

Poznań, 13 marca 2025 r.

Dr hab. Katarzyna Dorota Raczyńska, prof. UAM
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Joanny Przybyś pt.: „Rola genu *c-fos* w rozwoju fenotypu otyłości w mysim modelu z neurospecyficznym i indukowalnym usunięciem genu *Dicer1*”.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem pana dr hab. Witolda Konopki, a zrealizowana w Pracowni Modeli Zwierzęcych, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu FNP Team promotora. Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr Joanna Przybyś jest współautorką czterech publikacji naukowych, w tym trzech z listy JRC.

Tematyka badań koncentruje się wokół homeostazy energetycznej i zaburzeń metabolizmu oraz zmian plastyczności neuronalnej podwzgórza myszy po usunięciu genu *Dicer* (związanego z biogenezą miRNA) a następnie po usunięciu genu *c-fos* (genu wczesnej odpowiedzi komórkowej, związanego z rearanżacją sieci neuronalnych kontrolujących bilans energetyczny w odpowiedzi na deficyt kaloryczny). W pierwszej kolejności doktorantka scharakteryzowała zmiany metaboliczne myszy z indukowanym wyciszeniem *Dicer* (*Dicer* cKO), analizując profil metabolizmu glukozy i insuliny oraz wpływ aktywności fizycznej, hormonów tarczycowych i leptyny na pobór pokarmu i rozwój otyłości tych zwierząt. Uzyskane wyniki analizowała dodatkowo pod kątem płci zwierząt. Następnie, aby zbadać wpływ zaburzeń biogenezy miRNA na neuroplastyczność jądra łukowego, skoncentrowała się na analizie profilu ekspresji genu *c-fos* u zwierząt *Dicer* cKO podczas głodówki oraz po optogenetycznej stymulacji neuronów oreksygenicznego jądra łukowego. Wreszcie, wyprowadziła linię myszy *Dicer* cKO z wyciszeniem genu *c-fos* by zbadać wpływ białka c-Fos na rozwój hiperfagii i otyłości u tych myszy. Hipoteza badawcza zakładająca, że zaburzenia funkcji miRNA u myszy *Dicer* cKO prowadzą do zaburzenia programu ekspresji genów regulujących łaknienie została potwierdzona; doktorantka nie znalazła jednak mocnych dowodów na to, że do fenotypu obserwowanego u myszy *Dicer* cKO przyczynia się c-Fos.

Niewątpliwie, doktorantka włożyła w realizację założeń doktoratu bardzo dużo pracy. Przeprowadzenie badań wymagało od niej użycia szerokiego wachlarza technik, w tym zarówno podstawowych analiz wykorzystywanych w biologii molekularnej (barwienie z użyciem przeciwciał, RT-qPCR) jak i wielu metod związanych z badaniem zwierząt laboratoryjnych, włączając dosyć zaawansowane techniki, takie jak np.: fotostymulacja z wykorzystaniem implantów domózgowych, z którymi mgr Joanna Przybyś świetnie sobie poradziła. Zoptymalizowała kilka technik, a w przypadku niektórych podejść badawczych musiała podejmować różne, alternatywne strategie by je udoskonalić i osiągnąć założony cel

strona 1 z 4

(np.: przy wyprowadzaniu linii z wyciszeniem genu *c-fos*). Wykorzystała wyspecjalizowane metody by zwiększyć zakres i wartość swoich badań, np.: wybrane parametry metaboliczne myszy (pobór pokarmu, pobór wody, współczynnik wymiany oddechowej i wydatek energetyczny) analizowała z wykorzystaniem klatek metabolicznych a do wyciszenia genu *c-fos* użyła strategii celowanej by ograniczyć jego wpływ tylko do konkretnego typu wśród wielu różnorodnych komórek budujących jądro łukowate. Wyniki uzyskane w różnych eksperymentach były najczęściej spójne i pozwoliły na wyciągnięcie słusznych, bezspornych wniosków. Warto podkreślić, że w swojej dysertacji doktorantka opisuje również zmagania, które zakończyły się niepowodzeniem, przy czym potrafi również podać tego przyczynę.

Mimo niektórych rozczarowujących wyników, badania doktorantki niewątpliwie wnoszą do nauki istotne informacje na temat roli miRNA neuronów jądra łukowatego w kontroli metabolicznej i utrzymaniu poprawnych wzorców poboru pokarmu i wydatku energetycznego oraz funkcjonowania obwodów neuronalnych kontrolujących mechanizm łaknienia.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich. Na początku znajdujemy listę wszystkich skrótów oraz streszczenia pracy doktorskiej. Następnie, w bardzo rozbudowanym „Wstępie” zapoznajemy się z tematyką homeostazy energetycznej organizmu, z krótko i długoterminowymi sygnałami regulującymi bilans energetyczny, oraz ośrodkowymi mechanizmami regulującymi uczucie głodu i sytości, włączając udział miRNA w tej sieci. Ponadto, z uwagi na temat przewodni pracy, doktorantka opisuje również budowę i regulację ekspresji genu *c-Fos* i funkcję białka c-Fos w plastyczności neuronalnej podwzgórza. Przedstawia także systemy wykorzystywane w badaniach do wyprowadzenia linii zwierząt doświadczalnych z indukowanym, celowanym wyciszeniem genu *Dicer* i *c-Fos*. W kolejnej części wymienione są „Cele pracy”, „Materiały” i bardzo starannie opisane „Metody” wykorzystywane w pracy. Dalej zapoznajemy się z „Wynikami”, które uzyskała. Dysertację kończy „Dyskusja” napisana w sposób wnikliwy i dojrzały naukowo. Po dyskusji doktorantka podsumowała krótko swoje wnioski. Cała praca jest napisana rzetelnie i poparta licznymi publikacjami naukowymi - obszerna bibliografia liczy 340 pozycji.

Niestety, pod kątem merytorycznym, muszę zgłosić kilka zastrzeżeń. Po pierwsze, w mojej opinii „Wstęp” jest zbyt rozbudowany, zajmując około 40 stron dysertacji. Zawiera ogromną ilość informacji i szczegółów, co w efekcie, choć robi niezwykle wrażenie na temat wiedzy jaką dysponuje doktorantka, jest dosyć przytłaczające. Zwłaszcza, osoba niezbyt biegła w tej tematyce powoli zaczyna się gubić w gąszczu skomplikowanych sieci regulacji metabolicznych. Podobnie, zbyt rozbudowana moim zdaniem jest „Dyskusja” zawarta na około 30 stronach dysertacji. Dyskusja powinna być ograniczona do zwięzłego podsumowania wyników i rozważań na ich temat popartych dotychczasową wiedzą i konkluzjami doktorantki. W tej rozprawie dyskusja wygląda jakby była kontynuacją wstępu - znowu dostajemy mnóstwo informacji i danych literaturowych (w części niepotrzebnych lub powtarzanych) i dopiero w końcowych akapitach poszczególnych podrozdziałów znajdujemy odniesienia doktorantki do jej własnych wyników. Ponadto, choć w całej pracy znajdujemy liczne ryciny ilustrujące opisywane zagadnienia i otrzymane wyniki, w rozdziałach „Wstęp”, „M&M” oraz „Wyniki” często brakuje odniesienia do rycin w tekście, dlatego czasami trudno jest je śledzić.

Dodatkowa, drobna uwaga - autorka niepotrzebnie powtarza niekiedy w „Wynikach” opisy strategii i podejść eksperymentalnych, które już wcześniej opisała w „M&M”.

Należy jednak podkreślić, że cała rozprawa przygotowana jest w sposób niezwykle staranny, choć zdarzają się nieliczne błędy typu drobne literówki, nadmiar stawianych przecinków, czy użycie niewłaściwego rodzajnika przy słowie RNA, np.: „prekursorowe miRNA transportowane jest” zamiast „prekursorowy miRNA transportowany jest” czy „transaktywujące RNA” zamiast „transaktywujący RNA”. Zauważyłam też kilkakrotnie powtarzane rozwinięcia niektórych skrótów, np. promotora CAG na stronie 64 i 65. Rycina 1.6 jest przygotowana w języku angielskim, podczas gdy inne są w języku polskim; przy niektórych rycinach brak wyjaśnienia skrótów (Ryc. 1.5). Brakuje rycin 1.2, 1.4, 3.5, natomiast dwukrotnie jest rycina 4.3. W równaniach na stronie 71 powinny być zastosowane indeksy dolne. Z poważniejszych, merytorycznych błędów wyłapałam niedopatrzenia dotyczące sposobu działania miRNA – w kilku miejscach doktorantka pisze, że wpływają one tylko na translację – strona 139 „Brak miRNA uczestniczących w maszynerii hamującej translację...”, na stronie 149 „Jedną (z przyczyn) jest oczywista zmiana wynikająca z zaburzonej translacji białek po usunięciu miRNA”, podczas gdy mechanizm działania miRNA opiera się również na regulacji poziomu transkryptów. Z innych błędów: na stronie 51 doktorantka pisze: „Oprócz fosforylacji c-Fos ulega innym modyfikacjom posttranskrypcyjnym w tym acetylacji, glikozylacji, (poli)ADP-rybozylacji i ubikwitynacji” - są to modyfikacje potranslacyjne. Podobnie, w zdaniu na stronie 56 czytamy „Kasetę STOP stanowi krótka sekwencja zawierająca kilka kodonów stop, zapobiegających transkrypcji, a tym samym syntezie białka” - chodzi o zapobieganie translacji, nie transkrypcji. W zdaniu na stronie 58 czytamy „Każda domena odpowiada za trawienie jednej nici DNA” – zdanie to powinno brzmieć: „Każda domena odpowiada za przecięcie jednej nici DNA”. Na stronie 64 i 96 skrótem „DicerCas9” doktorantka określa linię DicerCas9-EGFP^{CamKIIαCreERT2}, a na stronie 131 innego mutantu - linię Dicer^{fl/fl}, nie wiem, czy jest to zamierzone, czy wynika z niedopatrzenia, niemniej, wprowadza zamieszanie. Niekiedy zdają się nieścisłości lub zbyt uogólnienia, jak w zdaniu „Za rozwój fenotypu otyłości odpowiedzialna jest mutacja w ARC”. Na stronie 108 zaś jest pomyłka liczby tygodni podanych w opisie wyników analizy konsumpcji wody.

Mam też kilka innych, drobnych merytorycznych uwag/pytań.

1. Uważam, że we Wstępie i Dyskusji niniejszej dysertacji, które to rozdziały są bardzo obszerne, za mało jest odniesienia do białka Dicer i miRNA – ich funkcji, poziomu i wpływu na deregulację metabolizmu. Wszak praca opiera się częściowo na analizie mutantu z wyciszeniem genu białka Dicer – kluczowego białka biogenezy miRNA, a pierwsze zdanie rozdziału „Podsumowania i wnioski” brzmi „Usunięcie dojrzałych cząsteczek miRNA wpływa na rozregulowanie homeostazy energetycznej i rozwój hiperfagicznej otyłości u myszy Dicer cKO”. We wstępie, na stronie 39 znajdujemy informację o tym, że „cząsteczki miRNA pełnią ważne funkcje w rozwoju układu nerwowego oraz plastyczności synaptycznej” ale więcej szczegółowych informacji znajdujemy dopiero na stronie 161 i 163. Na stronie 144 czytamy: „Myszy pozbawione genu Dicer1, w neuronach regulujących łaknienie w ARC wykazują wzrost transkryptów dla kluczowych neuropeptydów regulujących pobór pokarmu, co prowadzi do zaburzenia homeostazy energetycznej”, ale nie wiadomo jakich transkryptów. Czy

doktorantka mogłaby rozszerzyć te brakujące informacje? Z kolei, o miRNA, które bezpośrednio regulują gen *c-fos* dowiadujemy się dopiero na stronie 163, ich poziom ekspresji w 9 tyg. wyciszenia nie zmieniał się, jak wskazano na rycinie 5.7. Czy wiadomo jednak coś o poziomie tych miRNA w innych badanych punktach czasowych: w eksperymentach po wyciszeniu Dicer, podczas głodówki lub po optogenetycznej stymulacji jądra łukowatego? Ponadto, ciekawi mnie, czy na przykład, strategia wyciszenia konkretnego(ych) miRNA celującego w *c-fos* zamiast wyciszać całe białko Dicer lub strategia z aktywacją ekspresji genu *c-fos* poprzez stres chłodu (ekspozycja na zimno) zamiast głodówki mogłaby być zastosowana zamiennie w niektórych badaniach doktorantki?

2. Jak donosi doktorantka: „zaburzenia w ekspresji *c-fos* powodują rozregulowanie licznych genów związanych z plastycznością (...)” a „czynniki transkrypcyjne AP-1 jest zaangażowany w regulację ekspresji genów docelowych” – ciekawi mnie, czy doktorantka w swoich badaniach – np.: przy wyciszeniu ekspresji genu *c-fos* badała poziom ekspresji wymienionych wyżej genów docelowych regulowanych przez c-Fos i AP1?

3. W przypadku niektórych innych badań, gdzie doktorantka uzyskała niepewne/kontrowersyjne wyniki, błędy są raczej natury technicznej, np.: brak regulacji ekspresji genu *c-fos* może wynikać z niedoskonałości metody – nieprecyzyjnego miejsca wyciszenia lub niedostatecznego poziomu wyciszenia; a przy analizie z wykorzystaniem klatek metabolicznych niespójne parametry mogły wynikać z niewielkiej liczby testowanych osobników. Jakie dalsze rozwiązania zaproponowałaby doktorantka by poprawić lub uzupełnić swoje analizy? W pracy brakuje dalszych planów i perspektyw badawczych. Ponadto, czy zdaniem doktorantki, wyniki i obserwacje otrzymane z jej badań na zwierzętach można odnieść do ludzi? Jakiej strategii należałoby zastosować by je potwierdzić u ludzi?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Przybyś uważam za wartościową naukowo i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Badania naukowe doktorantki niewątpliwie dostarczają nowej, oryginalnej wiedzy na temat homeostazy energetycznej regulowanej przez oreksygeniczne i anoreksygeniczne neurony jądra łukowatego podwzgórza oraz wpływu miRNA na tę regulację i na c-Fos-zależną neuroplastyczność podwzgórza oraz potwierdzają umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktorantkę. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o **dopuszczenie mgr Joanny Przybyś do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Raczyńska
Katarzyna Dorota Raczyńska

strona 4 z 4

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Przybyś pt.:

Rola genu c-fos w rozwoju fenotypu otyłości w mysim modelu z neurospecyficznym i indukowalnym usunięciem genu Dicer1

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Praca ma układ zgodny ze standardami pracy naukowej i zawiera najważniejsze sekcje, takie jak wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję.

Wprowadzenie do pracy obejmuje 45 stron i stanowi solidną dawkę wiedzy wspomagającej zrozumienie tematyki pracy doktorskiej. Doktorantka omawia problematykę metabolizmu energetycznego organizmu oraz skomplikowany system jego regulacji, integrujący sygnały z tkanek peryferycznych (np. tkanek tłuszczowych, jelit, mięśni), oraz mechanizmy regulacji, które są wynikiem współdziałania sygnałów peryferycznych i sterowania przez układ nerwowy z udziałem różnego typu neuronów. Doktorantka wyjaśnia mechanizmy regulowania głodu i sytości, omawia peptydy i ich receptory oraz ścieżki przekazywania sygnałów na poziomie komórkowym. Dowiadujemy się wiele na temat regionów mózgu (jądro łukowate, hypothalamus) odpowiedzialnych za regulację wraz ze szczególnymi typami neuronów anoreksygenicznymi i oreksygenicznymi, plastyczności w aspekcie regulacji głodu i sytości.

We wprowadzeniu omówiono mechanizmy związane z aktywacją genu c-fos, którego transkrypcja jest wywołana przez bardzo wiele różnych mechanizmów. Cały wstęp jest napisany bardzo przejrzysto, niezwykle zrozumiale, z dbałością o właściwe zarządzanie skrótami, literaturą. Wstępowi towarzyszy duża liczba rycin, prostych, dobrze skomponowanych, a jednocześnie bardzo estetycznych i zachęcających do przyswajania

wiedzy. Natomiast, w mojej ocenie, we wstępie zabrakło istotnego opisu modelu Dicer cKO (wytworzonego przez Matthiasa Merckenschlagera), który wzbogaciłby wprowadzenie do tematyki. W spisie bibliografii nie uwzględniono również pozycji „Cobb et al., 2005”, która została zacytowana w tekście.

We wstępie nie znalazłem również bardziej szczegółowego omówienia wyników dotychczasowych badań zespołu (Winnikóv i in., 2014), a także (Foremna i Barco, 2016) i (Mang i in., 2015). Cel pracy podsumowuje te publikacje, ale jednak brakuje ich we wstępie. Dowiadujemy się, że „Dotychczasowe badania poczyniły znaczący krok w kierunku określenia mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowany fenotyp...”. Dalszy tekst nie zawiera informacji, na czym polegał ów znaczący krok oraz w jakim zakresie przyczynił się on do określenia wspomnianego fenotypu i mechanizmu.

Celem pracy była charakterystyka metaboliczna myszy DicerCaMKII α CreERT2 (Dicer cKO), ale w ten sposób nazwa modelu została wprowadzona dopiero w Materiałach i Metodach. We wstępie nie zawarto informacji, czy istnieją już badania, które mogą wyjaśniać pewne cechy metabolizmu u myszy DicerCaMKII α CreERT2 i które niewyjaśnione aspekty charakterystyki metabolicznej należy jak najpilniej uzupełnić.

Drugi cel pracy, polegał na wyjaśnieniu wpływu usunięcia miRNA w neuronach na ich plastyczność regulującą mechanizm łaknienia w jądrze łukowatym podwzgórza (ARC). Z pomocą barwień immunocytochemicznych badano, jak c-fos aktywuje się w sposób niekanoniczny w neuronach oreksygenicznych i anoreksygenicznych w odpowiedzi na głód i podanie pokarmu. Narzędziem badawczym do zbadania bezpośredniej aktywacji c-fos była tutaj między innymi optogenetyczna regulacja genu c-fos w ARC, wyłączenia genu c-fos bez i z wyłączeniem genu DICER z pomocą celowanej indukowanej ekspresji CRISPR/Cas9 razem z dostarczeniem gRNA z pomocą AAV.

Eksperymenty w pracy wyróżniają się bardzo efektywnym i solidnym podejściem, jednakże przedstawiają duży poziom złożoności, dlatego ich zrozumienie może stanowić spore wyzwanie. Praca zawiera co prawda ryciny takie jak 1.11 i 3.6 oraz wiele innych bardzo informatywnych i potrzebnych schematów, jednakże mogą być one niewystarczające. Sugeruje to potrzebę zawarcia w pracy całościowego ideowego schematu poszczególnych etapów pracy, czego zabrakło.

Co do celu pracy związanego z genem c-fos i jego rolą w neuronach AgRP, to niejako automatycznie nasuwają się pewne wątpliwości ze względu na szeroko rozpowszechniony i wielotorowy charakter indukcji ekspresji tego genu. Wielofunkcyjny charakter c-fos sprawia, że uzyskanie precyzyjnych odpowiedzi na pytania badawcze z udziałem c-fos jako jednoczynnikowego sygnału może być trudne.

W pracy opisano krzyżowanie odpowiednich transgenicznych szczepów myszy w celu uzyskania inaktywacji genu Dicer w neuronach pobudzających przodomózgowia, charakteryzujących się ekspresją białka CaMKII α . W tym celu linię myszy CreERT2 (indukowaną tamoksifenem) pod promotorem CaMKII α krzyżowano ze szczepem myszy Dicer^{flox/flox}. Jednakże, wydaje się, że system ten jest dość mało selektywny w przypadku badania podwzgórza oraz neuronów oreksygenicznych i anoreksygenicznych. Co więcej, CaMKII α jest głównie ekspresowany w pobudzających neuronach glutaminergicznych, jednakże również posiada znaczący poziom ekspresji w neuronach GABA (scRNAseq). Istotne byłoby bardziej szczegółowe omówienie specyficzności zastosowanego systemu pod względem typów neuronów i obszarów przodomózgowia oraz jednoznaczności obserwacji wpływu delekcji Dicer na metabolizm w określonych neuronach. Jednakże wspomniano, że charakterystyka metaboliczna celująca w neurony zlokalizowane w ARC, a w szczególności w neuronach AgRP, została zbadana w innej pracy doktorskiej.

Co do metodologii pomiarów metabolicznych należy podkreślić ich wszechstronny dobór. W pracy wykorzystano test tolerancji glukozy i insuliny, rozwój insulinooporności, wchłanianie glukozy, monitorowanie tych parametrów w czasie. Do monitorowania metabolizmu użyto klatki metaboliczne Phenomaster z sensorami. Użyto też pomp osmotycznych do podawania hormonów. Z kolei do badania roli c-fos w neuronach przodomózgowia wygenerowano także kolejne szczepy myszy. Podwójnie transgeniczne szczepy pozwalające na indukcję neuronów oreksygenicznych kanałem wapniowym opsyną z pomocą światła oraz dla wywołania ekspresji c-fos najpewniej przez jony wapnia.

Sposób analizy statystycznej został również opisany w metodach, a podpisy pod każdą z rycin w wynikach zawierają odpowiadające wynikom wartości p. Statystyka jest wykonana naprawdę solidnie. Tak wykonana statystyka, w mojej opinii, bardzo dobrze sankcjonuje przyjętą interpretację wyników. Co do zastosowania poszczególnych testów statystycznych, zauważalne są drobne niekonsekwencje dotyczące doboru testów post hoc. Kiedy mamy do

czynienia właściwie wyłącznie z porównaniem dwóch grup, zastosowano test Sidak (wszystko ze wszystkim), który w mojej ocenie mógł zostać zastąpiony testem Tukeya. Znowu w innym miejscu jest zastosowany Tukey, gdzie w moim odczuciu powinien być Sidak, a w innym, gdzie jest Sidak, moim zdaniem bardziej odpowiednim powinien być Dunnet. Jednakże, w mojej ocenie, nie są to jednoznaczne błędy. Liczba zwierząt n jest wyraźnie i starannie przytoczona w opisie poszczególnych eksperymentów dla każdej grupy badawczej.

Sekcja wyników bardzo starannie opisuje przeprowadzone eksperymenty i obrazuje ogromny nakład pracy włożony w cały doktorat. Poszczególne subsekcje wyników przeważnie zawierają na początku zdania dotyczące celu danego eksperymentu, a na końcu sekcji podsumowanie opisanego eksperymentu. W moim przekonaniu, taki układ jest bardzo dobry i pozwala podążać za wątkami, których jest niemało w pracy. W całej pracy i co najważniejsze, w opisie wyników znajdują się prawidłowe i częste odwołania do rycin, przez co analiza wyników jest bardziej przyjazna dla czytającego.

Pierwsza część wyników to charakterystyka metaboliczna zwierząt Dicer cKO z indukowanym usuniętym genem Dicer w neuronach przodomózgowia CaMKII α +. W przeszłości udokumentowano, że myszy takiej linii wykazują zaburzenia metabolizmu, zwiększony pobór pokarmu i tycie (40% tkanki tłuszczowej). Doktorantka pokazała, że zwiększony wydatek energetyczny (dostęp zwierząt do kołowrotka) tylko po części kompensuje ten fenotyp i jest zależny od płci. U samców w warunkach dostępu do kołowrotka następuje utrata masy ciała. Natomiast, samice chudną w grupie z dostępem, jak i bez kołowrotka i pobierają mniej pokarmu, co wskazuje na jakiś molekularno-metaboliczny lub neuroplastyczny mechanizm kompensacyjny. Wyniki ogólnie wskazują na pierwszy okres indukcji mutacji obejmujący 6 tygodni, w którym dzieją się zmiany metaboliczne, a następnie zmiany te normalizują się w następnych tygodniach. Podobnie dzieje się też z RER. Rodzi się pytanie o zakres specyficzność obserwowanych efektów, które występują w pierwszych tygodniach eliminacji genu Dicer. Zaindukowanie tamoksyfenem linii myszy Dicer cKO prowadzi zapewne do stopniowanej w czasie eliminacji genu Dicer i stopniowej eliminacji wielu miRNA w trybie, który nie jest jednakowo szybki we wszystkich zaindukowanych neuronach podwzgórza. Na taki stan organizm może reagować dość nietypowo. Badania metaboliczne w pracy ograniczają się do 9 tygodnia, dlatego nasuwa się pytanie o możliwość przeprowadzenia długoterminowej charakterystyki metabolicznej tych zwierząt. Zadziwiające

jest to, że adaptacja następuje dość szybko, a więc do 9 tygodnia. Czy w pracy doktorskiej, w której badano fenotyp usunięcia Dicer selektywnie w neuronach AgRP, również badano podobne parametry i obserwowano ten sam 6-9 tygodniowy wzór zaburzenia metabolizmu i kompensacji efektu. Proszę o spekulację i powołanie się na dowody z literatury, jakie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za taką kompensację. W pracy podawano myszom leptynę, która doprowadzała do częściowego łagodzenia fenotypu. Czy mechanizm związany z leptyną może grać rolę w mechanizmie kompensacji?

Druga część wyników dotyczy badania roli genu c-fos, skojarzonej z nim plastyczności (gdzie swoją rolę mają także miRNA) i jego wpływie na fenotyp metaboliczny przy usunięciu Dicer. Doktorantka wspomina, że publikacja T. Liu pokazuje, że podczas głodówki, a więc w stanie negatywnego statusu energetycznego, dochodzi do wzmożonej ekspresji genu c-fos - markera neuropatyczności i jest to pewna korelacja występowania dwóch czynników. Na podstawie tej korelacji Doktorantka stawia dość odważną i skomplikowaną hipotezę: „w Dicer cKO dochodzi do zaburzenia programu ekspresji genów regulujących łąknienie kontrolowanych przez IEG i że c-fos odgrywa rolę w rearanżacji sieci neuronalnych kontrolujących bilans energetyczny w odpowiedzi na deficyt kaloryczny” w warunkach braku Dicer (i braku miRNA). Natomiast, w dyskusji odnajdujemy wcześniejsze badania grupy badawczej z 2014 wraz z rezultatami, które pokazują, że brak różnic w ekspresji miRNA – potencjalnych regulatorów c-fos w linii Dicer-cKO. Sugeruje to, że hipoteza ta może mieć swoje ograniczenia. Dyskusja wspomina jednak, że w myszy tej mogło jednak dojść do ekspresji miRNA w innych otaczających komórkach, gdzie usunięcia Dicer nie było. Doktorantka w swojej hipotezie wspomina o „zaburzeniu programu ekspresji genów regulujących łąknienie”. Czy bezpośrednio zbadano już taki program regulowany przez IEG i c-fos, a później czy zbadano go w jakiś sposób przy braku Dicer?

Najważniejszym jednak rezultatem w pracy jest, w mojej ocenie, pokazanie, że c-fos zachowuje się w sposób niekanoniczny podczas głodzenia, kiedy jego ekspresja jest aktywowana w neuronach oreksygenicznym oraz po podaniu pokarmu, kiedy ekspresja ta wygasza się w tych neuronach i aktywuje w innym rejonie ARC w neuronach anoreksygenicznym w odpowiedzi na sytość. Natomiast, zachowuje się w sposób kanoniczny po optogenetycznej stymulacji neuronów oreksygenicznym, gdzie ekspresja wygasza się, czyli podobnie jak po stymulacji faktorem wzrostu itp. Natomiast, pewnym problemem w tym

eksperymentach jest to, że ARC jest relatywnie silnie połączone z wieloma ośrodkami w mózgu, które mogą być odpowiedzialne za włączanie i wyłączanie genu c-fos, np. przesyłanie bodźców stresowych doprowadzających do wzrostu łaknienia (zabranie pokarmu i głódówka) albo układu nagrody (kiedy pokarm zostaje myszy przywrócony). Dlatego precyzyjna interpretacja ekspresji genu c-fos w jądrze ARC może być utrudniona ze względu na potencjalną interferencję z sygnałami płynącymi do ARC z innych ośrodków w mózgu. Podsumowując wyniki dotyczące roli c-fos, nie udało się jednoznacznie wykazać, że mechanizmy związane z tym genem odgrywają kluczową rolę w kontroli masy ciała i pobieraniu pokarmu.

Mimo mojej naukowej krytyki, do której jestem zobligowany przygotowaniem recenzji, chcę podkreślić, że uważam przedstawione mi do oceny wyniki za naukowo ważne, wysoce ciekawe, oryginalne, bardzo starannie wykonane i pieczołowicie udokumentowane. Również dyskusja do pracy jest napisana z wielką dokładnością, przytacza wiele możliwych w świetle literatury alternatywnych wyjaśnień obserwowanych wyników i wskazuje konkretne kierunki badań. Dyskusja, mimo że wielowątkowa, bardzo pomogła mi zrozumieć całość wyników i całą pracę doktorską. Moje uwagi do pracy mają charakter pytań do dyskusji podczas obrony.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie pani mgr Joanny Przybyś do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Rozprawa została wykonana wysokim nakładem pracy, niezwykle starannie pod względem eksperymentalnym, z podjęciem ważnego problemu badawczego, wykorzystuje ogromny zasób innowacyjnych metod badawczych in vivo. Została napisana z niezwykłą dbałością o szczegóły i estetykę przekazu. Dlatego z przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu o wyróżnienie pracy pani mgr Joanny Przybyś.

Prof. dr hab. Maciej Figiel

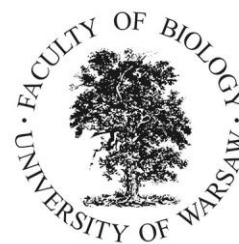


UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Biology

Department of Animal Physiology

Magdalena Dziembowska, PhD



10 czerwca 2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Przybyś pt.

“Rola genu *c-fos* w rozwoju fenotypu otyłości w mysim modelu z neurospecyficznym i indukowalnym usunięciem genu *Dicer1*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr **Joanny Przybyś** została wykonana pod kierunkiem dr hab. Witolda Konopki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie.

W ostatnich latach obserwujemy niezwykle rozwój leków pozwalających na kontrolowanie sygnałów sytości, opracowanych z wykorzystaniem analogów naturalnych polipeptydów takich jak np. GLP-1 (słynny semaglutyd) produkowany przez komórki jelita po posiłku. Tym bardziej istotne wydaje się zrozumienie molekularnych podstaw homeostazy energetycznej naszego organizmu, która jest kontrolowana w mózgu przez specyficzny obszar podwzgórza zwany jądrem łukowatym.

W swojej pracy doktorskiej mgr Joanna Przybyś kontynuuje badania prowadzone w Pracowni Modeli Zwierzęcych IBD im. M. Nenckiego, które doprowadziły do odkrycia, że specyficzne usunięcie ekspresji białka *Dicer1*, powodujące deplecję dojrzałych microRNA w populacji neuronów AgRP podwzgórza prowadzi do wzrostu masy ciała spowodowanej zwiększonym spożyciem pokarmu. Autorka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej przeprowadziła szereg doświadczeń oceniających stopień zmian metabolicznych myszy *Dicer1* cKO w tym z wykorzystaniem klatek metabolicznych, które pozwoliły na wyciągnięcie

wniosku, że myszy Dicer1 cKO cechuje obniżony wydatek energetyczny. W drugiej części pracy Autorka badała związek aktywacji genu *c-fos* z rozwojem fenotypu otyłości u myszy Dicer1 cKO. Pani mgr Joanna Przybyś zaobserwowała, że podczas głodówki ekspresja genu *c-fos*, który jest genem odpowiedzi wczesnej aktywowanym przejściowo, jest długotrwale podwyższona w neuronach AgRP/NPY co jest prawdopodobnie związane ze stale napływającymi peryferyjnymi sygnałami głodu, które wzmacniają pobudliwość tych komórek.

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze Wstępu, rozdziału opisującego Materiały i Metody, Wyników oraz z Dyskusji. Bibliografia zawiera 340 cytowania. Praca jest napisana, jasnym, zrozumiałym językiem.

Obszerny i bardzo ciekawie napisany Wstęp wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując homeostazę energetyczną organizmu, rolę peptydów sygnałowych, trzustki, tkanki tłuszczowej i wreszcie ośrodkową regulację mechanizmu głodu i sytości przez specyficzne ośrodki znajdujące się w podwzgórzu, ze szczególnym uwzględnieniem roli jądra łukowego i zlokalizowanych tam neuronów AgRP/NPY i POMC. Dalsza część Wstępu poświęcona jest opisowi roli mikroRNA w regulacji metabolizmu na poznanych do tej pory przykładach oraz biogenezie microRNA w komórce. Autorka opisując złożone procesy molekularne i komórkowe zachodzące w neuronach podwzgórza nie uniknęła skrótów myślowych, które czynią niektóre fragmenty tekstu trudnymi do zrozumienia, jak np. na stronie 43 gdzie opisuje rolę mitochondrialnego białka rozprzęgającego UCP2 czytamy „*mitochondrialne białko UCP2 obecne na zakończeniach aksonów w komórkach zaangażowanych w homeostazę energetyczną wpływa na efektywność procesów metabolicznych, autonomicznych i endokrynnych zachodzących w komórkach podwzgórza. Neurony c-Fos-pozytywne po manipulacjach takich jak głodówka lub ekspozycja na zimno wykazują masywne unerwienie przez zakończenia aksonów zawierające UCP2*”. Autorka pisze też, że wzmożona aktywność UCP2 „*stanowi sygnał do proliferacji mitochondriów*”. Termin proliferacja jest zarezerwowany raczej dla komórek, podczas gdy mitochondria ulegają w komórkach podziałom i fuzji (ang. fission/fusion), a nie proliferacji. Zakładam, że w tej części Wstępu chodziło Autorce o zasygnalizowanie potencjalnej roli mitochondriów w plastyczności synaptycznej neuronów jądra łukowego.

W dalszej części Wstępu Autorka pracy charakteryzuje geny odpowiedzi wczesnej ze szczególnym uwzględnieniem roli genu *c-fos* w plastyczności neuronalnej indukowanej w różnych sytuacjach fizjologicznych i patologicznych.

Ostatnią część Wstępu stanowi omówienie narzędzi i metod wykorzystywanych do konstrukcji zwierząt modyfikowanych genetycznie w tym systemu 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.

Sekcja Materiały i Metody jest dostatecznie wyczerpująca i nie mam do niej uwag krytycznych. Doktorantka szczegółowo opisała wszystkie wykorzystane linie myszy doświadczalnych oraz warunki ich genotypowania. Szczegółowo opisała też testy oceniające parametry metaboliczne badanej linii Dicer1 cKO, takie jak test tolerancji glukozy czy test tolerancji insuliny, analizy wydatku energetycznego i współczynnika oddechowego prowadzone w klatkach metabolicznych. Autorka pracy musiała podczas jej realizacji wykazać się sprawnością w pracy ze zwierzętami eksperymentalnymi, gdyż samodzielnie wykonywała szereg bardzo trudnych procedur takich jak podskórne wprowadzanie pomp osmotycznych w celu infuzji leptyny, pobieranie krwi myszy oraz implantacja światłowodu do optogenetycznej stymulacji jądra łukowatego. Obszerny rozdział poświęcono dokładnemu opisowi wyciszenia ekspresji genu c-fos przy użyciu technologii CRISPR-Cas9 i wektorów wirusowych AAV. Praca jest bogata metodycznie i jestem pod dużym wrażeniem ilości metod jakie Pani mgr Joanna Przybyś musiała opanować w trakcie jej realizacji. Wymieniając tylko kilka była to praca ze zwierzętami doświadczalnymi, zaawansowane procedury takie jak domózgowe podawanie wektorów AAV, przygotowanie tkanek do analiz, immunofluorescencja i obrazowanie w mikroskopie konfokalnym, a także metody biologii molekularnej i komórkowej.

Wyniki są opisane w sposób klarowny a ryciny przygotowano bardzo starannie. W pierwszej części tego rozdziału Doktorantka opisuje model doświadczalny, mysz z indukowanym usunięciem genu Dicer1 w neuronach przodomózgowia, oraz bada wpływ wysiłku fizycznego na masę ciała myszy i pobór pokarmu. Następnie Pani mgr Joanna Przybyś przeprowadziła szczegółową analizę parametrów metabolicznych myszy Dicer1 cKO z wykorzystaniem klatek metabolicznych.

W drugiej części pracy Autorka podjęła się określenia roli genu c-fos w rozwoju otyłości indukowanej delecją Dicer1 w neuronach przodomózgowia. C-fos jest genem odpowiedzi wczesnej indukowanej przez plastyczność synaptyczną, która w tym przypadku była indukowana głodem w neuronach ARC. Bardzo ciekawy wydaje mi się wynik

wskazujący na długotrwałą i nie indukowalną ekspresję c-Fos w oreksygenicznym neuronach NPY przy utrzymującej się głodówce. Nasuwa się tutaj pytanie czy inne struktury mózgu też ulegają stymulacji przy negatywnym bilansie metabolicznym i można w nich zaobserwować wzrost ekspresji genu c-Fos? Czy może Doktorantka wykonując barwienia zaobserwowała taką prawidłowość?

Ogólnie eksperymenty zostały poprawnie zaplanowane i przeprowadzone z dbałością o odpowiednią ilość powtórzeń biologicznych i kontroli. Tym bardziej zadziwiający jest pojedynczy słupek na wykresie Ryciny 4.16 C, który reprezentuje pobór pokarmu w gramach. Czy nie powinien się tam znaleźć (dla porównania), także słupek reprezentujący np. dobowe średnie spożycie pokarmu przez myszy niegłodzone?

Ciekawym aspektem, który przewija się w badaniach jest podejrzewany wpływ mutacji na regulację cyklu okołodobowego myszy. Na Rycinie 4.18 przedstawione są wyniki wskazujące na istotnie zwiększony w porównaniu do kontroli poziom ekspresji c-Fos w jądrze łukowatym myszy *Dicer1*cKO w fazie jasnej, czyli nieaktywnej dla myszy. Efekt jest obserwowany tylko 4 i 6 tygodniu po indukcji mutacji i wydaje się korelować ze zwiększonym przyjmowaniem pokarmu przez myszy *Dicer1* cKO w 6 tygodniu po indukcji mutacji również w fazie jasnej (Rycina 4.5). Wyniki te wydają się bardzo interesujące i jestem ciekawa czy zdaniem Autorki pracy indukcja mutacji mogłaby w jakiś sposób wpłynąć na regulację genów zegara biologicznego i czy obserwowany efekt dla 4 i 6 tygodni może mieć np. związek z wiekiem/dojrzałością myszy?

Mam jeszcze pytanie dotyczące wyniku przedstawionego na Rycinie 4.18 D, czy przy większej ilości powtórzeń biologicznych dałoby się zaobserwować spadek ilości komórek c-Fos pozytywnych w jądrze łukowatym w 10 tygodniu od indukcji mutacji u głodzonych myszy *Dicer1* cKO?

Obszerna Dyskusja, która liczy 33 strony jest sprawnie napisana i świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Zawiera między innymi bardzo ciekawy rozdział „Zależne od płci mechanizmy regulujące metabolizm”, z którego mogłam się dowiedzieć, że wbrew powszechnemu twierdzeniu, że badania na samicach myszy są obarczone większą zmiennością spowodowaną działaniem hormonów płciowych, to w rzeczywistości u samców obserwowana jest większa wariancja. Analiza i dyskusja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka potrafi nie tylko właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować odpowiednie techniki do ich wykonania, ale także prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z

wynikami uzyskanymi przez innych oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk. Dyskusję uważam za wyczerpującą.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska mgr Joanny Przybyś prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne**. Uzyskane przez Autorkę pracy wyniki są oryginalne i wskazują na istotną rolę miRNA w neuronach jądra łukowatego w regulacji metabolizmu i utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu. W związku z tym w mojej ocenie przedstawiona **rozprawa doktorska spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego**. Ponadto na podstawie zaprezentowanych w rozprawie wyników badań mogę stwierdzić, że **Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr **Joanny Przybyś** spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr **Joanny Przybyś** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz



Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego