

Warszawa 14.09.2020

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń  
Dyrektor Instytutu  
Kierownik Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marii Billert**  
**pt. „Feniksyna jako modulator elementów osi adipoinsularnej”**

Neuropeptydy wydzielane przez podwzgórze wpływają na metabolizm energetyczny organizmów. Feniksyna (PNX) jest stosunkowo niedawno zidentyfikowanym peptydem, który został po raz pierwszy wyizolowany z podwzgórza szczurów i serca bydła. Pierwsze badania wykazały, że PNX jest peptydem reprodukcyjnym, który wpływa na oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalną poprzez regulację ekspresji kisspeptyny, gonadoliberyny, receptora gonadoliberyny i hormonu luteinizującego. Dalsze badania wykazały, że PNX może odgrywać wiele ról w procesach fizjologicznych, takich jak hamowanie bólu trzewnego i wywoływanie świądu, wywoływanie niepokoju, poprawa pamięci. Najnowsze badania wykazały, że PNX wpływa na czynność skurczową serca poprzez szlaki Akt, eNOS i ERK1/2 oraz ma działanie przeciwzapalne w komórkach miazgi zębowej stypulowanej endotoksyną bakteryjną. Natomiast rola PNX w regulacji procesów metabolicznych nie jest poznana. Dlatego też, główny cel recenzowanej rozprawy tj. określenie wpływu PNX na właściwości, metabolizm oraz funkcję wydzielniczą adipocytów i komórek beta trzustki wydaje się być trafny i bardzo interesujący.

Praca doktorska mgr Marii Billert zrealizowana została na w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Marka Skrzypskiego. Rozprawa ma nietypowy układ i składa się z maszynopisu (w którym opisano, ale nie zaprezentowano graficznie wyników) i dołączonych do niego dwóch publikacji (zawierających opisywane w dysertacji ryciny z wynikami), których pierwszym autorem jest doktorantka. Maszynopis, który jak podano w rozprawie zawiera omówienie wspomnianych powyżej publikacji, ma 102 strony. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wykaz skrótów (3 strony), 2 i 3)

Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony), 4) Wstęp (25 stron), 5) Hipotezy i cele badań (2 strony), 6) Materiały i metody badawcze (13 stron), 7) Wyniki (7 stron), 8) Dyskusja (19 stron), 9) Wnioski (1 strona + 1 rycina podsumowująca), 10) Podsumowanie (2 strony), 11) Literatura (16 stron). Następnie do rozprawy dołączone są dwie publikacje (Billert et al. „Phoenixin-14 stimulates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes via cAMP/Epac-dependent mechanism” BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids (2018) 1863: 1449-1457 oraz Billert et al. „Phonexin-14 stimulates proliferation and insulin secretion in insulin producing INS-1E cells” BBA – Molecular Cell Research (2019) 1866: 118533) oraz odpowiednie oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie tych prac.

Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edycyjnym. Nie uniknięto jednak kilku niedociągnięć. W zestawieniu skrótów brakuje rozwinięcia, m.in. NEFA, PCOS itp., chociaż skróty te są używane w tekście. Część skrótów jest rozwinięta nieoprawnie, np. AMPK to kinaza białkowa aktywowana przez AMP a nie kinaza aktywowana przez AMP; HSL to lipaza zależna od hormonów a nie lipaza hormonowrażliwa itp. Poza tym skróty nie są konsekwentnie wprowadzane w tekście rozprawy. Standardem jest, że za pierwszym razem w tekście podajemy najpierw całą nazwę, np. danego białka oraz jego nazwę skrótową, która jest następnie konsekwentnie używana w dysertacji.

W rozdziale Wstęp doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące charakterystyki wysp trzustkowych i komórek beta trzustki, adipogenezy i funkcji wydzielniczej tkanki tłuszczowej, wzajemnych oddziaływań pomiędzy tkanką tłuszczową a trzustką, funkcji neuropeptydów w regulacji czynności komórek beta trzustki i adipocytów oraz funkcji biologicznych PNX. Rozdział Wstęp zawiera wszystkie niezbędne informacje, które wprowadzają czytelnika w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Rozdział ten, tak jak i cała praca, jest napisany klarownym językiem, a zrozumienie zamieszczonych w nim informacji ułatwiają trzy ryciny oraz dwie tabele. Pewien niedosyt pozostawia jedynie fakt, że przy przedstawianiu roli insuliny w regulacji metabolizmu adipocytów brak jest informacji o wpływie insuliny na proces różnicowania i żywotność adipocytów (pkt. 4, str. 27), a wiąże się to bezpośrednio z tematyką pracy.

Rozdział „Hipotezy i cele pracy” został podzielony na trzy oddzielne części: dla obu publikacji i wyników nieopublikowanych. Przedstawione w pracy hipotezy i cele w zasadzie się pokrywają, także nie jest jasne dlaczego użyto takiego sposobu ich zaprezentowania. Postawiono także hipotezę nadrzędną, że PNX oddziałuje na adipocyty i komórki beta trzustki oraz wpływa na produkcję insuliny i leptyny. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na pełną weryfikację tej hipotezy.



Modelem doświadczalnym w zaprezentowanych badaniach były komórki 3T3-L1, które różnicowano do adipocytów zgodnie z przyjętym powszechnie protokołem oraz pierwotne preadipocyty izolowane ze szczurów szczepu Wistar. W części dotyczącej wpływu PNX na komórki beta trzustki stosowano komórki INS-1E, MIN6 oraz wyizolowane ze szczurów wyspy trzustkowe. Rozdział „Materiały i metody badawcze” przynosi stosunkowo dokładne opisy przeprowadzonych procedur eksperymentalnych. Pokazuje on, że doktorantka opanowała szereg trudnych i czasochłonnych metod badawczych, takich jak: PCR w czasie rzeczywistym, analiza białek metodą Western blot, mikroskopia florescencyjna, testy ELISA. Do tego dochodzi sumienna analiza statystyczna otrzymanych wyników, w zależności od potrzeby za pomocą testu wariancji lub testu t-studenta. Wszystko to potwierdza duży potencjał naukowy Doktorantki. Przydatne natomiast byłoby podanie więcej szczegółów odnośnie metod detekcji oraz użytej do tego aparatury w rozdziałach 3.9 – 3.13 i 3.15.

Jak wspomniano wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zostały już opublikowane w dwóch pracach. Każda z tych prac zawiera po 7 rycin prezentujących rezultaty. Dodatkowo rozprawa zawiera dwie ryciny z danymi niepublikowanymi. Jak już wspomniałam, chociaż manuskrypt rozprawy zawiera opis wyników, to zostały one zaprezentowane jedynie w znajdujących się na końcu dysertacji publikacjach. Powód takiego sposobu zaprezentowania wyników jest niejasny, gdyż utrudnia to czytelnikom dokładną analizę uzyskanych danych. Do najciekawszych rezultatów otrzymanych przez Doktorantkę z pewnością należą odkrycia, że: 1) PNX jest produkowane i wydzielane przez adipocyty; 2) PNX zwiększa proliferację i wpływa na różnicowanie preadipocytów i efekt ten jest kontrolowany przez szlak cAMP/Epac; 3) PNX obniża ekspresję genu leptyny w adipocytach; 4) PNX wpływa na proliferację komórek beta poprzez szlak zależny od Akt-ERK1/2; 5) PNX zwiększa ekspresję i sekrecję insuliny; 6) glukoza i leptyna stymulują wydzielanie i produkcję PMX. Rozdział ‘Wyniki’ napisany jest klarownym językiem i przedstawia bardzo interesujące i nowatorskie dane.

Otrzymane przez doktorantkę oryginalne wyniki eksperymentalne zostały omówione w odniesieniu do dostępnego stanu wiedzy w rozdziale ‘Dyskusja’. Doktorantka krytycznie odniosła się do uzyskanych rezultatów, jednak odnoszę wrażenie, że rozdział ten (podobnie jak „Wyniki”) zyskałby gdyby nie został podzielony na trzy odrębne części (publikacja nr 1, publikacja nr 2, wyniki nieopublikowane). Publikacje naukowe rządzą się swoimi zasadami, natomiast rozprawa doktorska to miejsce, gdzie zaprezentowane dane można i należy połączyć w ciąg zależności metabolicznych i sygnałowych. Próbę tego procesu znajdujemy jedynie w rozdziale „Podsumowanie” i rycinie 6

(szkoda, że podpis do tej ryciny nie zawiera szerszego opisu zaprezentowanych na niej, odkrytych przez doktorantkę, zależności pomiędzy adipocytami i komórkami beta trzustki). Tym niemniej, cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Billert z łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z biologią adipocytów i komórek beta. Logicznym podsumowaniem zaprezentowanych i omówionych w Dyskusji wyników są zaprezentowane w 7 punktach wnioski.

Podkreślić należy także fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 273 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach.

Niezależnie od mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji, czuję się w obowiązku przedstawić kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu. Proszę o ustosunkowanie się do nich w czasie obrony:

1. Głównym miejscem ekspresji PNX jest podwzgórze. Uzyskane przez doktorantkę wyniki wskazują jednak, że podobny poziom ekspresji występuje także w komórkach INS-1E oraz wyspach trzustkowych szczura. Jaki może być powód tak wysokiej ekspresji neuropeptydu PNX w komórkach beta? Jak w odniesieniu do tych dwóch tkanek wygląda bezwzględna ekspresja PNX w adipocytach?
2. Stwierdzono aktywację szlaku Akt przez PNX w komórkach beta. Efektu takiego nie zaobserwowano w adipocytach. Co może być przyczyną tkankowo-specyficznego oddziaływania PNX na szlak Akt? Czy znane są receptory specyficzne dla PNX?
3. Wykazano, że wysokie stężenie glukozy stymuluje wydzielanie PNX, podobnie jak insuliny, przez wyspy trzustkowe. Czy istnieją podobieństwa w molekularnych mechanizmach sekrecji tych dwóch białek?
4. Praca porusza wiele interesujących i różnorodnych aspektów funkcjonowania adipocytów i komórek beta trzustki. Jej celem było poznanie roli PNX w działaniu osi adipoinsularnej, jednak jak wspominałam brakuje w rozprawie podsumowania łączącego mechanizmy/szlaki regulowane przez PNX i to w jaki sposób wpływają one na wzajemne oddziaływanie adipocytów i komórek beta. Proszę o schematyczne, ogólne podsumowanie przedstawionych w rozprawie wyników i wniosków.
5. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów odnośnie ich wkładu w powstanie dołączonych publikacji. Nie określono jednak, które konkretnie wyniki opisane w rozprawie zostały uzyskane przez Doktorantkę. Proszę o przedstawienie tej informacji w czasie obrony.



## **Wniosek końcowy**

Pracę doktorską mgr Marii Billert pt. „Feniksyna jako modulator elementów osi adipoinsubularnej” oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład w poznanie roli feniksyny w regulacji metabolizmu organizmów oraz wzajemnych zależności sygnałowych pomiędzy adipocytami a komórkami beta trzustki. Wyniki badań stanowiące podstawę dysertacji doktorskiej zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych w świetnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marii Billert spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz.455). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marii Billert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy prowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

*A. Dolanys*