

prof. dr hab. Daniel Lipiński
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań

Ocena osiągnięcia naukowego
oraz
aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

dr Marty Czernik

w związku z postępowaniem o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika

1. Przebieg pracy zawodowej

Pani dr Marta Czernik ukończyła studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w 2004 roku. Po ukończeniu studiów odbyła trzyletni staż naukowy w Department of Neuroscience, Centre for Neurovirology, Temple University, w Filadelfii (USA), w zespole prof. Kamel Khalili. Uzyskane podczas pobytu w Filadelfii wyniki badań stały się podstawą rozprawy doktorskiej pt. „*Rola wirusa antygeny T w procesie nowotworowym na przykładzie ludzkiego glioblastoma*”. Stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna uzyskała na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego w roku 2012. W roku 2007 po powrocie ze stażu Kandydatka została zatrudniona w University of Teramo (Włochy), Faculty of Veterinary Medicine, gdzie pracuje do chwili obecnej pod kierunkiem prof. Pasqualino Loi. W latach 2013-2014 odbyła staż w RIKEN BioResource Research Center, Bioresource Engineering Division, University of Tsukuba (Japonia) pod kierunkiem dr Atsuo Ogura. W roku 2015 uzyskała stopień doktora nauk weterynaryjnych na podstawie rozprawy pt. „*Development of lyophilization procedure for long-term storage of somatic cells and gametes*” w University of Teramo, Faculty of Veterinary Medicine. Od roku 2017 do chwili obecnej współpracuje w ramach realizacji projektu SONATA 11 z zespołem prof. Jacka A. Modlińskiego z Zakładu Embriologii Doświadczalnej, Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu.

2. Charakterystyka osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe dr Marty Czernik, zatytułowane „**Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym**”, obejmuje trzy prace oryginalne, dwie prace przeglądowe i jeden europejski patent. Łączny współczynnik oddziaływania tych publikacji **IF** wynosi **34,194** (w tym prac oryginalnych **20,668**), punktacja wg kryteriów **MNiSW** – **200 pkt.** (w tym prac oryginalnych **130**). Habilitantka jest pierwszym autorem dwóch prac oraz drugim autorem kolejnych dwóch prac (w tym jednej z równym wkładem jak pierwszy autor). Prace wchodzące w skład Jej osiągnięcia naukowego ukazały się w latach 2015-2018. W załączonych oświadczeniach współautorzy opisują sposób i zakres swojego uczestnictwa w wykonywaniu badań i przygotowaniu poszczególnych artykułów. Z oświadczeń wynika, że Habilitantka pełniła znaczącą rolę w przeprowadzeniu badań przedstawionych w pracach stanowiących Jej osiągnięcie naukowe (łącznie z przygotowaniem manuskryptów) (wkład od 25 do 60%). Do swojego osiągnięcia naukowego Kandydatka włączyła niżej wyszczególnione prace:

1. Czernik M, Anzalone DA, Palazesse L, Oikawa M, Loi P. 2019. Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. *Int J Dev Biol*, 63, 123-130 (IF₂₀₁₈ = 2.4, MNiSW = 25 pkt).
2. Palazesse L, Czernik M, Iuso D, Toschi P, Loi P. 2018. Nuclear quiescence and histone hyperacetylation jointly improve protamine-mediated nuclear remodeling in sheep fibroblasts. *Plos One*, 15, 13, e0193954 (IF_{2017/2018} = 2.766, MNiSW = 40 pkt).
3. Czernik M, Iuso D, Toschi P, Khochbin S, Loi P. 2016. Remodeling somatic nuclei via exogenous expression of protamine 1 to create spermatid-like structures for somatic nuclear transfer. *Nat Protoc*, 11, 2170-2188 (IF₂₀₁₆ = 10.032, MNiSW = 50 pkt).
4. Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. 2016. A New, Dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol*, 34, 791-797 (IF₂₀₁₆ = 11.126, MNiSW = 45 pkt).
5. Iuso D, Czernik M, Toschi P, Fidanza A, Zacchini F, Feil R, Curtet S, Buchou T, Shiota H, Khochbin S, Ptak GE, Loi P. 2015. Exogenous expression of human protamine 1 (hPrm1) remodels fibroblast nuclei into spermatid-like structures. *Cell Rep*, 1, 13, 1765-1771 (IF₂₀₁₅ = 7.87, MNiSW = 40 pkt).
6. Loi P, Iuso D, Czernik M, Zacchini F, Ptak G, Khochbin S, Fidanza A. 2015. Improved method for reconstructing a non-human animal embryo. Patent WO2015/162170 or PCT/EP2015/058701 przyznany przez European Patent Office.

Prace prezentowane jako osiągnięcie naukowe Kandydatki stanowią cykl tematycznie ze sobą powiązanych opracowań, które dotyczą opracowania metody przebudowy jądra komórki somatycznej (owcze fibroblasty) w jądro komórki plemnikowej w warunkach *in vitro*. Podjętą tematykę badawczą uzasadnia dotychczasowa niska wydajność uzyskiwania zwierząt metodą klonowania oraz obserwowane wady rozwojowe klonalnych zwierząt, co ogranicza jej praktyczne wykorzystanie na szerszą skalę w hodowli, biofarmacji i biomedycynie. Pełniejsze poznanie molekularnych mechanizmów warunkujących właściwe przeprogramowanie epigenomowo-zależnej aktywności transkrypcyjnej DNA komórek somatycznych, mogłoby przyczynić się zarówno do poprawy wydajności uzyskiwania zwierząt tą metodą, jak i poprawy ich stanu zdrowia. Ponieważ spermatogeneza jest skomplikowanym i bardzo mało poznanym procesem Kandydatka wybrała uproszczony układ doświadczalny obejmujący fibroblasty owcze i białko protaminy 1 (Prm1), połączone z białkiem fluorescencyjnym GFP lub RFP. Przy wyborze komórek donorowych Kandydatka kierowała się faktem, iż plemniki tryka zawierają tylko Prm1, które ponadto syntetyzowane jest w ostatecznej formie i nie podlega dodatkowym modyfikacjom potranskrypcyjnym.

Analiza prac prezentowanych w ramach osiągnięcia naukowego Kandydatki, pozwala wskazać kilka bardzo ważnych dokonań badawczych, które zostały w nich opisane:

1. Po transfekcji owczych fibroblastów konstrukcją genową zawierającą kasetę ekspresyjną z genem *Prm1* kodującym protaminę 1 człowieka, wykazano, że ekspresja *Prm1* przekształca okrągłe jądro komórki somatycznej w jądro przypominające kształtem jądro spermatydy tryka (Załącznik 3 I B 5). Całkowicie sprotaminizowane w ciągu 48 godzin komórki odrywały się od płytki hodowlanej, co dodatkowo powiązane było z zablokowaniem aktywności transkrypcyjnej (Załącznik 3 I B 3). Ponadto, protaminizowane jądra komórek somatycznych z widoku bocznego i czołowego wyglądały identycznie jak jądra komórek plemnikowych (Załącznik 3 I B 3).
2. Analiza CHIP-seq wykazała, że protamina 1 skutecznie wiąże się do DNA, a transfekcja komórek wykazujących stałą ekspresję histonu H2B połączonego z GFP, konstrukcją genową zawierającą kasetę ekspresyjną *Prm1*-RFP prowadziła do efektywnego zastępowania somatycznych histonów na protaminę 1 (Załącznik 3 I B 5). Ponadto wykazano, że *Prm1* skutecznie usuwa z jądra komórek somatycznych histon H3K9me3, który uznawany jest za jedną z głównych barier epigenetycznych w przeprogramowaniu jądrowym w procesie klonowania somatycznego. W całkowicie sprotaminizowanych jądrach komórek somatycznych nie stwierdzono jego obecności (Załącznik 3 I B 5).

3. Funkcjonalność przemodelowanych jąder komórek somatycznych sprawdzano przez ich wprowadzenie do enukleowanych oocytów owcy. Do enukleacji oocytów owczych zastosowano opracowaną uprzednio nową metodę enukleacji, w której wyeliminowano ekspozycję cytoplazmy oocytów na promieniowanie UV. Po 6 godzinach od wprowadzenia protaminizowanych jąder do enukleowanych oocytów zaobserwowano „pseudojądra”, porównywalnej wielkości do tych, które były obecne w zarodkach kontrolnych. Jednocześnie protamina była stopniowo zastępowana przez wariant histonu TH2B specyficzny dla oocytu. Odsetek zarodków rozwijających się do stadium blastocyty wzrósł 3,5-krotnie, w porównaniu z odsetkiem blastocyst po wprowadzeniu jąder nie poddanych protaminizacji. Morfologicznie uzyskane blastocysty nie różniły się od blastocyst kontrolnych uzyskanych drogą zapłodnienia *in vitro* (Zał. 3 I B 5).
4. Zastosowanie przed procedurą protaminizacji głodzenia komórek (48 godz., 0,5% surowicy), a następnie inkubacji w pożywce z trichostatyną A (16 godz., 50 nM) umożliwiło wprowadzenie komórek w stan G0. Zastosowana modyfikacja umożliwiła uzyskanie wzrostu odsetka całkowicie sprotaminizowanych jąder somatycznych z 30 do 45%. (Zał. 5 I B 2).

Oświadczenia współautorów dołączone do prac oryginalnych wskazują, że opracowania te powstały przy znaczącym udziale Kandydatki, a więc świadczą one o bardzo dobrym opanowaniu podjętej tematyki badawczej. Ponadto, prace oryginalne wchodzące w skład osiągnięcia naukowego Habilitantki wskazują na doskonałe opanowanie przez Nią złożonego warsztatu naukowego.

Podsumowując całokształt osiągnięcia naukowego Kandydatki należy stwierdzić, że zawiera ono liczne nowe dane. Habilitantka opracowała stabilny proces protaminizacji genomu komórek somatycznych i potwierdziła funkcjonalność przemodelowanych jąder komórek somatycznych przez ich wprowadzenie do enukleowanych oocytów owcy. Zaprezentowane osiągnięcie habilitacyjne otwiera również możliwości pełniejszego zrozumienia i wyjaśnienia mechanizmów przeprogramowania jąder somatycznych w cytoplazmie oocytów, spermatogenezy, imprintingu, roli protaminy i histonów w strukturze chromatyny plemnika. Opracowana procedura powinna przyczynić się do szerszego wykorzystania techniki klonowania somatycznego w programach hodowlanych mających na celu multiplikację monogenetycznego i jedнопłciowego potomstwa o wysokiej wartości hodowlanej i użytkowej.

3. Charakterystyka pozostałej istotnej aktywności naukowej

Poza publikacjami wyszczególnionymi w osiągnięciu naukowym, dr Marta Czernik jest współautorką **24 prac** (w tym 8 przed doktoratem) opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) o łącznym współczynniku IF wynoszącym 82,049 i punktacji MNiSW – 815. Ponadto Kandydatka jest współautorką jednego rozdziału w monografii. Wskaźniki naukometryczne łącznego dorobku Habilitantki są następujące: **IF – 116,243**, punktacja **MNiSW – 1015**, zaś indeks Hirscha wg bazy *Web of Science* – **11**. Liczba cytowań dorobku publikacyjnego Kandydatki w dniu 20 października 2019 r. – 282 (bez autocytowań - 251). Dorobek naukowy dr Marty Czernik uzupełniają referaty wygłoszone na konferencjach międzynarodowych – 5, komunikaty posterowe i prezentacje ustne prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych – 42. Doniesienia i referaty konferencyjne miały przeważnie charakter współautorski, przy czym Habilitantka była pierwszym autorem odpowiednio w 11 i 5 pozycjach. Kandydatka pełniła również funkcję recenzenta dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym – łącznie 27 recenzji.

Dorobek publikacyjny Habilitantki – nie wchodzący w skład Jej osiągnięcia naukowego – obejmujący 24 artykuły naukowe, jest efektem badań prowadzonych w niewielkich zespołach. O znaczącym udziale Kandydatki w tych badaniach świadczy fakt, że jest pierwszą autorką (lub z udziałem równoważnym z pierwszym autorem) w 5 opracowaniach (z wkładem wynoszącym 40-70%) oraz drugim w 6 publikacjach. Tematyka badawcza tego dorobku jest zróżnicowana, ale wspólnym jego

„mianownikiem” są badania ukierunkowane na poprawę kompetencji rozwojowych zarodków klonalnych. W badaniach tych wyróżnić można kilka głównych wątków, które m.in. dotyczą:

- 1) **badania wpływu zaburzeń w ekspresji białek mitochondrialnych na rozwój zarodków klonalnych** – prowadzone w ramach projektu SONATA 11. Habilitantka wysunęła hipotezę, że niekompletny proces epigenetycznego przemodelowania/przeprogramowania somatogenicznego aparatu jądrowego, prowadzi do zaburzeń ekspresji białek mitochondrialnych i nieprawidłowego funkcjonowania tych organelli, co skutkuje zaburzeniami w rozwoju łożyska i płodu oraz śmierci klonowanych zwierząt;
- 2) **badania wpływu zastosowania inhibitora kinazy syntetazy glikogenu 3 β w trakcie procesu przeprogramowania komórek somatycznych na jakość blastocyst uzyskanych metodą SCNT** – prowadzone w tym zakresie badania Habilitantka wykonała podczas pobytu na stażu podoktorskim w laboratorium Profesora Ogury w Instytucie RIKEN (Japonia). Prowadzone na mysich i owczych komórkach somatycznych prace dowiodły, że komórki dawcy traktowane inhibitorem Gsk3 β mają większą zdolność przeprogramowania jąder somatycznych, co wpływa korzystnie na jakość uzyskanych tą metodą blastocyst;
- 3) **opracowania alternatywnych metod liofilizacji komórek, tkanek i zarodków** – prowadzone badania mają na celu wykazanie możliwości wykorzystania białek LEA w procesie liofilizacji. Wstępne wyniki wykazały, że białka LEA pełnią funkcję ochronną względem fibroblastów owczych chroniąc je przed wysuszeniem.

Powyższe badania były i/lub są realizowane w ramach 9 projektów naukowych, spośród których Habilitantka jest kierownikiem jednego projektu finansowanego (SONATA 11) z funduszy Narodowego Centrum Nauki.

Podsumowując dorobek naukowy Habilitantki, należy stwierdzić, że jest on wynikiem pracy zespołowej, ale z Jej znaczącym udziałem. Kandydatka, prowadząc badania w wiodących ośrodkach naukowych i we współpracy z uznanymi specjalistami z zakresu uzyskiwania zwierząt metodą SCNT, opanowała nowoczesne techniki stosowane w tych badaniach, które następnie pozwoliły na wysokim poziomie wykonać eksperymenty, stanowiące główne Jej osiągnięcie naukowe. Wyniki badań opublikowane w pracach składających się na dorobek naukowy Kandydatki mają wysoką wartość poznawczą, jak również mogą mieć praktyczne zastosowanie w programach hodowlanych mających na celu zwiększenie liczby osobników zwierząt gospodarskich o szczególnie cennych genotypach, ratowania ginących ras zwierząt gospodarskich oraz dzikich gatunków ssaków zagrożonych wyginięciem, a także restytucji gatunków wymarłych.

4. Charakterystyka działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Marta Czernik jako wykładowca zatrudniony na Uniwersytecie w Teramo realizuje obciążenia dydaktyczne związane z tą funkcją, które obejmują zajęcia z zakresu medycyny weterynaryjnej, biologii komórki i embriologii ssaków. Była promotorem 6 prac magisterskich. Pełniła również funkcję promotora pomocniczego dwóch prac doktorskich realizowanych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Teramo. W zakresie działalności organizacyjnej na szczególną uwagę zasługuje Jej udział w licznych komitetach organizacyjnych międzynarodowych konferencji i szkoleń. Jest członkiem międzynarodowych organizacji naukowych COST Action, a także bierze udział w międzynarodowych konsorcjach i sieciach badawczych.

5. Podsumowanie

Dr Marta Czernik jest współautorką licznego i wartościowego dorobku publikacyjnego; w ramach głównego osiągnięcia naukowego – dotyczącego opracowania nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym, z kolei w zakresie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych – dotyczącego zaburzeń ekspresji białek mitochondrialnych mających wpływ na rozwój zarodków klonalnych, możliwości wykorzystania inhibitora kinazy syntetazy glikogenu

3β celem podniesienia kompetencji rozwojowych blastocyst uzyskanych metodą SCNT, a także roli białek LEA w ochronie komórek somatycznych poddanych procesowi liofilizacji. Badania opisane w ramach głównego osiągnięcia naukowego umożliwiły opracowanie nowej metody protaminizacji jąder komórek fibroblastycznych owcy przed transferem jądrowym. Funkcjonalność przemodelowanych jąder komórek somatycznych Habilitantka potwierdziła przez ich wprowadzenie do enukleowanych oocytów owcy obserwując 3,5-krotny wzrost odsetka zarodków rozwijających się do stadium blastocyty. Badania te wnoszą istotne nowe dane do wiedzy o mechanizmach przeprogramowania jąder somatycznych w cytoplazmie oocytów, oraz możliwości ich potencjalnego wykorzystania w praktyce w programach hodowlanych. Pozostałe prace, oprócz wartości poznawczej, w znacznej części charakteryzują się wysoką wartością pod względem aplikacyjnym. Dorobek naukowy Habilitantki, a szczególnie prace zaliczane do osiągnięcia naukowego, powstał/y przy znacznym Jej współudziale. W publikacjach, w których własny wkład był bardzo wysoki oraz w załączonym autoreferacie, Kandydatka wykazała się doskonałą znajomością realizowanej problematyki badawczej oraz bardzo dobrym opanowaniem wielu nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii rozrodu i embriologii. Posiada także wysokie kwalifikacje dydaktyczne oraz kwalifikacje niezbędne do pełnienia opieki merytorycznej nad doktorantami i studentami wykonującymi prace dyplomowe. **Na podstawie powyższej charakterystyki można wnioskować, że dr Marta Czernik jest bardzo dobrze przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz realizowania się jako samodzielny pracownik naukowy w warunkach akademickich.**

6. Wniosek końcowy

Analiza osiągnięcia naukowego zatytułowanego „*Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym*” oraz dorobku publikacyjnego i dydaktyczno-organizacyjnego dr Marty Czernik pozwala mi z pełnym przekonaniem stwierdzić, że jest Ona dobrze przygotowana do samodzielnej pracy naukowej. Habilitantka spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) w zw. z art. 179 ust 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym, popieram wniosek dr Marty Czernik, skierowany do Centralnej Komisji ds. Stopni Naukowych i Tytułów i postuluję by komisja habilitacyjna wystąpiła do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu z wnioskiem o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika.

Poznań, 24 października 2019 r.

