biologiczne. Warto w przyszłości rozwinąć ten wątek i podjąć bardziej szczegółowe badania funkcjonalne nad „dostosowaniem” ras świń z zastosowaniem wysoko przepustowych analiz molekularnych (RNAseq mRNA i lncRNA, peptydomika, metabolomika). Takie zintegrowane badania pomogłyby wypełnić lukę w naszej wiedzy o mechanizmach leżących u podstaw utrzymania ich zróżnicowania genetycznego.

Uwagi krytyczne

W trakcie recenzji pracy nasunęły się następujące pytania:

1. Dlaczego nie przedstawiono szczegółowych hipotez badawczych, które Autor mógłby zweryfikować, dysponując dostępem do tak bogatego materiału?
2. Dlaczego obiektem badań ukierunkowanych na poznanie podłoża molekularnego efektów wywoływanych przez badane kwasy PUFA w wątrobie świń ma być transkryptom mikro RNA?
3. Jakimi były kryteria wyboru próbek do biopsji wątroby? Jak były one przechowywane?
4. Kariera jaką przechodzą różne markery molekularne (np. SNP) w genetyce i hodowli zwierząt pokazuje, jak osiągnięcia technologiczne (mikromacierze) i odkrycia poznawcze (sekwencjonowanie genomu), umiejętnie połączone, mogą prowadzić do rewolucyjnej zmiany w całej hodowli, poprawiając wydajność cech użytkowych. Czy w kontekście mikro RNA to stwierdzenie odnosi się także do hodowli świń?

Ocena końcowa

Pan mgr Mateusz Sachajko wykazał się dużą wiedzą w dyscyplinie nauki biologiczne, o czym świadczą wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej. Doktorant zrealizował wszystkie cele, zastosowane metody dowodzą dobrego opanowania przez Niego trudnego warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki wnoszą szereg nowych informacji dotyczących transkryptomu mikro RNA świń rasy polskiej białej zwiślouchej i krzyżówki rasy polskiej białej zwiślouchej x Duroc. Wyniki są oryginalne, a praca ma wyraźny aspekt aplikacyjny. Zamieszczone w recenzji uwagi nie umniejszają wartości przedstawionej do oceny rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana przez Pan mgr Mateusza Sachajko, spełnia w mojej opinii warunki stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne przez obowiązujące przepisy określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Paweł Brzuzan

Literatura

- Davoli et al. 2018. Anim. Genet. Doi: 10.1111/age.12646
Fannali et al. 2023. Front. Genet. 14:1053021. doi: 10.3389/fgene.2023.105302
Love et al. 2014. Genome Biology 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
Zhang et al. 2016. Sci. Rep. 6, 24718. doi: 10.1038/srep24718

