

Katowice / 22.04.2021

Centrum Medycyny
Doświadczalnej

40-752, Katowice
ul. Medyków 4
<http://cmd.sum.edu.pl/>

KIEROWNIK
prof. dr hab. n. med.
Jarosław Barski

tel.: (+48 32) 208 85 93
fax: (+48 32) 208 88 31

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 208 85 93
tel.: (+48 32) 208 88 32
fax: (+48 32) 208 88 31

cmd@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz:**„Rola neuronów AgRP/NPY w rozwoju fenotypu otyłości u myszy z indukowaną delecją genu *Dicer1*”.**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska powstała w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem dwóch promotorów, Pani profesor Urszuli Wojdy oraz Pana doktora habilitowanego Witolda Konopki.

Praca ta jest kolejną opartą na analizie myszy, u których metodami inżynierii genetycznej zablokowano ekspresję genu *Dicer 1*.

Oceniana dysertacja została zredagowana w formie obszernej monografii liczącej aż 200 stron. Całość została podzielona na rozdziały i podrozdziały typowe dla tego rodzaju opracowań i pozwalające czytającemu na usystematyzowane prześledzenie treści dysertacji.

Po licznych podziękowaniach rozprawę otwiera spis treści, a po nim następuje część wyjaśniająca znaczenie wszystkich skrótów użytych podczas redagowania pracy. Następne dwie części to streszczenia w języku angielskim i polskim, wskazujące na najważniejsze aspekty metodyczne oraz wnioski uzyskane na podstawie przeprowadzonych eksperymentów.

Właściwa rozprawa rozpoczyna się liczącym 41 stron wstępem podzielonym dla lepszej przejrzystości na podrozdziały. Rozdział ten informuje czytającego na temat aktualnego stanu wiedzy dotyczącej problemów otyłości oraz regulacji procesów związanych z apetytem i łaknieniem. Obszerłą część stanowi informacja na temat nowoczesnych metod pozwalających na kontrolowaną manipulację ekspresją genów. Jest to cenne podsumowanie na temat tej szybko rozwijającej się dyscypliny jaką jest szeroko rozumiana transgeneza. Zawarte w tym rozdziale informacje są poparte licznymi cytowaniami literatury światowej.

Treść części wstępnej została uzupełniona licznymi ilustracjami i schematami, pozwalającymi na łatwiejsze zrozumienie opisywanych tu struktur ośrodkowego układu nerwowego oraz procesów molekularnych i metabolicznych. Mimo wysokiej oceny tego rozdziału pozwolę sobie na kilka uwag co do niektórych sformułowań.

W fragmentach „Wstępu” skupiających się na manipulacjach transgenicznych (np. str. 28) pojawiają się liczne określenia takie jak: usunięcie genu, eliminacja genu, mysz bez genu, częściowe usunięcie genu. Możemy się domyślać, iż w każdym z tych przypadków chodzi o całkowite lub częściowe wyłączenie ekspresji genów i sugerowałbym stosowanie tego terminu, który odnosi się do efektu naszych manipulacji. Jak wiemy rzadko zdarza się, aby podczas manipulacji transgenicznych dochodziło do fizycznego usunięcia całego genu, gdyż nie ma takiej potrzeby. Z językowego punktu widzenia chciałbym też zauważyć, iż tamoksyfen piszemy małą literą.

Na stronie 45 „Wstępu” znajduje się stwierdzenie: „Dodatkowe znaczenie, dla obu metod, ma etap rozwoju zarodkowego, na którym następuje integracja obcego DNA. Im wcześniej w rozwoju nastąpi, tym większa szansa, że modyfikacja znajdzie się w linii komórek zarodkowych, z możliwością przekazania jej potomstwu. Z kolei integracja na etapie wielokomórkowego zarodka może skutkować powstaniem genetycznej chimery.” Bez wątplenia jest to prawda, ale informacja ta powoduje pewne zamieszanie, gdyż przy stosowaniu rekombinacji homologicznej na etapie blastocysty zawsze otrzymujemy chimery, a przekazanie transgenu potomstwu zależy od jego obecności w linii komórek płciowych, a to jest tym bardziej prawdopodobne i wyższy jest tzw. stopień chimeryzmu. W przypadku iniekcji przedjądrzy brak jest etapu chimery i właściwie zawsze możliwe jest przekazanie transgenu następnym pokoleniom.

Dalej na tej stronie jest mowa o „miejscowo-specyficznych rekombinazach”. W rzeczywistości, to nie rekombinazy są „miejscowo-specyficzne” ale ich ekspresja zależy od wprowadzonych egzogennie, sterujących nią sekwencji regulatorowych.

Strona 52: „To na co należy zwrócić uwagę, to fakt, że u potomnych osobników Cre uruchamiana jest już w życiu płodowym, zatem modyfikacja, choć zawężona do wybranej populacji komórek, nie ma wyznaczonych ram czasowych i dotyczy każdego etapu rozwojowego, na którym aktywny jest promotor regulujący Cre. Wzór rekombinacji u osobników dorosłych odzwierciedla wówczas aktywność promotora kierującego Cre również z etapu rozwojowego.” Nie bardzo rozumiem to stwierdzenie, gdyż istnieją przecież sekwencje regulatorowe uruchamiające ekspresję po urodzeniu.

Strona 53: „W tym układzie warunkiem zajścia rekombinacji jest uzyskanie odpowiedniej ilości funkcjonalnej rekombinazy w jądrze komórkowym poprzez kilkudniową ekspozycję zwierząt na tamoksyfen podawany dootrzewnowo.” Co oznacza określenie „odpowiednia ilość”? Zgodnie ze

znanymi mi danymi literaturowymi jedna cząsteczka rekombinazy Cre jest wystarczająca do rekombinacji co najmniej dwóch loxP. Stąd też nie powinno być zależności ilościowej.

Następny rozdział to „Cele pracy”. Doktorantka zdefiniowała główny cel rozprawy jakim było określenie roli oreksygenicznych neuronów AgRP/NPY w rozwoju otyłości zależnej otyłości zależnej od miRNA oraz trzy cele szczegółowe, których realizacja zaowocuje osiągnięciem celu głównego.

Rozdział 3 to „Materiały i metody”, w którym doktorantka szczegółowo opisuje metodyczne aspekty przeprowadzonych doświadczeń. Pierwszy podrozdział (3.1) dotyczy licznych linii zwierząt doświadczalnych wykorzystanych w badaniach z podziałem na ich zastosowanie na różnych etapach badań. Informacją jakiej nie udało mi się znaleźć w tej części dysertacji to płeć wykorzystywanych w eksperymentach myszy oraz jaka była liczba zwierząt w klatkach. Druga z brakujących informacji jest istotna ze względu na pomiary ilości spożytego pokarmu. Można się jedynie domyślać, iż ze względu na ten aspekt eksperymentu zwierzęta były trzymane w klatkach pojedynczo. Po tym podrozdziale następuje bardzo precyzyjny opis wszelkich metod i procedur wykorzystanych na wszystkich etapach części eksperymentalnej dysertacji. Rozdział „Materiał i metody” liczy aż 41 stron, jednak ze względu na różnorodność wykorzystanych w pracy metod jest to uzasadnione.

Wyniki badań zostały opisane w rozdziale 4, liczącym 54 strony i będącym jednocześnie najobszerniejszym rozdziałem dysertacji. W podrozdziale 4.1, na stronie 91 znalazłem zdanie: „Tym samym, wykonując serię krzyżówek myszy, uzyskano zwierzęta pozbawione zarówno obydwu alleli genu *Npy*, jak i z sekwencjami loxP, otaczającymi wybrany fragment genu *Dicer1* oraz z ekspresją rekombinazy CreERT2 w neuronach CaMKII α (NPYKO/DicerCKO).” Informacja zawarta w tym zdaniu jest zapewne oczywista dla doktorantki, ale nie dla czytającego to zdanie recenzenta. Zdanie to byłoby znacznie bardziej zrozumiałe, gdyby brzmiało: „Wykonując serię krzyżówek uzyskano myszy pozbawione obu alleli genu *Npy*, posiadające jednocześnie fragment genu *Dicer1* wyznakowany sekwencjami loxP oraz ekspresję rekombinazy CreERT2 w neuronach CaMKII α (NPYKO/DicerCKO).” Zamieszczona na stronie 93 rycina pozwala na właściwą interpretację cytowanego przeze mnie zdania. W tym miejscu pozwolę sobie zauważyć, iż interpretacja rycin jest wygodniejsza, kiedy ich opisy znajdują się bezpośrednio pod ryciną. Niejasne też było dla mnie stwierdzenie: „Grupę kontrolną stanowiły osobniki heterozygotyczne bądź niezmienione pod względem mutacji w genie *Npy* oraz *Dicer1* oraz te bez obecności CreERT2...”. Zdanie to wyjaśnia częściowo rycina 4.1, ale brak na niej myszy nie posiadających CreERT2. Powstaje też pytanie, dlaczego heterozygoty mogły być grupą kontrolną? Moim zdaniem informacja w postaci tabeli z wymienionymi genotypami z wszystkich grup byłaby czytelniejsza. Po przeczytaniu podrozdziału 4.1 odniosłem też wrażenie braku pewnej istotnej informacji, a mianowicie danych na temat skuteczności i specyficzności rekombinacji

zależnej od tamoksyfenu. Ta informacja pojawia się w podrozdziale 4.3, jednak być może zamieszczenie tego podrozdziału z numerem 4.2 byłoby bardziej logiczne.

Od strony 97 rozdziału „Wyniki” pojawiają się obrazy mikroskopowe. Chcę podkreślić, iż wszystkie obrazy mikroskopowe zaprezentowane w pracy są bardzo dobrej jakości i zostały przygotowane z wielką starannością, a uzupełnienie ich o schematy doświadczeń, których są efektem ułatwia ich interpretację. Nie mniej jednak pozwolę sobie na kilka subiektywnych uwag. Doktorantka przyjęła schemat opisu obrazów mikroskopowych bez opisywania ich literami, co w niektórych przypadkach utrudnia ich analizę. Obrazy mikroskopowe zostały wykonane z wykorzystaniem dwóch różnych mikroskopów, zwykłego fluorescencyjnego oraz konfokalnego. Opisy obrazów mikroskopowych nie zawierają jednak informacji o ich pochodzeniu. Na stronie 102 znajduje się rycina 4.7 z tytułem: „Mikroskopowy obraz ekspresji żółtej (YFP) oraz czerwonej (mCherry) fluorescencji...”. Dla osób mniej zorientowanych wskazane byłoby wyjaśnienie, dlaczego YFP świeci na zielono. W opisie ryciny 4.8 na następnej stronie znajduje się sformułowanie „jednostronny obraz”. Wprawdzie wiadomo o czym myślała autorka, ale określenie obraz jądra łukowatego po stronie (...), byłby bardziej właściwy. Przy okazji omawiania analizy immunohistologicznej chciałbym zapytać, jaka była przyczyna, iż część barwień wykonano z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał wyznakowanych fluorescencyjnie, a część z wykorzystaniem metody z DAB? W tym miejscu nasuwa mi się jeszcze jedna uwaga związana z barwieniem tą metodą. Na stronie 88 rozdziału „Materiały i Metody” pojawia się informacja: „Pierwszorzędowe królicze przeciwciała rozpoznające Cre (wyprodukowane w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki I, DKFZ),...”. Interesującym jest fakt, iż mimo wielu lat doświadczeń z wykorzystaniem rekombinazy Cre, w dalszym ciągu stosuje się przeciwciała opracowane i opublikowane w 1999 roku przez Christiana Kellendonka. Może wskazanym byłoby umieszczenie w spisie literatury tej pozycji: *Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schütz G. Inducible site-specific recombination in the brain. J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):175-82. doi: 10.1006/jmbi.1998.2307. PMID: 9878397.*

Mam jeszcze pytanie do doktorantki: czy porównywała Pani zakres ekspresji rekombinazy Cre z zakresem rekombinacji, tzn. czy Pani zdaniem we wszystkich komórkach, w których doszło do ekspresji rekombinazy doszło też do rekombinacji, a idąc dalej, czy obecność rekombinazy Cre w jądrze jest gwarancją zajścia rekombinacji?

Po rozdziale „Wyniki” następuje liczący 20 stron rozdział numer 5 - „Dyskusja”. Doktorantka bardzo szczegółowo omawia wyniki przytoczone w części „Wyniki”, odnosząc je jednocześnie (tam gdzie to możliwe) do istniejących danych literaturowych. Ze względu na nowatorski charakter pracy doktorskiej, jej specjalistyczny charakter oraz wyszukany arsenał metodyczny, nie wszędzie była możliwość interpretacji uzyskanych wyników w oparciu o istniejące już dane. W takich przypadkach

doktorantka starała się wyjaśnić dane eksperymentalne na podstawie własnych przemyśleń i dotychczasowego, własnego doświadczenia eksperymentalnego. Niewątpliwie najtrudniejszym aspektem części metodycznej i eksperymentalnej dysertacji było znalezienie odpowiedniego modelu mysiego, którego zastosowanie pozwoliłoby na otrzymanie wiarygodnych odpowiedzi na pytania i hipotezy przedstawione w rozdziale „Cele pracy”. Rozdział „Dyskusja” jest też więc podsumowaniem i oceną zwierzęcych modeli eksperymentalnych wykorzystanych w eksperymencie i może stanowić cenny materiał porównawczy dla innych badaczy zajmujących się nie tylko podobnymi aspektami neurobiologii, ale również wykorzystaniem metodyki transgenicznej w innych dziedzinach biologii i medycyny. Po zapoznaniu się z tym interesującym rozdziałem dysertacji widać wyraźnie, iż mimo istnienia szerokiej dość gamy metod rekombinacji i edycji materiału genetycznego, problem specyficzności ekspresji zastosowanego transgenu jest najpoważniejszym wyzwaniem. Podobnie wygląda kwestia obiektywnego potwierdzenia tej specyficzności, która zależy od czułości zastosowanej metody. Mimo, iż od czasów myszy reporterowych z ekspresją beta-galaktozydazy nastąpił znaczący postęp, to i tak nie można ze 100% pewnością potwierdzić, iż ekspresja rekombinazy Cre = rekombinacja materiału genetycznego. Ta kwestia stała się kluczowym problemem metodycznym ocenianej przez mnie rozprawy doktorskiej. W tym momencie, chciałbym jeszcze wrócić do podrozdziału 5.3.1 dyskusji, opisującego model AgRP-CreERT2 i zapytać, czy zdaniem doktorantki możliwe jest, iż opisywana ograniczona rekombinacja może być spowodowana niedostateczną podażą podawanego tamoksyfenu?

W tym miejscu chciałbym podkreślić, iż doktorantka nie poddała się dążąc do celu, jakim było określeni roli neuronów AgRP/NPY w rozwoju otyłości i ostatecznie osiągnęła sukces stosując narzędzia systemu CRISPR/Cas9. Odnosząc się to aspektów językowych rozdziału „Dyskusja”, to na stronie 151 zostało użyte słowo „uargumentować”, które śmiało można by zastąpić znacznie lepiej brzmiącym „uzasadnić” lub „wyjaśnić”.

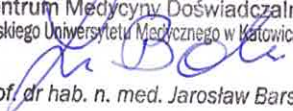
Część pracy związaną bezpośrednio z przeprowadzonym eksperymentem kończy rozdział numer 6 „Podsumowanie i Wnioski”. W rozdziale tym doktorantka w 7 punktach podsumowuje rezultaty przeprowadzonych badań, odnosząc się jednocześnie do celów i hipotez przedstawionych w rozdziale „Cele pracy”. Informacje zebrane w tych siedmiu punktach pokazują, iż przeprowadzone eksperymenty zakończyły się sukcesem, a uzyskane wyniki dały odpowiedź na postawione pytania. Rozdział 7 rozprawy doktorskiej to „Bibliografia”, obejmująca 353 pozycje, a całość zamyka „Suplement”, zawierający informacje na temat źródeł finansowania pracy oraz dorobku naukowego doktorantki.

Podsumowanie:

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską, która jest efektem ogromnego nakładu pracy i czasu oceniam bardzo wysoko.

Uwagi i drobne wątpliwości, które znalazły się w recenzji nie mają na celu podważenia jakości opisanych wyników i poddania w wątpliwość całości rozprawy doktorskiej, a są jedynie efektem wnikliwego zapoznania się z rozprawą. Jak wspomniałem wcześniej, oceniana praca doktorska jest efektem znaczącego nakładu pracy i badań naukowych prowadzonych na wysokim poziomie naukowym i z wykorzystaniem nowoczesnego zaplecza metodycznego.

Przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r. poz. 478, 619, 1630), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie dysertacji.

KIEROWNIK
Centrum Medycyny Doświadczalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski



Kraków, 11.05.2022

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Hajdukiewicz
„Rola neuronów AgRP/NPY w rozwoju fenotypu otyłości u myszy z indukowaną delecją genu
Dicer1”

Promotor: Dr hab. Witold Konopka
Prof. dr hab. Urszula Wojda

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz koncentruje się na określeniu roli dwóch populacji neuronów AgRP/NPY oraz POMC/CART, zaangażowanych w neurohormonalną regulację łaknienia i sytości, podstawowych odczuć odpowiedzialnych za zachowania żywieniowe. Te przeciwstawnie działające populacje neuronalne, odpowiedzialne za homeostazę w zakresie kontroli przyjmowania pokarmu, są umiejscowione w tzw. jądrze łukowatym w podwzgórzu, tradycyjnie uważanym za lokalizację ośrodka głodu i sytości.

Problem podjęty w badaniach przez Doktorantkę jest ważnym zagadnieniem, szczególnie w społeczeństwach wysokorozwiniętych, gdzie dostęp do żywności jest nieograniczony, a nieprawidłowe nawyki żywieniowe kształtowane przez współczesny styl życia, stres, wielkie koncerny spożywcze czy dietę wysokokaloryczną opartą w dużej mierze na łatwo przyswajalnych węglowodanach, powodują znaczący wzrost chorób metabolicznych.

Celem rozprawy doktorskiej było przede wszystkim określenie udziału neuronów AgRP/NPY w rozwoju otyłości u zwierząt pozbawionych selektywnie genu kodującego endorybonukleazę Dicer, pełniącą kluczową rolę w procesie biogenezy krótkich regulatorowych RNA: miRNA oraz siRNA.

Wybór zagadnienia był logiczną kontynuacją badań zapoczątkowanych przez jednego z promotorów pracy doktorskiej, który wykazał przy okazji przeprowadzanych testów kognitywnych, że myszy pozbawione miRNA w przodomózgowie charakteryzują się fenotypem otyłości. Dodatkowo, zjawisko to zostało opisane nieco szerzej w ostatnich latach, m.in. poprzez wykazanie u tych zwierząt rozwoju otyłości związanej ze zwiększonym poborem pokarmu oraz zmian w profilu transkryptomicznym (zwiększona ekspresja genów zaangażowanych w ścieżki metaboliczne). Zagadnienie było następnie rozwijane w piśmiennictwie przez kolejno pojawiające się doniesienia przedstawiające charakterystykę zwierząt pozbawionych genu *Dicer1* w neuronach POMC. Nie było natomiast danych dotyczących roli *Dicer1* w populacji neuronów AgRP, co stało się tematem wiodącym pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz.



Układ rozprawy doktorskiej jest klasyczny. Praca została napisana w języku polskim, podzielona na 8 części: (1) wstęp, (2) cele pracy, (3) materiały i metody, (4) wyniki, (5) dyskusja, (6) podsumowanie i wnioski, (7) bibliografia oraz (8) suplement. Wstęp liczący 38 stron stanowi właściwe kompendium wiedzy o ośrodkach w mózgu zaangażowanych w regulację procesów odżywiania, roli mikro RNA w tych procesach oraz stosowanych współcześnie narzędziach genetycznych dla ich badania. Najobszerniejszą częścią jest wyczerpująco opisany rozdział poświęcony charakterystyce neuronów AgRP, co jest zrozumiałe ze względu na temat pracy. Cele pracy są przedstawione w sposób zwięzły i jednoznaczny, z podziałem na cel nadrzędny (określenie roli oreksygenicznego neuronów AgRP/NPY w rozwoju miRNA-zależnej otyłości) i kilka celów szczegółowych. Materiały i metody są opisane również dokładnie i przejrzysto, zawierają szereg zestawień tabelarycznych, dotyczących parametrów reakcji PCR wykorzystywanych do genotypowania zwierząt, opis technik in-vitro, m.in. przygotowania wektorów wirusowych, domózgowych podań stereotaktycznych, opis metod biologii molekularnej służących do wstępnej charakterystyki myszy transgenicznego otrzymanych przez Doktorantkę, oraz opis metodyki prowadzonych badań behawioralnych. Bardzo wysoko oceniam sposób przejrzystej prezentacji wyników, gdzie każdy wykres obrazujący badane parametry poboru pokarmu i przyrostu masy ciała jest połączony z graficznym przedstawieniem wprowadzanego konstruktów genetycznych, rodzaju zastosowanej metody transgeniki, czy zastosowanego wektora AAV. Dzięki temu czytelnik od razu ma jasny obraz celu doświadczenia, a konsekwentnie stosowana kolorystyka grafik stanowi duże ułatwienie dla porównywania w trakcie lektury tekstu przedstawianych kolejno wyników. Dyskusja liczy 20 stron i wyczerpuje w mojej ocenie temat interpretacji efektów osiągniętych przez zastosowanie różnych modeli badawczych. Nieco słabiej opisano jedynie fragment dotyczący różnic płciowych w badanych modelach (rozdział 5.4 - *Wpływ płci zwierząt na obserwowany fenotyp otyłości*), gdzie Doktorantka odniosła się wprawdzie do dość oczywistej roli estrogenu w regulacji metabolizmu, poruszyła zagadnienie różnic płciowych w ekspresji miRNA, ale zabrakło moim zdaniem szerszego kontekstu nawiązania do chorób metabolicznych i ich różnicowania zależnego od płci w klinice. Takich prac jest sporo i choć doktorat jest realizowany w naukach podstawowych, to jednak w dyskusji powinno się pamiętać o szerszym kontekście uzyskanych wyników w kierunku badań translacyjnych. Całość opisanych założeń i wyników jest poparta szerokim piśmiennictwem, adekwatnym do zakresu tematycznego zagadnienia. Jako osoba znająca zawodowo bardziej szczegóły metodyczne pracy niż samo zagadnienie regulacji procesów łaknienia i sytości, musiałem sięgnąć również do odpowiedniej literatury w tej tematyce. Nie znalazłem wartościowej pozycji, która nie byłaby już włączona w zestawienie piśmiennictwa, co świadczy o wyczerpującym podejściu do problemu badawczego przez Doktorantkę. Ostatnia część pracy to suplement zawierający informacje o źródłach finansowania i dotychczasowym dorobku naukowym Doktorantki, na który składa się 10 publikacji, w tym jedna z pierwszym autorstwem, opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR Web of Science.



Zarówno sam zamysł podejścia do problemu, jak i naukową jakość badań przeprowadzonych przez Panią mgr Karolinę Hajdukiewicz w ramach niniejszej pracy oceniam bardzo wysoko. Nowatorski charakter pracy nie ogranicza się tylko do zagadnienia, które pozostawia jeszcze sporą dozę dla postawienia pytań badawczych, ale obejmuje bardzo zaawansowane techniki z zakresu tworzenia zwierząt transgenicznych, w tym z zastosowaniem systemu celowanych i indukowanych delecji opartych o działanie rekombinazy Cre oraz edycji genów CRISPR/Cas9 (nagroda Nobla przyznana w 2020 roku dla E. Charpentier i J. A. Doudna). Techniki te, w których Doktorantka niewątpliwie wykazała się dużą biegłością, umożliwiły w ogóle badania w tym zakresie, jako że niespecyficzna delecja miRNA w populacji neuronów AgRP jest letalna.

Należy dodatkowo podkreślić, że Doktorantka pracowała w oparciu o niezwykle szeroki wachlarz metodyczny w zakresie modeli transgenicznych, w skład których wchodziło – poza zwierzętami stanowiącymi tzw. tło genetyczne – aż 11 linii transgenicznych. Oczywiście, część z nich stanowiła nieodzowne linie narzędziowe służące do weryfikacji skuteczności rekombinacji czy stanowiące składowe linie w systemie Cre/loxP. Niemniej większość (DicerCKO, NPY-KO/DicerCKO, AgRPCreERT2Dicer, Gad2CreCas9, Vglut2CreCas9, AgRPCreCas9) były to rzeczywiste, nowo wygenerowane modele zastosowane do badań wpływu utraty *Dicer1* w różnych populacjach neuronalnych na fenotyp otyłości. Wielu naukowców, którzy nie pracują na codzień z modelami zwierząt transgenicznych, nie ma świadomości, ile wysiłku, wiedzy i czasu zajmuje przygotowanie takiego modelu. Składa się na to zaprojektowanie i przygotowanie odpowiednich konstruktów genetycznych, produkcja i opracowanie metodyki podawania wektorów wirusowych, ustalenie koordynatów przy podaniach stereotaktycznych, opracowanie protokołów genotypowania zwierząt, wreszcie weryfikacja – najpierw in-vitro, później ex-vivo – skuteczności i selektywności wprowadzonej mutacji. Wszystkie te etapy zostały jasno opisane i udokumentowane w przedłożonej do oceny pracy doktorskiej. Już ten zakres pracy mógłby być w niejednym ośrodku badawczym uznany za wystarczający dla doktoratu, a mówimy dopiero o przygotowaniu modeli zwierzęcych, które Doktorantka wykorzystała jeszcze do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej, wykazując istotną rolę miRNAw regulowaniu funkcji neuronów AgRP/NPY.

W rezultacie podjętych badań, efektem pracy było wykazanie, że delecja *Dicer1* w neuronach AgRP prowadzi do otyłości, a miRNA w tych neuronach pełni kluczową rolę w kontroli zachowań żywieniowych myszy. Doktorantka wykazała także, że otyłość związana z nadmiernym spożyciem pokarmu jest uzależniona od liczby zmodyfikowanych neuronów AgRP, oraz różna w zależności od płci zwierząt. Wykazała, że produkt genu *Npy* nie jest z kolei kluczowy dla regulacji rozwoju otyłości związanej z utratą miRNA, oraz że neurony GABA-ergiczne i glutaminianergiczne pełnią odmienną rolę w kontroli spożywania pokarmu w rozwoju zależnej od miRNA otyłości.



Nie umniejszając wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej, ciekawej tematyki badawczej, jak i robiącego ogromne wrażenie wkładu pracy Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz w weryfikację hipotez i osiągnięcie postawionych celów badawczych, chciałem jednak zwrócić uwagę na kilka aspektów, które – w mojej ocenie – mogłyby zostać doprecyzowane.

1. Doktorantka używa jako tła genetycznego do testów myszy C57Bl/6J. Tymczasem np. myszy Dicer flox/flox czy DicerCKO (dokładnie Dicer1CaMKCreERT2) były prawdopodobnie wyprowadzone z tła genetycznego C57Bl/6N. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe pokazujące odmienne profile charakterystyki behawioralnej tych szczepów myszy, wydaje się, że komentarz w tej sprawie byłby dobrym uzupełnieniem w części metodycznej.
2. W pracy z modelami, w których rekombinaza Cre była indukowana tamoksyfenem przyjęto zasadę porównywania zwierząt z indukcją mutacji (podanie tamoksyfenu) ze zwierzętami zawierającymi ten sam konstrukt, które otrzymywały *vehiculum* (olej). W niektórych przypadkach wykazano różnice płciowe w obrębie mutacji, jak np. przy pomiarze poboru pokarmu u samic i samców linii AgRPCreERT2Dicer. Należy zaznaczyć, że dla prawidłowego układu doświadczalnego w takim przypadku schemat doświadczenia powinien być uzupełniony o dodatkową grupę kontrolną, otrzymującą tamoksyfen. Pozwoliłoby to wykluczyć interferencję efektu selektywnej modulacji receptorów estrogenowych. Zagadnienie to może być bez znaczenia, biorąc choćby pod uwagę czas jaki upłynął od momentu podania tamoksyfenu do zaobserwowanych zmian. Niemniej w opisywanym przykładzie mamy do czynienia z brakiem przyrostu masy ciała u obu płci, natomiast zmianą łaknienia widoczną jedynie u samic, co stanowi otwarte pole do spekulacji w tym względzie.
3. Z opisu metodyki można wywnioskować, że w liniach tworzonych w oparciu o system edycji genów CRISPR/Cas9 podania wektorów wirusowych do jądra łukowego odbywały się w ten sam sposób (podano koordynaty podań stereotaktycznych). Problem jednak w tym, że ta struktura wymaga bardzo głębokich iniekcji z ryzykiem mechanicznego uszkodzenia po drodze struktur mogących mieć znaczenia w procesach regulacji oreksygenicznej, czy nawet samego behawioru zwierzęcia. Komentarz dla tego aspektu metodycznego byłby wskazany.
4. Wiele z uzyskanych wyników wykazuje wyraźnie różnice płciowe w odpowiedzi na wywołane mutacje. Doktorantka wymienia ten aspekt również w podsumowaniu najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej. Niestety, przedstawione wyniki nie zawsze zostały wyraźnie opisane w tym aspekcie. Przykładowo, w przypadku myszy Dicer f/f (ryc. 4.14), czy myszy Dicer f/f po iniekcji AAV-AgRPCre (ryc. 4.15, 4.17), z opisu rycin jak i wyników nie można doszukać się informacji, czy przedmiotem badań były samce, samice czy – co najbardziej prawdopodobne – grupa mieszana. Zagadnienie to wydaje się szczególnie ważne w

kontekście wydatnie wykazanych różnic w odpowiedzi na efekt mutacji zależnej od płci zwierzęcia, jak choćby w przypadku porównania przyrostu masy ciała u samców i samic AgRPCreCas9.

5. Potencjał wygenerowanych modeli doświadczalnych mógłby zostać szerzej wykorzystany. Nie jest to zarzut względem Doktorantki (pracy wykonanej w projekcie było aż nadto), ale dysponując zwierzętami, które były regularnie monitorowane przez kilka tygodni pod kątem spożycia pożywienia i przyrostu wagi, można było rozważyć wykonanie dodatkowo kilku prostych testów behawioralnych w kontekście oceny motywacji i ruchliwości spontanicznej zwierząt, a przynajmniej poddać taki pomysł na zakończenie dyskusji, otwierając perspektywę dalszego wykorzystania opracowanych modeli badawczych. Mam wrażenie, że testy te byłyby szczególnie pożądane w przypadkach, gdzie zaobserwowano brak łaknienia skojarzony z przyrostem wagi. Testy te nie wymagają szczególnego zaplecza i pomimo niezbyt licznych grup eksperymentalnych może warto było je wykonać choćby pilotażowo? Oczywiście, zapewne będzie to przedmiotem kolejnych badań w ramach innych projektów.
6. Nieco powierzchownie potraktowano zagadnienie analizy statystycznej uzyskanych wyników. W przypadku danych porównujących jedną zmienną zastosowano prawidłowo test t-studenta, co jest zrozumiałe. W przypadku danych kumulatywnych dot. np. przyrostu masy ciała Doktorantka wybrała (słusznie) test dwuczynnikowej ANOVA z powtarzanymi pomiarami. Niezrozumiałe jest jednak, dlaczego dla testu *post-hoc*, decydującego o stopniu znamienności statystycznej, używano zamiennie testów Sidak'a (np. ryc. 4.18, 4.19, 4.22), Tukey'a (np. ryc. 4.1, 4.21), czy nawet mało miarodajnego LSD (ryc. 4.17), pomimo analizy tego samego parametru (przyrost masy ciała). Jeśli były ku temu powody, to zastosowanie jedno i dwuczynnikowej analizy ANOVA oraz konkretnych, różnych testów *post-hoc* powinno zostać wyjaśnione w opisie metodycznym w rozdziale 3.10.

Recenzje rozpraw doktorskich zawierają niejednokrotnie detaliczne wykazywanie nieścisłości, lapsusy słowne, błędy językowych czy edytorskie, których Doktorant czy Doktorantka nie ustrzegli się w pisaniu pracy doktorskiej. Nie uważam, żeby była to istotna część recenzji. Jest rzeczą normalną, że przy tak obszernym tekście (w tym przypadku liczącym dokładnie 200 stron maszynopisu, zawierającym 19 tabel, 40 rycin i wykresów z wynikami oraz 353 pozycje piśmiennictwa), tego typu niedopatrzienia zawsze się znajdują i również w tej pracy – choć nieliczne – można je niekiedy odnaleźć. Ten aspekt jest szczególnie trudny do uniknięcia, gdy rozprawa jest przygotowywana w języku polskim, a dotyczy skomplikowanych zagadnień z zakresu szybko rozwijającej się dziedziny jaką jest transgenika, dla której współczesna wiedza jest już dostępna niemal wyłącznie w języku angielskim. Po prostu w wielu przypadkach anglojęzyczne nazewnictwo nie ma dobrych, polskich odpowiedników.



Nie jest to jednak istotne dla merytorycznej wartości samej rozprawy doktorskiej. Co więcej, sam mając problem z tłumaczeniem wielu terminów na język polski, nie podejmuję się rozstrzygnięcia poprawności zastosowanych tłumaczeń przez Doktorantkę, podziwiając tak skomplikowane konstrukcje semantyczne jak np. „*niefluorescencyjny element wygaszający wiążący się do małego rowka*” (MGB-NFQ), czy nawet zgoła oczywiste „*grupowe regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne*”, znane jednak znacznie lepiej i powszechnie jako CRISPR/Cas9. Jest tylko jeden aspekt, na który chciałem zwrócić uwagę. Doktorantka zamieszcza we wstępie pracy wiele rycin zaczerpniętych z danych literaturowych, oczywiście zawsze podając źródło. Niemniej, skoro podjęta została decyzja o pisaniu pracy w języku polskim, wydaje się, że logiczną konsekwencją byłoby przynajmniej przetłumaczenie nazw na rycinach również na język polski. Co więcej, Doktorantka podaje niemal zawsze, że rycina została sporządzona „*na podstawie*”, a w większości przypadków, jest to zwyczajne wstawienie ryciny tożsamej z ryciną zamieszczoną w publikacji, do której się odwołano (przykładowo ryc. 1.8, 1.10, 1.12, 1.13, 1.14). Ten lekki dysonans estetyczny jest spowodowany faktem, iż Doktorantka zamieściła niezwykle starannie, sporządzone przez siebie, pomysłowo i przejrzysto przygotowane ryciny ilustrujące wyniki pracy. Być może zwyczajnie zabrakło czasu na bardziej wnikliwą obróbkę edytorską rycin zamieszczonych we wstępie.

Pomimo tych kilku krytycznych uwag dotyczących całości przedstawionej do oceny pracy doktorskiej (które – jestem przekonany – zostaną wyjaśnione podczas dyskusji w trakcie obrony) uważam, że praca jest niezwykle solidnie przygotowana. Najlepszym dowodem jest jej logiczny układ w części opisującej wyniki, gdzie Doktorantka opisuje kolejno napotkane problemy z opracowywanymi modelami, wskazując od razu jakie rozwiązania zostały zaproponowane dla ich rozwiązania. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej i analitycznym podejściu do prowadzonych doświadczeń.

Na koniec chciałem zwrócić uwagę na pierwsze dwie strony pracy obejmujące podziękowania dla bardzo licznej grupy osób, z którymi Doktorantka miała okazję współpracować. Podziękowania napisane w znacznie bardziej obszerny sposób niż zwyczajowo spotykany. Między wierszami można wyczytać, że Pani mgr Karolina Hajdukiewicz jest osobą lubianą i dobrze współpracującą w różnych zespołach. To ważny aspekt pracy naukowej, który z pewnością nie byłby możliwy do osiągnięcia bez Jej kompetencji, naukowej dociekliwości, zaangażowaniu i pasji – cech niezwykle cennych u naukowca wchodzącego w etap samodzielnego ubiegania się o środki badawcze i realizację już własnych projektów jako *post-doc*.

Podsumowując, stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie naukowej oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



Stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Panią mgr Karolinę Hajdukiewicz są bardzo wartościowe merytorycznie, zawierają duży element nowatorstwa i są dowodem biegłej znajomości skomplikowanych narzędzi badawczych. W związku z wysoką oceną merytoryczną pracy doktorskiej jak i zakresem badań w niej zawartych, prowadzonych w oparciu o zaawansowane, nowoczesne techniki z dziedziny transgeniki i biologii molekularnej, zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Karoliny Hajdukiewicz.

Z poważaniem,

dr hab. n med. Grzegorz Kreiner
Kierownik Zakładu Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk
31-343 Kraków, Smętna 12
tel: +48 12 6623335
e-mail: kreiner@if-pan.krakow.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Hajdukiewicz pt.

“Rola neuronów AgRP/NPY w rozwoju fenotypu otyłości u myszy z indukowaną delecją genu Dicer”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Hajdukiewicz została wykonana pod kierunkiem dr hab. Witolda Konopki oraz prof. dr. hab. Urszuli Wojdy w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie.

W ostatnich latach w neurobiologii nastąpiły przełomy technologiczne, takie jak rozwój technologii CRISPR/Cas9 która pozwala na precyzyjną edycję genomów tak w całym organizmie jak i lokalnie (wykorzystując nowoczesne wektory wirusowe). Rozwój sekwencjonowania pojedynczych neuronów w wybranej strukturze mózgu umożliwił poznanie wielu nowych klas neuronów. Dostępność tych technologii wprowadziła badania funkcjonalne w neurobiologii na całkiem nowy poziom.

W swojej pracy doktorskiej mgr Karolina Hajdukiewicz opisuje szereg doświadczeń wykorzystujących różne modele zwierząt transgeniczných, które ostatecznie doprowadziły do fascynującego odkrycia, że specyficzne usunięcie ekspresji białka Dicer, powodujące deplecję dojrzałych microRNA w populacji neuronów AgRP podwzgórza prowadzi do wzrostu masy ciała spowodowanej zwiększonym spożyciem pokarmu wyłącznie u samic. W pracy opisano kolejne kroki, które prowadziły do tego odkrycia począwszy od pierwotnej obserwacji, że w przypadku myszy Dicer CKO (*conditional knockout*) indukowana Tamoksyfenem rekombinacja w neuronach przodomózgowia prowadzi do zwiększonego poboru pokarmu i otyłości.

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Bibliografia zawiera 353 cytowania. Praca jest napisana, jasnym, zrozumiałym językiem dzięki czemu czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem.

We wstępie Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując rodzaje zaburzeń odżywiania i ich regulację przez specyficzne ośrodki znajdujące się w podwzgórzu, ze szczególnym uwzględnieniem roli jądra łukowego i zlokalizowanych tam neuronów AgRP i POMC. W drugiej części wstępu szczegółowo opisano biogenezę microRNA i ich rolę w regulacji procesów biologicznych. Ostatnią część wstępu stanowi omówienie narzędzi i metod wykorzystywanych do konstrukcji zwierząt modyfikowanych genetycznie w tym systemie Cre-loxP, CRISPR/Cas9 oraz rekombinowanych wektorów wirusowych AAV (*adeno-associated viruses*). Ogólnie uważam, że wstęp w sposób wystarczający wprowadza czytelnika do zagadnień opisanych w wynikach, zawiera wiele pomocnych, dobrze dobranych schematów ułatwiających zrozumienie często skomplikowanych strategii transgenizacji zwierząt.

Sekcja Materiały i Metody jest dostatecznie wyczerpująca, a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Autorka pracy szczegółowo opisała wszystkie wykorzystane linie myszy doświadczalnych, a było ich aż 12, oraz warunki ich genotypowania. Szczegółowo opisała też klonowanie sekwencji mysiego promotora genu AgRP i przygotowanie wektorów wirusowych AAV. Praca jest bogata metodycznie i widać, że do jej wykonania Autorka musiała opanować pracę ze zwierzętami doświadczalnymi, zaawansowane procedury takie jak domózgowe podawanie wektorów AAV, przygotowanie tkanek do analiz, immunofluorescencję i obrazowanie w mikroskopie konfokalnym, ale także metody biologii molekularnej i komórkowej.

Wyniki są opisane w sposób klarowny a ryciny przygotowano z należytą starannością. W pierwszej części tego rozdziału autorka analizuje znaczenie genu NPY dla rozwinięcia fenotypu otyłości u myszy Dicer CKO. W tym celu uzyskała myszy pozbawione ekspresji genów *Npy* oraz *Dicer1* w neuronach CaMKIIalpha. Analiza przyrostu masy ciała tych myszy wykazała, że brak genu *Npy* nie wygaszał fenotypu otyłości u zwierząt pozbawionych miRNA w neuronach przodomózgowia, a wręcz przeciwnie, zwierzęta znacząco zwiększyły swoją masę. Autorka na str. 93 pisze: „Wyniki tego doświadczenia są podstawą do wniosku, że ani gen *Npy* ani jego białkowy produkt nie są kluczowe w rozwinięciu otyłości u myszy z neurospecyficzną delecją *Dicer1* w neuronach przodomózgowia”. Jak zatem wytłumaczyć istotne różnice w przyroście masy ciała pomiędzy myszami NPY-KO/DicerCKO i Dicer CKO w 7 i 8 tygodniu po indukcji Tamoksyfenem (Ryc 4.1)?

Następnie autorka analizowała myszy z indukowanym Tamoksyfenem wyciszeniem genu *Dicer1* w neuronach AgRP, jednak w tym przypadku brak satysfakcjonujących wyników był spowodowany niską wydajnością rekombinacji, co udowodniono dzięki wykorzystaniu kolejnych linii transgeniczných. Po tych niepowodzeniach Autorka pracy postanowiła zmienić strategię i regulować wyciszenie genu *Dicer1* przy pomocy wektorów wirusowych AAV z promotorem specyficznym dla neuronów AgRP. Dużego nakładu pracy wymagało z całą pewnością samodzielne sklonowanie mysiego promotora genu *Agrp*, stworzenie i przetestowanie niezbędnych narzędzi *in vitro* i *in vivo* do mikroiniekcji przygotowanych wektorów wirusowych do jądra łukowatego. Tutaj chciałam wyrazić mój podziw dla ogromnej pracy wykonanej przez doktorantkę w celu optymalizacji warunków doświadczeń z domózkowym podawaniem wektorów AgRP-specyficznych. Uzyskane wyniki wskazują na znaczny przyrost masy ciała myszy pozbawionych enzymu Dicer i cząsteczek miRNA w neuronach AgRP. Pomimo że wyniki przedstawione na Ryc. 4.14 są jednoznaczne, Autorka postanowiła stworzyć jeszcze jeden, bardziej precyzyjny od poprzedniego model badawczy, tym razem z wykorzystaniem narzędzi systemu CRISPR-Cas9. Dzięki jego zastosowaniu udało się wykazać, że neurony AgRP pozbawione ekspresji genu *Dicer1* są bezpośrednio odpowiedzialne w rozwinięciu otyłości związanej ze zwiększonym zapotrzebowaniem na pokarm. Co więcej efekt ten był obserwowany wyłącznie u samic.

Moje pytanie w związku z opisanymi wynikami dotyczy tego czy w modelu z wykorzystaniem wektorów wirusowych AAV (Ryc. 4.14) nie obserwowano efektu zwiększenia masy ciała zależnie od płci? Drugie pytanie dotyczy modelu CRISPR/Cas9 gdzie obserwowano efekt otyłości zależnej od płci. Czy potwierdzono spadek poziomu microRNA związany z inaktywacją genu *Dicer1* w jądrze łukowatym zarówno u samic jak i u samców? Jest to moim zdaniem niezbędna kontrola tych niezwykle interesujących eksperymentów.

Dyskusja zaczyna się od dobrze napisanego podsumowania uzyskanych wyników. Następnie autorka dyskutuje złożony charakter regulacji apetytu, który wynika z istnienia do niedawna jeszcze niezidentyfikowanych charakterystycznych populacji neuronów jądra łukowatego. Sposób dyskusji uzyskanych wyników wskazuje na dużą dojrzałość naukową doktorantki. Dyskusję uważam za wyczerpującą.

Opisywane przez Autorkę doświadczenia są często niezwykle złożone, zwłaszcza nazewnictwo wykorzystanych linii transgeniczných nastręcza trudności i wręcz „prosi się” o uproszczenie, jednak nazywanie zwierząt po prostu „mutanty” i „kontrolę” (stosowane w opisie

większości rycin) z całą pewnością nie jest poprawne. Proponowałabym używać np. myszy o genotypie dzikim lub myszy z delecją/mutacją prowadzącą do inaktywacji genu Dicer1. Innym niezręcznym sformułowaniem jest na str 29 neurpeptyd NPY jest „bardzo silnie konserwowanym ewolucyjnie peptydem” i na str. 152 mowa jest o „wysokim poziomie konserwacji ewolucyjnej”. Tutaj proponowałabym pozostać przy formie „sekwencja peptydu została zachowana w toku ewolucji”. Inne drobne uwagi to np. na stronie 25 „pęcherzykowaty transporter GABA”.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr Karoliny Hajdukiewicz spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie o dopuszczenie mgr Karoliny Hajdukiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

dr hab. Magdalena Dziembowska



Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego