

Maria Skrzyszowska

30 października, 2019 r.

Instytut Zootechniki - Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
Balice/Kraków

OCENA

dorobku naukowego monotematycznego cyklu prac pt.: „**Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym**” –
dr Marty Czernik,
w postępowaniu habilitacyjnym

1. Dane ogólne

Dr Marta Czernik ukończyła studia w 2004 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (Laboratorium Biologii Komórki), Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie i uzyskała tytuł magistra biologii. W tym samym roku rozpoczęła 3-letni staż naukowy w Stanach Zjednoczonych jako stypendystka NIH (*National Institutes of Health*) na Wydziale Neurobiologii/Neurologii, w Centrum Neurowirusologii Uniwersytetu Temple w Filadelfii, USA (*Department of Neuroscience, Centre for Neurovirology at Temple University School of Medicine*). Od 2007 roku do dziś, zatrudniona jest na Uniwersytecie Teramo, Włochy (*University of Teramo, Italy*), na Wydziałach Medycyny Weterynaryjnej oraz Nauk Przyrodniczych i Technologii Rolno-Spożywczej, od 2010/2011, na stanowisku starszego asystenta, a od 2017 na stanowisku wykładowcy. Pracę doktorską pt.: „Rola wirusa antygenu T w procesie nowotworowym na przykładzie ludzkiego glioblastoma” obroniła na Wydziale Lekarskim UJ, uzyskując w 2012 roku, stopień doktora nauk medycznych, w dyscyplinie Biologia Medyczna. Trzy lata później (w 2015 roku) uzyskała stopień doktora nauk weterynaryjnych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Teramo, na podstawie pracy pt.: „*Development of lyophilization procedure for long-term storage of somatic cells and gametes*”.

2. Ocena dorobku naukowego

Dorobek publikacyjny dr Marty Czernik jest bardzo wartościowy zarówno pod względem liczby publikacji jak i ich jakości, obejmuje łącznie 26 oryginalnych prac, w tym 5 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego i 3 prace przeglądowe. Habilitantka jest również współautorem rozdziału w monografii. Według danych bibliometrycznych, łączny współczynnik wpływu (IF) wszystkich prac opublikowanych i zamieszczonych w bazie JCR wynosi, IF=116,302 (bez osiągnięcia naukowego; IF=82.049); a liczba punktów MNiSW=1015 (bez osiągnięcia naukowego - 815 pkt.). O wartości tych publikacji świadczą liczne cytowania, łączna ich liczba wynosi - 275 (bez autocytowań - 259), a indeks Hirscha – 11 (wg bazy *Web of Science*). Dorobek naukowy dr Marty Czernik uzupełniają doniesienia na konferencje międzynarodowe i krajowe. Należy wyróżnić jej aktywny udział w tych przedsięwzięciach, jest autorem/współautorem 42 komunikatów na konferencje międzynarodowe, w tym 8 doniesień opublikowanych w recenzowanych czasopismach z bazy JCR (łączny IF=14,155; 190 pkt.

MNiSW. Wygłosiła również 5 referatów na konferencjach międzynarodowych, m.in. w Teramo i Palermo (Włochy), w Brnie (Czechy) oraz Okinawie (Japonia).

Należy także uwypuklić zaangażowanie Habilitantki w realizację 9 projektów badawczych, głównie o wymiarze międzynarodowym (8/9 projektów; jeden z Narodowego Centrum Nauki). W dwóch była kierownikiem lub współkierownikiem, w pozostałych projektach wykonawcą, aktywnie uczestniczącym w realizacji badań. Większość tych projektów finansowana była (w dwóch przypadkach nadal jest) z funduszy europejskich, takich jak: *ERC Starting Grants*, oraz projekty realizowane w ramach europejskiego programu *H2020*, a także the *Knowledge-Based Bio-Economy* (KBBE). Habilitantka uczestniczyła również w projektach finansowanych przez Ministerstwo Edukacji Włoch, a także w projekcie finansowanym przez Narodowy Instytut Zdrowia (NIH; *National Institutes of Health*) w USA, w ramach stażu na uniwersytecie *Temple University School of Medicine* w Filadelfii (po ukończeniu studiów).

Głównym kierunkiem zainteresowań naukowych dr Marty Czernik jest szeroko rozumiana dziedzina embriologii eksperymentalnej/inżynierii embrionalnej i genetycznej, w szczególności zagadnienia związane z klonowaniem somatycznym zwierząt laboratoryjnych (mysz) jak i gospodarskich (owca), na drodze rekonstrukcji oocytów, wymienionych gatunków ssaków, z jąder komórek somatycznych. Jest to tematyka niezwykle interesująca, a w powiązaniu z transgenezą, atrakcyjna ze względu na potencjalne możliwości aplikacyjne tych metod w biofarmacji, medycynie transplantacyjnej czy w terapiach komórkowych. Niestety niska efektywność klonowania znacznie ogranicza te możliwości. Stąd, swoje zainteresowania naukowe Habilitantka ukierunkowała na poznanie mechanizmów/procesów odpowiedzialnych/współodpowiedzialnych za relatywnie niską skuteczność klonowania somatycznego. Od kilku lat, jej aktywność naukowa koncentruje się na problematyce badawczej dotyczącej przeprogramowania egzogennej chromatyny jądrowej pochodzenia somatogenicznego w środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanych oocytów i/lub zarodków klonalnych.

Z ważniejszych osiągnięć badawczych dr Marty Czernik, nie będących częścią jej dorobku habilitacyjnego, należy docenić badania, nad wpływem procesów przemodelowania i przeprogramowania somatogenicznego genomu jądrowego, w środowisku cytoplazmatycznym oocyty-biorecy, na funkcjonowanie i morfologię mitochondriów, w warunkach współlistnienia genetycznie odmiennych frakcji mitochondrialnego DNA (zarówno pochodzenia oocytarnego jak i somatogenicznego). Poznanie mechanizmu oddziaływania wspomnianych procesów na aktywność mitochondrialnego DNA, nie było dotąd przedmiotem badań, stąd podjęte przez Habilitantkę badania mają charakter pionierski. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują na zaburzoną ekspresję białek mitochondrialnych, co może sugerować/tłumaczyć częstość występowania zakłóceń na różnych etapach rozwoju zarodków i płodów klonalnych. Badania prowadzone są w ramach grantu SONATA 11, który Habilitantka uzyskała z Narodowego Centrum Nauki, z pierwszego miejsca na liście rankingowej. Moja uwaga dotyczy informacji podanej przez Habilitantkę, że badania innych autorów, cyt. „... są głównie ograniczone do analizy „homo/heterochromatyny mitochondrialnego DNA”. Myślę, że jest to jedynie niefortunne przejęzyczenie Habilitantki, a chodziło Jej o badania dotyczące zjawiska mitochondrialnej homo- i heteroplazmii.

Na podkreślenie zasługują także badania przeprowadzone przez Habilitantkę, w ramach podoktorskiego stażu, w Centrum Zasobów Biologicznych RIKEN w Tsukubie w Japonii, w laboratorium prof. Atsuo Ogury. Problematyka tych badań dotyczyła poprawy jakości blastocyst klonalnych u myszy i owiec w wyniku aktywowania ścieżki sygnałowej Wnt, w komórkach-dawcach jąder, poprzez inhibicję kinazy syntazy glikogenu-3 β (Gsk-3 β). Dobra jakość zarodków klonalnych, to warunek *sine qua non* prawidłowego przebiegu embrio- i fetogenezy.

Ciekawe badania, odbiegające od głównego nurtu zainteresowań naukowych Habilitantki, dotyczą problematyki konserwacji materiału biologicznego, w tym przypadku komórek somatycznych owcy, przy wykorzystaniu metody liofilizacji czyli procesu suszenia sublimacyjnego. Metoda liofilizacji pozwala efektywnie zabezpieczyć i przechowywać materiał biologiczny, nawet w temperaturze pokojowej, w odróżnieniu od powszechnie stosowanych metod kriogenicznych wymagających przechowywania materiału biologicznego w bardzo niskich temperaturach (-80° do -196°C). Na obecnym etapie realizacji badań, Habilitantka, jako pierwsza wykazała, ekspresję trzech różnych białek hydrofilowych (LEA; z ang. *Late Embryogenesis Abundant*), które mogą ulegać odwracalnej dehydratacji i które chronią komórki somatyczne przed wysuszeniem. Badania te, realizowane w ramach europejskiego projektu H2020-MSCA-RISE-2016, współkierowane są przez Habilitantkę.

Dorobek naukowy dr Marty Czernik jest oryginalny i dowodzi opanowania przez Habilitantkę nowoczesnych technik/metod badawczych i świadczy o wysokich umiejętnościach planowania i prowadzenia badań naukowych. Jej dotychczasowa działalność naukowa została wielokrotnie doceniona, w postaci przyznanego grantu dla młodych naukowców (SONATA), a także stypendiów/staży, w wiodących ośrodkach naukowych na świecie, m.in. 4-letniego stypendium w Collegium Medicum UJ, post-doktorskiego stypendium w Tsukubie/Japonia, czy wspomniane wcześniej 3-letnie stypendia na Uniwersytecie Temple w Filadelfii/USA oraz na Uniwersytecie Teramo /Włochy. Podczas *International Symposium on Future of Nuclear Transfer and Nuclear Reprogramming* w Yamanashi/Japonia, Habilitantka została nagrodzona przez Sir John'a Gurdon'a (noblistę z 2012 roku) za najlepszą pracę zatytułowaną: „*Remodels fibroblast nuclei into spermatide-like structures*”.

Należy także podkreślić, że dr Marta Czernik jest cenionym recenzentem w wielu prestiżowych czasopismach międzynarodowych, m.in. takich jak: *Scientific Reports*, *Theriogenology*, *PLOS One*, *Cellular Reprogramming*, *Animal Reproduction Science*, i in.

3. Ocena monotematycznego cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym

Osiągnięcie naukowe pt.: „**Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym**” obejmuje cykl tematycznie powiązanych pięciu publikacji oraz patent europejski („*Improved method for reconstructing a non-human animal embryo*”). Prace te zostały opublikowane w latach 2015-2019, w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym współczynniku oddziaływania IF=34,194; liczba punktów MNiSW=200. Wszystkie prace objęte rozprawą habilitacyjną są współautorskie, w trzech publikacjach Habilitantka jest pierwszym autorem (w

publikacji z 2015 roku, Habilitantka jest jednym z dwóch równorzędnych pierwszych autorów), a w pozostałych dwóch jest drugim autorem. Procentowy udział Habilitantki, w przedstawionym do oceny cyklu prac, wynosi od 25% do 60% (w pracy nr 5, Habilitantka błędnie oszacowała swój udział procentowy), co potwierdzają załączone do dokumentacji oświadczenia współautorów, świadczące o ich udziale w powstaniu tych publikacji. Udział dr Marty Czernik w powstawaniu tego osiągnięcia naukowego był istotny i obejmował: opracowanie/współudział w opracowaniu koncepcji pracy, opracowanie/udział w opracowaniu metodyki badań oraz udział w przeprowadzeniu eksperymentów (m.in. w protaminizacji chromatyny jądrowej komórek somatycznych) i w opracowaniu oraz interpretacji uzyskanych wyników, a także w przygotowaniu manuskryptu.

Sformułowana przez Habilitantkę hipoteza badawcza zakłada, że przemodelowanie jądra komórki somatycznej w kierunku upodabniającym go do jądra komórki plemnikowej może znacząco ułatwić jego przeprogramowanie w środowisku cytoplazmatycznym oocyty ssaków i tym samym przyczynić się do poprawy skuteczności klonowania somatycznego.

Za najważniejsze osiągnięcia przedłożonego do oceny cyklu publikacyjnego uważam:

- 1. Opracowanie nowatorskiej metody protaminizacji chromatyny jądrowej komórek somatycznych w warunkach hodowli *in vitro*** - metodą transfekcji (lipofekcji) konstrukcji genowej zawierającej m.in. gen kodujący ludzką lub mysią protaminę 1 (*hPrm 1* lub *mPrm1*) lub jego zmutowaną postać, sprzężony z reporterowym genem białka zielonej lub czerwonej fluorescencji (*Prm1-GFP* lub *Prm1-RFP*), za pośrednictwem syntetycznego nośnika DNA, lipofektaminy 2000.
- 2. Uzyskanie konwersji interfazowego jądra pochodzenia somatogenicznego w spermatydo-podobną strukturę** - Habilitantka wykazała, że wniknięcie protaminy 1 do interfazowego jądra komórki somatycznej indukuje zmianę sferycznej postaci jądra w postać wydłużoną charakterystyczną dla męskich komórek gametogenicznych (spermatyd). Stwierdziła także wysoką zastępowalność tym białkiem białka histonowego H2B, ale także histonu H3, trimetylowanego, w obrębie reszt lizyny 9 (H3K9me3; histon uznawany za kluczową przeszkodę w prawidłowym przeprogramowaniu genomu jądrowego komórki somatycznej).
- 3. Potwierdzenie odwracalności tego procesu po wprowadzeniu protaminizowanego jądra do środowiska cytoplazmatycznego oocyty-biorcy** - weryfikacja w oparciu o próbę *in vitro* klonowania somatycznego u owiec, z wykorzystaniem protaminizowanych jąder komórek somatycznych do rekonstrukcji enukleowanych oocytów. Habilitantka podkreśla pozytywny wpływ zastosowanej modyfikacji na efektywność uzyskanych zarodków klonalnych rozwijających się do stadium blastocysty (wzrost odsetka blastocyst z 4% w grupie kontrolnej do 14% w grupie eksperymentalnej). Stwierdza, że „...nikt wcześniej nie zaproponował efektywniejszej metody klonowania somatycznego u zwierząt hodowlanych”. Jest to o tyle zaskakujące stwierdzenie, że skuteczność klonowania somatycznego, oceniana w oparciu o potencjał *in vitro* zarodków klonalnych owcy i ich zdolność do osiągnięcia stadium blastocysty, u tego gatunku waha się w granicach 10-20% (dane na podstawie dostępnej literatury z lat 1998-2018).
- 4. Opracowanie udoskonalonego wzorca przemodelowania i przeprogramowania chromatyny jądrowej w warunkach hodowli *in vitro*** - poprzez synchronizację cyklu

mitotycznego hodowanych komórek somatycznych przed transfekcją, w fazach G0/G1 (24-godzinna deprivacja troficzna), a także poprzez utrzymanie wysokiego poziomu acetylacji białek histonowych, przy udziale trichostatyny A (TSA), odwracalnego inhibitora deacetylaz histonów. Zaproponowane modyfikacje procedur pozytywnie wpłynęły na przebieg protaminizacji, a także sprzyjały lepszej adaptacji egzogennych jąder somatycznych do warunków środowiska cytoplazmatycznego oocyty-biorcy.

Należy podkreślić, że wymienione osiągnięcia stanowią znaczący wkład w wyjaśnienie mechanizmu przeprogramowania jądra komórki somatycznej w cytozolu oocyty-biorcy, aczkolwiek osiągnięta efektywność klonowania somatycznego, po zastosowaniu protaminizowanych komórek somatycznych jako dawców jąder, jest nadal mało satysfakcjonująca. Opracowany model może jednak stanowić dobry punkt wyjścia do kontynuowania badań w kierunku weryfikacji skuteczności tej metody w warunkach *in vivo*, po przeszczepieniu uzyskanych zarodków do dróg rodnych samic-biorczyń, ale także do poszukiwania innych czynników, potencjalnie zaangażowanych w proces prawidłowego przeprogramowanie somatogenicznego jądra, w środowisku oocytarnej cytoplazmy komórki-biorcy. Jednak, nie mogę się zgodzić z opinią Habilitantki, że zaproponowana przez nią nowatorska metoda przeprogramowania jądra komórki somatycznej „...jest prostą metodą, dostępną dla każdego laboratorium podąża drogą natury i nie wymaga żadnych modyfikacji genetycznych”. Otóż, wymaga zarówno specjalistycznej wiedzy, precyzji, wysokiej klasy sprzętu i aparatury badawczej oraz zastosowania diagnostyki molekularnej, ale przede wszystkim wymaga modyfikacji genetycznej genomu komórki somatycznej, metodą lipofekcji z użyciem konstrukcji genowej zawierającej sekwencje (eksony) genów protaminy 1 (*Prm1*) oraz reporterowych białek zielonej lub czerwonej fluorescencji (*GFP* lub *RFP*). Dodatkowo, opracowana przez Habilitantkę metoda jest wspomagana poprzez modulację epigenetyczną za pośrednictwem trichostatyny A, która przyczynia się do podwyższenia stopnia acetylacji (hiperacetylacji) histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, co znacznie ułatwia inicjację i utrzymanie aktywności transkrypcyjnej transgenu trwale zintegrowanego z genomem komórki gospodarza.

Reasumując, cykl prac naukowych, wchodzących w skład ocenianego osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym dr Marty Czernik, oceniam wysoko. Uzyskanie tak znaczących wyników i osiągnięcie założonych celów było możliwe dzięki kompetencjom Habilitantki, dużej samodzielności, ale także dzięki dobrym umiejętnościom współpracy w grupach/zespołach badawczych. Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom warsztatu badawczego Habilitantki, opartego o nowoczesne techniki i metody badawcze oraz diagnostyczne, co umożliwiło uzyskanie wartościowych wyników, w tym posiadających cechy odkryć naukowych.

4. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dorobek dydaktyczny i organizacyjny dr Marty Czernik jest pokłosiem jej kariery zawodowej, rozwijanej w ośrodkach naukowych za granicą, przede wszystkim we Włoszech, na Uniwersytecie Teramo w Teramo. Należy podkreślić m.in. jej aktywność w prowadzeniu zajęć, głównie w formie wykładów, dla studentów z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Wydziału

Nauk Przyrodniczych i Technologii Rolno-Środowiskowej Uniwersytetu Teramo. Problematyka wykładów dotyczyła medycyny weterynaryjnej, biologii komórki i embriologii ssaków. Ponadto, Habilitantka była promotorem 6 prac magisterskich zrealizowanych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, a także sprawowała opiekę naukową nad doktorantami, pełniąc funkcję promotora pomocniczego w obu przewodach doktorskich.

Należy podkreślić aktywny udział dr Marty Czernik w aranżowaniu spotkań: inauguracyjnego (kick-off) i śródkresowego (*mid-term meeting*), ale także dwóch międzynarodowych szkoleń oraz konferencji międzynarodowej, organizowanych w ramach projektu H2020-MSCA-RISE-2016. Udział Habilitantki w tych przedsięwzięciach nie ograniczał się do prac w komitetach organizacyjnych, ale dała się poznać również jako kreatywny organizator sesji tematycznych i przewodnicząca jednej z nich.

Warto także podkreślić jej udział w międzynarodowej, interdyscyplinarnej sieci badawczej, działającej w ramach projektu H2020-MSCA-RISE-2016, w zespole naukowców pochodzących z 4 krajów europejskich (Włochy, Hiszpania, Francja, Węgry) i dwóch spoza Europy (Japonia i Tajlandia), której celem jest opracowanie, alternatywnej w stosunku do standardowej kriokonserwacji, strategii suchego zabezpieczania/przechowywania materiału biologicznego, w procesie liofilizacji. Habilitanta brała również udział w pracach prowadzonych w Centrum Zasobów Biologicznych RIKEN w Tsukubie/Japonia, problematyka badawcza dotyczyła zagadnień związanych z przeprogramowaniem jąder komórkowych. Należy także zaakcentować członkostwo Habilitantki w sieciach badawczych *COST Actions*, wypracowanych w ramach Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (COST).

5. Podsumowanie

Dr Marta Czernik posiada bardzo wartościowy dorobek naukowy, który stanowi istotny i oryginalny wkład do nauki światowej w zakresie inżynierii embrionalnej i genetycznej. Wyniki badań przedstawionych w pracach wchodzących w skład ocenianego osiągnięcia naukowego, mają znaczenie poznawcze, z wyraźnym wskazaniem na wysoki potencjał aplikacyjny. Konsekwencja badawcza, spójność tematyczna oraz wysoki poziom merytoryczny prac opublikowanych przez dr Martę Czernik, potwierdzony wartościami współczynników wpływu i liczbą cytowań, świadczą o Jej znaczącej pozycji w środowisku naukowym, a także o kreatywności i dużej samodzielności, a to bez wątpienia predestynuje Ją do stanowiska samodzielnego pracownika naukowego.

Tym samym stwierdzam, że wskazane przez dr Martę Czernik osiągnięcie naukowe, a także jej całokształt dorobek naukowy oraz działalność dydaktyczna i organizacyjna spełniają wymogi Ustawy i wnoszą o nadanie dr Marcie Czernik stopnia doktora habilitowanego.



Prof. dr hab. Maria Skrzyszowska