

Recenzja
rozprawy doktorskiej lek. wet. Jakuba Kulusa
pt. Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową
oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas
krótkoterminowej pierwotnej hodowli in vitro

wykonanej
w Katedrze Diagnostyki i Nauk Klinicznych
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Dziedzina nauki weterynaryjne
Dyscyplina weterynaria

pod kierunkiem dr hab. n. wet. Pawła Antosika, prof. UMK

Podstawa formalna opracowania recenzji

Recenzję przedłożonej rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria prof. dr hab. Jędrzeja M. Jaśkowskiego na podstawie Uchwały Rady Nr 14 z dnia 14 grudnia 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Jakuba Kulusa

Ocena formalna przedłożonej rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Diagnostyki i Nauk Klinicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. n. wet. Pawła Antosika, prof. UMK. Rozprawa doktorska lek. wet. Jakuba Kulusa oparta została na trzech spójnych tematycznie oryginalnych pracach naukowych opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports o wysokiej randze naukowej. Jedną pracę opublikowano w Biology (IF 5.168; 100 pkt MNiSW) w 2021 r., drugą w Cell Division (IF 2.3; 100 pkt MNiSW) w 2023 r., a trzecią w International Journal of Molecular Sciences (IF 5.6; 140 pkt MNiSW) w 2023 r.. Sumaryczny Impact Factor prac to 13.068, a łączna ich punktacja MNiSW wynosi 340. Opublikowanie prac w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu świadczy o solidności naukowej przedłożonego opracowania. We wszystkich publikacjach Doktorant figuruje jako pierwszy autor o wiodącym wkładzie w powstanie pracy, z uwzględnieniem realizacji eksperymentów i przygotowania tekstu publikacji. Prace są dziełem kolejno dwunastu, ośmiu i ponownie ośmiu współautorów, w tym pochodzących też z innych ośrodków naukowych: Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, North Carolina State University,

University Hospital and Masaryk University Brno. Badania wielośrodkowe świadczą o umiejętności Kandydata do pracy zespołowej, zwłaszcza, że współautorzy to grono interdyscyplinarne składające się z reprezentantów różnych specjalności medycznych i weterynaryjnych.

Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej:

1. **Jakub Kulus**, Magdalena Kulus, Wiesława Kranc, Karol Jopek, Maciej Zdun, Małgorzata Józkowiak, Jędrzej M. Jaśkowski, Hanna Piotrowska-Kempisty, Dorota Bukowska, Paweł Antosik, Paul Mozdziak, Bartosz Kempisty: Transcriptomic profile of new gene markers encoding proteins responsible for structure of porcine ovarian granulosa cells. *Biology*, 2021, Vol. 10, nr 11, art. nr 1214, DOI: 10.3390/biology10111214
2. **Jakub Kulus**, Wiesława Kranc, Magdalena Kulus, Piotr Dziegiel, Dorota Bukowska, Paul Mozdziak, Bartosz Kempisty, Paweł Antosik: Expression of genes regulating cell division in porcine follicular granulosa cells. *Cell Division*, 2023, Vol. 18, p. 1–22. DOI: 10.1186/s13008-023-00094-7.
3. **Jakub Kulus**, Wiesława Kranc, Magdalena Kulus, Dorota Bukowska, Hanna Piotrowska-Kempisty, Paul Mozdziak, Bartosz Kempisty, Paweł Antosik; New Gene Markers of Exosomal Regulation Are Involved in Porcine Granulosa Cell Adhesion, Migration, and Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, Vol. 24, nr 14, art. nr. 11873, DOI: 10.3390/ijms241411873

Na pracę doktorską, oprócz wymienionych publikacji, składa się syntetyczne opracowanie napisane w języku polskim opisujące zakres realizowanych badań zawierające: wykaz skrótów, wprowadzenie do obszaru badań, cele badań, opis materiału i metod, wyniki i dyskusja, podsumowanie, wnioski wynikające z prowadzonych badań, piśmiennictwo zawierające 130 pozycji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Taką formę rozprawy dopuszcza art.187 ust. 3 ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. oraz wytyczne Rady Doskonałości Naukowej (Komunikat 19/2020 z dnia 9 listopada 2020 r.).

Tematyka rozprawy

Praca jest próbą wyjaśnienia mechanizmów regulujących czynnością komórek ziarnistych na poziomie molekularnym z zastosowaniem zaawansowanych metod badań genetycznych. Analiza przebiegu folikulogenezy, rozwoju pęcherzyków jajnikowych, mechanizmu owulacji oraz formowania ciałek żółtych jest kluczowa dla zrozumienia interakcji zaangażowanych w te procesy czynników regulujących. Wyjaśnienie mechanizmów regulujących w tym obszarze może umożliwić w przyszłości wypracowanie markerów prawidłowego przebiegu cyklu jajnikowego, biomarkerów przydatności gonad do technik wspomaganego rozrodu, diagnostyki stanów patologicznych jajnika oraz być może okaże się pomocne w opracowaniu metod terapii patologii jajników takich jak zespół jajników policystycznych (PCOS) oraz przedwczesnej niewydolności jajników (POI). Praca w tym kontekście posiada zatem znaczenie zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym - klinicznym. Dysertacja obejmuje szeroką analizę ekspresji wielu genów i próby wyselekcjonowania tych, które odgrywają rolę w regulacji komórek ziarnistych. Autor prowadził hodowlę krótkoterminową in vitro komórek ziarnistych i w kolejnych punktach czasowych badał dynamikę zmian ekspresji genów. Zastosował metody mikromacierzy ekspresyjnych co umożliwiło zbadanie transkryptomu komórek ziarnistych w określonych przedziałach czasowych. Pomysł na prowadzenie tego typu badań jest kreatywny i nowatorski.

Przybliża nas być może nieco do opracowania w przyszłości innowacyjnych i skutecznych metod diagnostyki i terapii patologii jajnika.

Podsumowując, tematyka pracy jest aktualna dla reprezentowanej Dyscypliny i ciekawa zarówno w kontekście poznawczym, jak i aplikacyjnym oraz posiada walor nowatorstwa i potencjał aplikacyjny.

Ocena merytoryczna

W ogólnym Wprowadzeniu Autor zbudował ciekawy i szczegółowy opis stanu wiedzy w obszarze badań będącym przedmiotem opracowania. Krok po kroku wyjaśnia zjawiska zachodzące podczas rozwoju pęcherzyków jajnikowych. Opisuje interakcje najważniejszych elementów konstytuujących pęcherzyk jajnikowy tj. komórek ziarnistych, oocytu, macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), cytoszkieletu oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Wskazuje, iż poznanie mechanizmów tych interakcji może być pomocne w analizie przyczyn niepłodności typu PCOS i POI, we wdrażaniu technik wspomagania rozrodu oraz w badaniach nad medycyną regeneracyjną. Opis ten zbudowany jest bardzo dobrze. Posiada odpowiednią długość i jest bardzo klarowny. Autor krok po kroku tłumaczy poruszane zjawiska. Zaczynając od podstaw wciąga czytelnika w przystępną opowieść o różnych aspektach regulacyjnych na poziomie molekularnym. Na pochwałę zasługuje ogromna wiedza Autora i umiejętność posługiwania się językiem naukowym. Wprowadzenie pracy uważam za niezmiernie interesujące i fachowe opracowanie. Jest ono warte opublikowania jako praca przeglądowa w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej.

Autor stawia tezę naukową, która była inspiracją do przeprowadzenia badań. Interakcje ECM, cytoszkieletu i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórkach ziarnistych wpływają na ich prawidłowe funkcjonowanie w zakresie sygnalizacji międzykomórkowej, adhezji, proliferacji, migracji i podziału. Mechanizmy te nie są dotychczas poznane na poziomie molekularnym, a ich poznanie może dać podstawy do zrozumienia patofizjologii schorzeń jajnika.

W oparciu o tezę Doktorant formułuje jasno cele pracy. Nadrzędnym celem badań było określenie profilu ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za sygnalizację międzykomórkową i tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cytoszkieletu w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni, w trakcie ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*.

Celami szczegółowymi były:

1. Badanie ekspresji wybranych genów biorących udział w steroidogenezie komórek ziarnistych jajnika świni w warunkach *in vitro*.
2. Typowanie ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w integracji środowiska zewnątrz i wewnątrzkomórkowego komórek ziarnistych jajnika świni w hodowli *in vitro*.
3. Wytypowanie genów, które mogą być uznane w przyszłości za nowe markery folikulogenezy u świni domowej.

Cele pracy sformułowane są poprawnie a ich realizacja, posiada jak zaznaczono wcześniej potencjał poznawczy i aplikacyjny.

Wg opisu badań materiał badawczy stanowiły jajniki pozyskane poubojowo od 120 dojrzałych płciowo loszek świni domowej o średniej masie ciała 105 kg i wieku ok. 6 miesięcy. Wedle publikacji cyklu były to loszki rasy Landrace (publikacja 1 i 2) a mediana ich masy ciała wynosiła 98 kg (wszystkie publikacje). Podano dane o badaniu klinicznym loch, jednak nie podano danych, czy wewnętrzne części narządu płciowego nie wykazywały anomalii.

Płyn pęcherzykowy aspirowano do strzykawek. Poprzez wirowanie i wykorzystanie enzymów proteolitycznych typu kolagenaza izolowano frakcję komórek ziarnistych i zakładano hodowlę. W badaniach wyznaczono przedziały czasowe 0 godz. (wartość referencyjna), 48 godz., 96 godz. i 144 godz. Hodowle in vitro zamykano w założonych przedziałach czasowych a z komórek izolowano całkowity RNA. W celu oceny transkryptomu komórek ziarnistych w badaniach wykorzystano metodę mikromacierzy ekspresyjnych Affymetrics® Porcine Gene 1.1 ST Array Affymetrics. Ponadto w oparciu o bazy danych genów i ich produktów białkowych przeprowadzono analizę funkcjonalną. Za pomocą metod statystycznych opracowano listę genów ulegających zróżnicowanej ekspresji i wprowadzono je do oprogramowania DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery), co pozwoliło na uzyskanie grup ontologicznych genów GO MF (Gene Ontology Molecular Function). Dane dotyczące ekspresji poddano klasteryzacji hierarchicznej pozwalającej na generowanie mapy zmienności ekspresji genów (mapy ciepłne - heatmaps). Wzajemne relacje dotyczące wybranych grup genów zostały zbadane z wykorzystaniem pakietu GOplot. Zbadano ponadto interakcje pomiędzy genami i kodowanymi przez nie białkami oraz funkcjonalne interakcje między genami należącymi do wybranych GO BP (GO Biological Processes). W celu walidacji wyników otrzymanych z mikromacierzy ekspresyjnych przeprowadzono ilościową łańcuchową reakcję polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT qPCR).

Metodyka przyjęta w badaniach jest niezwykle zaawansowana. Jest to analiza transkryptomyczna pogłębiona o zintegrowaną statystykę i narzędzia inteligentnego opisu wyników z wykorzystaniem Gene Ontology.

W pierwszym etapie badań analizie poddano ekspresję genów związanych z tworzeniem ECM oraz kodujących białka transbłonowe (integryny i kadheryny) odpowiadających za sygnalizację międzykomórkową. Za pomocą metody mikromacierzy ekspresyjnych wyodrębniono 3380 genów o zróżnicowanej ekspresji. W oparciu o mapy ciepłne (heatmaps) profili transkryptomicznych genów dla poszczególnych grup ontologicznych wykazano zmiany ekspresji w trakcie prowadzenia hodowli. Wytypowano 20 genów wykazujących największą zmienność ekspresji – 10 genów z najbardziej podwyższoną ekspresją i 10 genów z najsilniej obniżoną ekspresją. Są to kolejno m.in. POSTN, ITGA2, FN1, LAMB1, ITGB3, CHI3LI, PCOLCE2, CAV1, DCN, COL14A1 i SPP1, IRS1, CNTLN, TMPO, PAICS, ANK2, ADAM23, ABI3BP, DNAJB1, IGF1. Geny te i ich produkty białkowe odgrywają istotną rolę w licznych procesach i ścieżkach sygnalizacyjnych w obrębie pęcherzyka jajnikowego, w tym w tworzeniu ECM wpływającej dynamicznie na procesy fizjologiczne lub patologiczne w obrębie jajnika. Wiele czynników, dla których stwierdzono w prowadzonych badaniach podwyższoną ekspresję w tym dekoryna (DCN), fibronektyna (FN1) kaweolina (CAV-1) intgryny (ITGA2, ITGB3) wykazuje liczne istotne funkcje w jajniku. Są zaangażowane w proces folikulogenezy, owulacji, luteinizacji, steroidogenezy, remodeling tkanki włóknistej, kompozycje i funkcję ECM. Zaburzenia ich funkcjonowania i interakcji prowadzić mogą do patologii typu PCOS i POI. Mają również potencjał jako biomarkery stanów patologicznych i technik wspomagania rozrodu. Wyniki tych badań mogą być przydatne w kontekście terapii celowanej patologii jajnika. Wytypowanie markerów genetycznych określonych chorób stwarza możliwość wyciszenia lub zmiany ich ekspresji. Z drugiej strony wykorzystanie biomarkerów może być pomocne w diagnostyce patologii rozrodu oraz w typowaniu materiału do technik wspomagania rozrodu. Jest to nowoczesna i bardzo zaawansowana praca, która leży w nurcie perspektywicznych badań biologicznych z wysokim potencjałem klinicznym i poprzez to wpisuje się w wyzwania stawiane współczesnej biologii, medycynie i weterynarii.

Drugi etap badań polegał na analizie ekspresji genów biorących udział w tworzeniu cytoszkieletu i podziale komórkowym oraz interakcjach między środowiskiem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym. Przeanalizowano zróżnicowanie ekspresji tysięcy genów należących do 12 grup ontologicznych powiązanych z badanym obszarem funkcji. Wykazano ogólną

tendencję do wzrostu poziomu ekspresji genów podczas trwania hodowli (oprócz grup powiązanych z segregacją chromosomów i punktami kontrolnymi podziału komórkowego). Po raz pierwszy wykazano ekspresję genu kalponiny (CNN1) w komórkach ziarnistych świni. Ponadto podwyższona ekspresję odnotowano w odniesieniu do następujących genów powiązanych z cytoszkieletem i ECM: tropomiozyna (TPM2), aktynina (ACTN1), gelsolina (GSN), kolagen (COL14A1, COL3A1, PCOLCE2). Badania te potwierdziły udział cytoszkieletu w podziałach, proliferacji i sygnalizacji międzykomórkowej poprzez wpływ na ścieżki sygnalizacyjne regulujące skład i czynność ECM. Zaburzenie tych ścieżek może prowadzić do stanów patologicznych. Podobnie zatem jak w pierwszym etapie badań wyniki te mają potencjał aplikacyjny.

W trzecim etapie badań skupiono się na analizie ekspresji genów związanych z migracją, adhezją, i proliferacją komórek ziarnistych. Wykazano w tym zakresie podwyższoną ekspresję genów należących do grupy ontologicznej „vesicle – mediated transport”. Świadczy to o dużej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w sygnalizacji międzykomórkowej komórek granulocyty. Stwierdzono m.in. wysoką ekspresję MXRA5 (matrix remodelling associated 5) i FMOD (fibromodulin) o własnościach remodelujących ECM. Stwierdzono ponadto wysoką ekspresję oksydazy lizylowej (LOX). Gen LOX bierze udział w różnicowaniu komórek pluripotencyjnych oraz w steroidogenezie i patogenezie policystycznych jajników. Wg Autora gen ten może stać się markerem stanów patologicznych jajnika i steroidogenezy. W badaniach po raz pierwszy wykazano w komórkach ziarnistych świni ekspresję genu lipazy endotelialnej (LIPG, EL) kluczowej dla steroidogenezy. W tym zakresie stwierdzono ponadto wysoką ekspresję genów hydroksysteroidu HSD3B1 i niską HSD17B1. Również i tu uzyskane wyniki wzbogacają naszą wiedzę na temat zjawisk fizjologicznych powiązanych z folikulogenezą i mają potencjał aplikacji w przyszłości w praktyce klinicznej medycyny i weterynarii. Ingerencja w poziom ekspresji poszczególnych genów może mieć nieocenione znaczenie w aspekcie możliwości sterowania steroidogenezą i dojrzewaniem pęcherzyków i ciałek żółtych.

W dysertacji przedstawiono jasny syntetyczny opis prowadzonych badań i uzyskanych rezultatów. Po opisie tym przedstawiono krótkie Podsumowanie wyników, które w kilkunastu zdaniach obrazuje logikę tych badań, dowodzi o zrozumieniu przez Doktoranta ich tła i kontekstu klinicznego oraz świadczy o umiejętności prostego wiązania faktów i dogłębnego zrozumieniu omawianych zagadnień. Podsumowanie sformułowane jest jasno i przystępnie. Autor wybrał z ogromu udowodnionych zależności zagadnienia najważniejsze i/lub te, które posiadają walor poznawczy i mogą posiadać znaczenie aplikacyjne w przyszłości. Bardzo cenię tę część tekstu.

Po podsumowaniu Autor formułuje wnioski szczegółowe:

1. Podwyższona ekspresja *CAV-1*, genu regulującego proces egzocytozy, świadczy zarówno o dynamicznych zmianach składu ECM, jak i intensywnej sygnalizacji międzykomórkowej w komórkach ziarnistych utrzymywanych w warunkach krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*.
2. Wykazana po raz pierwszy w niniejszej pracy ekspresja genu *CNN-1* w komórkach ziarnistych świni, który odpowiedzialny jest za strukturę cytoszkieletu i transdukcję sygnału, może sugerować jego istotną rolę w tworzeniu i funkcjonowaniu mikrośrodowiska komórek ziarnistych hodowanych w warunkach *in vitro*.
3. Zmiany w profilu ekspresji genów *HSD17B1* oraz *HSD3B1* mogą oznaczać indukcję procesu steroidogenezy w komórkach ziarnistych utrzymywanych w warunkach krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*.
4. Indukcja ścieżki sygnalizacyjnej ERK potwierdza jej istotną rolę w procesach formowania cytoszkieletu, macierzy zewnątrzkomórkowej oraz produkcji egzosomów

w komórkach ziarnistych utrzymywanych w krótkoterminowej hodowli pierwotnej *in vitro*.

5. Opisana po raz pierwszy w rozprawie doktorskiej ekspresja genu *LIPG*, regulującego metabolizm lipidów w komórkach ziarnistych, może wskazywać na istotną rolę tego genu w procesie steroidogenezy pęcherzyka jajnikowego świni podczas folikulogenezy.

Wnioski sformułowane są prawidłowo, aczkolwiek w mojej opinii są one opisaniem wybranych wyników i dotyczą de facto rezultatów cząstkowych. Zastanowiłbym się nad przereagowaniem dojrzałego rozdziału Podsumowanie i opublikowanie go w formie szerokich i bardziej syntetycznych wniosków.

Przedstawiony przez Kandydata cykl prac i ich opis jest spójnym oryginalnym i kreatywnym opracowaniem obejmującym realizację wymienionych wcześniej celów. Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu i poddane zostały wcześniej recenzji przez ekspertów. Wysokie wskaźniki naukometryczne czasopism, gdzie opublikowano prace świadczą o dużym znaczeniu badań i ich wysokiej jakości.

Podsumowanie oceny pracy:

Do szczególnych zalet przedłożonej pracy zaliczam:

- dobre, komplementarne i rzetelnie opracowane publikacje
- wybitny warsztat metodyczny wymagający wiedzy i pracowitości
- zaawansowana statystyka badań
- dobry, dojrzały język naukowy opisu prowadzonych badań w dysertacji
- rezultaty o znaczeniu poznawczym i potencjale aplikacyjnym

Z drugiej strony moje uwagi na temat pracy to:

- należałoby rozważyć, czy w tekście nie powinien mocniej wybrzmieć fakt, że badania prowadzone były w warunkach hodowli *in vitro* a w organizmie żywym dochodzi do ciągłej kontroli ośrodkowej i pewne zależności mogą ulegać modyfikacjom,
- rozważyłbym przereagowanie rozdziału Podsumowanie w syntetyczne Wnioski. Obecne wnioski mogłyby wtedy zostać opisane jako Wnioski uzupełniające

Powyższe uwagi mają charakter porządkujący i nie mają wpływu na fakt, że pracę oceniam bardzo wysoko.

Uwagi końcowe:

Recenzowana praca doktorska lek. wet. Jakuba Kulusa prezentuje wysoki poziom naukowy i wykonana została z zastosowaniem wybitnie zaawansowanej metodyki. Doktorant posiada umiejętność opisu uzyskanych wyników, formułowania wniosków oraz prowadzenia dyskusji naukowej. Temat pracy jest istotny dla rozwoju reprezentowanej Dyscypliny. Praca posiada walory poznawcze i aplikacyjne. Wykorzystanie w pracy wielu nowoczesnych technik badawczych świadczy o wysokich kompetencjach naukowych Doktoranta.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska lek. wet. Jakuba Kulusa jest prawidłowo opracowanym edytorsko, metodycznie i formalnie oraz oryginalnym osiągnięciem naukowym wnoszącym istotny wkład w rozwój reprezentowanej Dyscypliny i spełnia warunki określone 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). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Mikołaja `Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na zastosowaną niezwykle zaawansowaną metodykę pracy, osiągnięte nowatorskie wyniki cechujące się walorami poznawczymi i aplikacyjnymi oraz ze względu na jej interdyscyplinarny charakter łączący zagadnienia biologiczne, fizyczne oraz medyczne, uważam pracę za wybitną i świadcząca o wysokich kompetencjach Doktoranta. Wnoszę zatem o wyróżnienie pracy stosowną Nagrodą w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika.

Wojciech Nizański

