

Prof. dr hab. S. Zduńczyk

19.02.2024.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

## Ocena

### **pracy doktorskiej lek. wet. Jakuba Kulusa „Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*. ”**

Komórki ziarniste odgrywają istotną rolę w folikulogenezie oraz oogenezie. Wpływ na te procesy odgrywają wzajemne interakcje macierzy zewnątrzkomórkowej, cytoszkieletu i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Mechanizmy sygnalizacji międzykomórkowej w komórkach ziarnistych na poziomie molekularnym nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Poznanie tych interakcji pozwoli na zrozumienie patofizjologii chorób jajnika oraz na ich wykorzystanie w technikach wspomaganego rozrodu i w medycynie regeneracyjnej z zastosowaniem komórek macierzystych. Badania Doktoranta nad tą problematyką dotyczą więc ważnej, aktualnej problematyki i mają pionierski charakter.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 117 stron maszynopisu. Składa się ona ze spisu treści, wykazu publikacji stanowiących jej podstawę, wykazu skrótów, wprowadzenia, celu badań, opisu materiałów i metod, wyników i dyskusji, podsumowania, wniosków, wykazu piśmiennictwa, kopii publikacji oraz streszczeń w j. polskim i angielskim.

Podstawę pracy doktorskiej stanowią 3 publikacje:

1. Kulus, J., Kulus, M., Kranc, W., Jopek, K., Zdun, M., Józkwski, M., Jaskowski, J.M., Piotrowska-Kempisty, Bukowska, D., Antosik, P., Mozdziak, P., Kempisty, B. (2021): Transcriptomic profile of new gene markers encoding proteins responsible for structure of porcine ovarian granulosa cells. *Biology*, 10(11): 1214. doi: 10.3390/biology10111214.
2. Kulus J, Kranc W, Kulus M, Dzięgiel P, Bukowska D, Mozdziak P, Kempisty B, Antosik P. (2023): Expression of genes regulating cell division in porcine follicular granulosa cells. *Cell Division*, 18(1):12. doi: 10.1186/s13008-023-00094-7.
3. Kulus J, Kranc W, Kulus M, Bukowska D, Piotrowska-Kempisty H, Mozdziak P, Kempisty B, Antosik P. (2023): New Gene Markers of Exosomal Regulation Are Involved in Porcine Granulosa Cell Adhesion, Migration, and Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14):11873. doi: 10.3390/ijms241411873.

Sumaryczny IF tych publikacji wynosi 13,068, a łączna liczba punktów MNiSW 340. We wszystkich 3 pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co wskazuje na jego wiodącą rolę w opracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu prac do druku.

We wprowadzeniu Doktorant omawia budowę i znaczenie komórek ziarnistych, macierzy zewnątrzkomórkowej i cytoszkieletu oraz stan dotychczasowych badań nad ekspresją genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową. Wprowadzenie jest napisane interesująco, w oparciu o odpowiednio dobrane, aktualne piśmiennictwo.

Celem badań było określenie ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za sygnalizację międzykomórkową i tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cytoszkieletu w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni podczas ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*. Szczegółowe cele obejmowały określenie ekspresji genów biorących udział w steroidogenezie w komórkach ziarnistych, typowanie ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w integracji środowiska zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego komórek ziarnistych i wytypowanie genów, które mogą być markerami folikulogenezy u świni.

Badania zostały przeprowadzone na pierwotnej hodowli *in vitro* komórek ziarnistych świni pobranych z jajników pozyskanych poubojowo. Określono profile transkryptomyczne komórek w poszczególnych przedziałach czasowych (0, 48, 96 i 144 h) przy wykorzystaniu metody mikromacierzy ekspresyjnych. Wyniki poddano walidacji z zastosowaniem procedury RT-qPCR. Określono również interakcje pomiędzy badanymi genami za pomocą odpowiednich programów komputerowych.

W rozdziale Wyniki i dyskusja Doktorant przedstawia uzyskane wyniki porównując je z danymi z piśmiennictwa i omawia ich potencjalne znaczenie w procesach patologicznych jajników oraz potencjalne wykorzystanie niektórych genów jak markerów steroidogenezy w komórkach ziarnistych.

W pierwszym etapie badań wyodrębniono 3380 genów o zróżnicowanej ekspresji, dalszym analizom poddano 81 genów, spośród których 66 genów wykazywało podwyższoną ekspresję, natomiast 15 obniżoną. Do dalszych badań wybrano 20 genów wykazujących największą zmienność w ekspresji. Do genów o podwyższonej ekspresji odpowiedzialnych za skład i funkcjonowanie macierzy zewnątrzkomórkowej należały dekoryna (*DCN*), fibronektyna (*FNI*), periostyna (*POSTN*) i kaweolina (*CAV-1*), która odpowiada również za formowanie egzosomów. Podwyższoną ekspresję wykazywały także geny kodujące integryny (*ITGA2*, *ITGB3*) – białka transbłonowe, biorące udział w sygnalizacji międzykomórkowej. Analiza interakcji funkcjonalnych między genami wykazała korelacje między genami odpowiedzialnymi za tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, przy czym największe interakcje wykazywała fibronektyna.

W drugim etapie badań wykazano zmienność ekspresji genów wraz z czasem trwania hodowli. W 144 godzinie hodowli 1025 genów wykazało wzrost ekspresji, a 732 jej obniżenie. Do dalszej analizy wybrano 20 genów z grup ontologicznych odpowiedzialnych za powstanie cytoszkieletu i jego udział w kontroli poszczególnych faz podziału komórki. Do genów o

podwyższonej ekspresji kodujących białka wiążące aktyne, główny składnik cytoszkieletu, należały kalponina (*CNN1*), tropomiozyna (*TPM2*), aktynina (*ACTN1*) oraz gelsolina (*GSN*). Należy podkreślić, że ekspresja genu kalponiny w komórkach ziarnistych świni została wykazana po raz pierwszy. Kalponina wykazuje również aktywność w ścieżce sygnałowej ERK (ang. *extracellular signal regulated kinase*) przekazującej sygnały między cytoszkieletem a macierzą zewnątrzkomórkową. Podwyższona ekspresję wykazywał również gen chemokiny CCL2 (ang. *chemokine C-C motif ligand 2*) biorącej udział w indukowaniu procesu zapalnego podczas owulacji, geny regulujące syntezę kolagenu i geny odpowiedzialne za regulację podziału komórki, jak cykliny i cyklino zależne kinazy.

W trzecim etapie badań w 144 godzinie hodowli 731 genów wykazywało podwyższoną ekspresję, a 1025 obniżoną. Do dalszych analiz wybrano 11 genów o podwyższonej ekspresji. Do genów odpowiedzialnych za proces transportu pęcherzykowego oraz genów związanych z procesami migracji, adhezji i proliferacji komórek należały MXRA5 (ang. *matrix remodelling associated 5*) i fibromodulina (*FMOD*) biorące udział w remodelingu macierzy zewnątrzkomórkowej oraz oksydaza lizozylowa (*LOX*), która wykazuje wpływ na skład macierzy zewnątrzkomórkowej, proliferację i różnicowanie komórek ziarnistych oraz procesy steroidogenezy. Po raz pierwszy wykazano ekspresję w komórkach ziarnistych świni genu lipazy endotelialnej (*LIPG*), odpowiedzialnej za metabolizm lipidów i biorącej udział w steroidogenezie. Podwyższoną ekspresję wykazywał również gen dehydrogenazy 3 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu 1 (*HSD3B1*) biorący udział w syntezie progesteronu, natomiast obniżoną – gen dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu 1 (*HSD17B1*) biorący udział w syntezie estradiolu. Stwierdzono podwyższoną ekspresję genu kodującego syntazę hialuronianową (*SHAS2*) wpływającą na migrację komórek, ekspansję wzgórka jajonośnego i syntezę hialuronianu – składnika macierzy zewnątrzkomórkowej. Podwyższoną ekspresję wykazała również grupa ontologiczna genów regulująca proces angiogenezy.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto 6 wniosków, wynikających z uzyskanych rezultatów.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta mają duże znaczenie naukowe. Dostarczyły one nowych danych o ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej i cytoszkieletu oraz sygnalizację międzykomórkową w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni podczas ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*. Po raz pierwszy wykazano ekspresję genu kalponiny i genu lipazy endotelialnej w komórkach ziarnistych świni.

W zasadzie nie mam uwag krytycznych odnośnie koncepcji badań, ich wykonania i interpretacji wyników. Należy podkreślić, że prace stanowiące podstawę tej pracy doktorskiej były już poddane ocenie i zaakceptowane do druku przez recenzentów renomowanych czasopism. Mam jedynie sugestię odnośnie przyszłych badań. Badania te należałoby przeprowadzić na materiale pochodzącym od zwierząt o dokładnie znanej fazie cyklu rujowego, ponieważ może ona mieć wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w steroidogenezę.

Recenzowana praca posiada pewne niedociągnięcia natury redakcyjnej, np. niepełna nazwa angielska dehydrogenazy 3 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu 1 (s. 28), pomyłki w autorach i tytułach w piśmiennictwie (np. poz. 112), niejednolity sposób podawania tytułów czasopism (skrót lub pełne nazwy), używanie wyrażen żargonowych (np. kumulus, s. 28).

Przedstawione uwagi mają charakter redakcyjny i nie obniżają wysokiej oceny recenzowanej pracy, wynikającej z aktualności problematyki, nowoczesności metod badawczych oraz naukowego znaczenia uzyskanych wyników. Recenzowana praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę o dopuszczenie lek. wet. Jakuba Kulusa do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie jego pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

  
KIEROWNIK KATEDRY  
prof. dr hab. Sławomir Zduńczyk

Prof. dr hab. S. Zduńczyk

19.02.2024.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

### Wniosek

**o wyróżnienie pracy doktorskiej lek. wet. Jakuba Kulusa „Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*.”**

Badania przeprowadzone przez Doktoranta dotyczą aktualnej problematyki i zostały wykonane przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie naukowe. Dostarczyły one nowych danych o ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej i cytoszkieletu oraz sygnalizację międzykomórkową w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni podczas ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*. Niektóre wyniki mają pionierski charakter. Po raz pierwszy wykazano ekspresję w komórkach ziarnistych świni genu kalponiny i genu lipazy endotelialnej. Należy podkreślić, że podstawę tej pracy doktorskiej stanowią 3 prace opublikowane w renomowanych czasopismach. Łączny IF tych prac wynosi 13,068.

Biorąc powyższe pod uwagę o wyróżnienie tej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

KIEROWNIK KATEDRY  
prof. dr hab. Sławomir Zduńczyk