

prof. dr hab. Michał Witt
Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk
Poznań

Wpłynęło do Dziekanatu
Wydziału Biologii UJ
w dniu 25 WRZ. 2020



RECENZJA

**osiągnięcia naukowego pt: „Udział adhezji komórkowej i substancji międzykomórkowej
w rozwoju gonad myszy” oraz dorobku naukowo-badawczego, dydaktycznego,
popularyzatorskiego oraz aktywności naukowej dr. Rafała P. Pipreka
w postępowaniu habilitacyjnym**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr. Rafała Pipreka przygotowane zostało w formie spinki publikacji z obszernym komentarzem i poświęcone jest analizie mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw determinacji płci i kształtowania elementów strukturalnych jąder i jajników u myszy. Kandydat przedstawił pięć prac opublikowanych, które opisują osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę merytoryczną jego postępowania habilitacyjnego.

Droga zawodowa, praca naukowa i aktywność dydaktyczna

Pan dr Rafał Piprek pracuje jako adiunkt naukowo-badawczy w Zakładzie Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Dr Piprek studia wyższe odbył w Krakowie na Uniwersytecie Jagiellońskim, na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, uzyskując tytuł zawodowy magistra biologii w 2008 roku na podstawie pracy magisterskiej dotyczącej rozwoju gonad kumaka górskiego. W tym samym roku rozpoczął tamże studia doktoranckie i rozprawę doktorską pt. „Gonadogeneza u płazów bezogonowych *Anura*: komórkowe i molekularne procesy płciowego różnicowania się gonad” obronił z wyróżnieniem w 2013 roku.

Prowadzi zajęcia dydaktyczne dla studentów pierwszego i drugiego stopnia kierunku biologia, neurobiologia, ochrona środowiska oraz studiów biologiczno-geograficznych: ćwiczenia w ramach kursów: zoologii kręgowców, podstawy zoologii, histologii, histologicznych technik, anatomii porównawczej kręgowców, mikroskopii praktycznej i obrazowanie w biologii oraz seminaria dla doktorantów z biologii rozwoju. Stworzył autorski kurs dotyczący mechanizmów determinacji płci i różnicowania się komórek płciowych.

Opracował atlas mikrofotografii tkanek dla uczestników kursu Histologia. Był opiekunem naukowym studentów I i II stopnia. Jest promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim.

W ramach swojej aktywności akademickiej i dydaktycznej regularnie angażuję się w popularyzację nauki wśród dzieci i młodzieży uczestnicząc w Małopolskiej Nocy Biologów i Małopolskiej Nocy Naukowców oraz publikując artykuły popularnonaukowe.

W ramach działalności organizacyjnej stworzył pracownię hodowli *in vitro* w Zakładzie Anatomii Porównawczej UJ. Jako redaktor koordynował pracę trzydziestu autorów nad powstaniem monografii *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* wydanej przez Springer International Publishing w 2016 roku. Od 2018 roku jest koordynatorem Festiwalu Nauki i Sztuki z ramienia Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ. Organizuje także zajęcia praktyczne i wykłady dla uczestników zawodów III stopnia Olimpiady Biologicznej (zawody centralne).

Odbył półroczny staż podoktorski w Institute of Genetics and Development of Rennes we Francji, ponadto trzy staże krótkoterminowe: w UC Berkeley, Nowym Jorku (Rockefeller U) i w Heidelbergu (EMBO).

Całościowy dorobek naukowy

Po uzyskaniu stopnia doktorskiego dorobek naukowy kandydata, poza habilitacyjnym osiągnięciem naukowym, obejmuje 17 prac: we wszystkich, poza jedną, jest pierwszym autorem. W tym okresie był również współautorem 4 rozdziałów w monografiach naukowych (w tym w wydanych przez tak poważane oficyny jak CRC Press czy Wiley-Blackwell) oraz redaktorem monografii wydanej przez Springer Verlag. Sumaryczny IF jego publikacji wynosi 48,8; łączny IF poza osiągnięciem naukowym 32,921; liczba cytowań (WoS^{cc}) 175; indeks Hirscha (WoS^{cc}) 8, punktacja MNiSW 923.

Był kierownikiem projektów OPUS 8 z NCN (2015-2017), Iuventus Plus (2015-2017) i SONATA 6 (2014-2017) oraz był wykonawcą w 5 innych projektach.

Dwukrotnie uzyskał prestiżowe stypendium START z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz kilka nagród wewnątrzuczelnianych. Brał aktywny udział w konferencjach międzynarodowych i krajowych.

Osiągnięcie naukowe będące podstawą habilitacji

Pięć prac przedstawionych przez kandydata jako osiągnięcie naukowe dotyczy molekularnych i genomicznych aspektów adhezji komórkowej oraz biologii substancji międzykomórkowej jako elementów mechanizmu kształtującego rozwój gonad u myszy.

W pracy Piprek et al (2017) w *Mechanisms of Development* kandydat wykazał, że ekspresja wielu genów adhezji komórkowej (129 z 220 znanych) jest związana z różnicowaniem się gonad myszy. Większość z nich ulegała ekspresji na niskim poziomie lub nie wykazywała znaczących różnic w poziomie ekspresji między gonadami XX i XY w okresie ich płciowego różnicowania się. Część z genów wykazywała specyficzną płciowo ekspresję, co sugerowało ich rolę w kształtowaniu się struktury jąder i jajników. W różnicujących się jądrach 83 geny adhezji komórkowej ulegały wysokiej ekspresji, podczas gdy w różnicujących się jajnikach stwierdzono ekspresję 68 genów. W różnicujących się jądrach myszy komórki grupują się w lite, wydłużone struktury zwane sznurami jądroowymi, podczas gdy w różnicujących się jajnikach takie struktury nie powstają. Publikacja wskazuje, które z genów adhezji komórkowej potencjalnie mogą być zaangażowane w takie kształtowanie się różnic w strukturze gonad męskich i żeńskich. Innym zagadnieniem poruszonym w publikacji jest zjawisko segregacji poszczególnych typów komórek w obrębie gonad podczas wyodrębniania się struktury jąder i jajników. Komórki germinalne zostają otoczone przez komórki podporowe, które odseparowują się od komórek interstycjum/stromy. Analiza ekspresji genów wskazała podobieństwa i różnice w ekspresji genów adhezji komórkowej pomiędzy oboma typami komórek.

Celem pracy Piprek et al. (2019) w *Reproduction* było zbadanie roli kadheryny E w rozwoju gonad myszy. Kadheryna E jest białkiem transbłonowym, którego działanie jest zależne od wapnia, występuje głównie na powierzchni komórek nabłonkowych i odpowiada za ich adhezję komórkową. Dzięki homotypicznemu łączeniu się białek powierzchniowych, komórki tego samego typu łączą się ze sobą w procesie tworzenia tkanek. Ponieważ mysie nokauty pozbawione kadheryny E nie dożywają etapu, w którym rozwijają się gonady, konieczne było zastosowanie nokautu specyficznego tkankowo. Nokaut kadheryny E w somatycznych komórkach gonad spowodował spadek liczby komórek germinalnych w gonadach obu płci począwszy od stadium E16.5. Spadek liczby komórek germinalnych następował także w przypadku nokautu kadheryny E w komórkach germinalnych, jednak w tym przypadku spadek ten był bardziej drastyczny i prowadził u niektórych osobników do całkowitego zaniku komórek germinalnych. W tej publikacji kandydat wykazał, że kadheryna E nie jest istotna dla determinacji płci, płciowego różnicowania się gonad, czy wykształcenia struktury gonad, jednak jest białkiem kluczowym dla przetrwania komórek germinalnych.

Publikacja Piprek et al. (2019) w *Cells* dotyczy roli kadheryny N, kolejnego białka adhezji komórkowej, w rozwoju gonad myszy. Ponieważ wyłączenie ekspresji kadheryny N jest letalne na etapie zarodkowym, ponownie użyto nokautu tkankowo specyficznego. Podobnie jak kadheryna E, kadheryna N nie jest zaangażowana w regulację determinacji płci. Natomiast kadheryna N, w przeciwieństwie do kadheryny E, okazała się kluczowa dla przetrwania płodowych komórek Leydiga. Istotnym osiągnięciem było także wykazanie, że ekspresja kadheryny N, w przeciwieństwie do kadheryny E, w komórkach somatycznych gonad jest istotna dla utrzymania struktury sznurów jądrowych. Kadheryna N, podobnie jak kadheryna E, okazała się kluczowa dla przetrwania komórek germinalnych. Wykazano, że kadheryny zapewniają nie tylko adhezję komórkową, ale także uczestniczą w regulacji innych procesów, takich jak apoptoza komórek. Kandydat domniemywa, że wytworzenie prawidłowych połączeń między komórkami somatycznymi a germinalnymi skutkuje wyzwoleniem sygnałów anty-apoptotycznych w komórkach germinalnych chroniących je przed śmiercią komórkową. Brak oddziaływania kadheryna-kadheryna mógł blokować takie hipotetyczne sygnały, indukując w efekcie apoptozę komórek germinalnych.

Celem pracy Piprek et al (2018) w *Mechanisms of Development* było odnalezienie genów kodujących składniki strukturalne oraz enzymy substancji międzykomórkowej (ECM), ulegające specyficznej płciowo ekspresji podczas różnicowania się gonad u myszy. Zważywszy wysoką liczbę genów ECM oraz różnorodność komórek tworzących gonady, zastosowano segregację komórek (FACS) oraz analizę mikromacierzową ekspresji genów. Zbadano 46 genów kodujących składniki ECM oraz 38 genów kodujących enzymy ECM. Stwierdzono, że wysoka ekspresja licznych genów kodujących składniki ECM prawdopodobnie zapewnia intensywną syntezę ECM i formowanie się licznych, rozproszonych błon podstawnych wokół tworzących się sznurów jądrowych w różnicujących się jądrach. Analogiczną analizę przeprowadzono w odniesieniu do rozwijających się jajników myszy. Wskazano szereg genów ECM potencjalnie zaangażowanych w płciowym różnicowaniu się gonad u myszy. Metaloproteiny to główne enzymy odpowiedzialne za formowanie i przebudowę ECM, dlatego mogą one być istotne dla kształtowania się struktury jąder i jajników.

Celem kolejnej publikacji Piprek et al. (2019) w *Differentiation* było sprawdzenie jak zablokowanie lub aktywacja metaloproteinaz, odpowiedzialnych za tworzenie i przebudowę ECM, wpłynie na strukturę różnicujących się gonad myszy w warunkach *in vitro*. Wykazano, że zablokowanie aktywności enzymów MMP, za pomocą ich inhibitorów, powoduje wzrost ilości ECM odkładanej pomiędzy komórkami gonad. Akumulacja ECM z kolei uniemożliwiła płciowe różnicowanie się gonad. Dodatkowo gonady po inhibicji metaloproteinaz pozbawione były komórek germinalnych, co sugeruje, że wykształcenie prawidłowej struktury gonad z prawidłowo

uformowaną ECM jest konieczne nie tylko dla płciowego różnicowania się gonad, ale także dla przetrwania komórek germinalnych. Można przypuszczać, że zaburzenie adhezji komórek germinalnych do komórek podporowych w wyniku nagromadzenia ECM pomiędzy nimi doprowadziło do apoptozy komórek germinalnych, gdyż wiadomo, że niezaburzona adhezja komórek germinalnych podczas rozwoju gonad jest konieczna dla ich przetrwania. Z kolei w wyniku degradacji ECM, komórki gonad nie przylegały do siebie, co wskazało, że ECM jest konieczna dla utrzymania struktury rozwijających się gonad oraz adhezji komórkowej. Zarówno zahamowanie aktywności metaloproteinaz, jak i ich silne aktywowanie, zaburza proces rozwoju gonad. Odpowiednio zbalansowana aktywność metaloproteinaz jest kluczowa dla wykształcenia prawidłowej struktury gonad męskich i żeńskich.

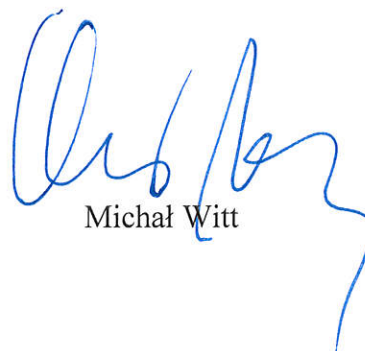
Sumaryczny IF osiągnięcia naukowego kandydata wynosi 15,879.

Ocena osiągnięcia naukowego i dorobku

Przedstawiony jako osiągnięcie naukowe cykl 5 publikacji stanowi całość spójną i merytorycznie konsekwentną, poświęconą badaniom ekspresji genów mających wpływ na adhezję komórkową oraz strukturę i funkcję substancji międzykomórkowej, w procesie rozwoju jąder i jajników u myszy. Osiągnięcie naukowe kandydata dokumentuje dobrze zaplanowany cykl doświadczalny, w którym użyte zostały nowoczesne metody molekularne (mikromacierze), immunocytochemiczne, posługiwanie się nokautami tkankowo specyficznymi, itp. Wszystkie uzyskane wyniki odnoszą się do szeroko rozumianego kontekstu rozwoju gonad, determinacji płci, determinant tkankowych wykształcania się struktur charakterystycznych dla jąder i jajników. We wszystkich przedstawionych w spince publikacjach kandydat jest pierwszym autorem, a jego wkład zawiera się w przedziale od 70% do 90%, co jasno pokazuje jego istotny wpływ na planowanie cyklu doświadczalnego oraz dużą samodzielność w tworzeniu manuskryptów. Zawarte w autoreferacie wprowadzenie do całego cyklu prac jest treściwe i jasne, bardzo dobrze napisane. Wszystkie publikacje ukazały się w czasopismach o wysokiej renomie w obszarze biologii rozwoju.

Dorobek publikacyjny poza osiągnięciem naukowym, charakteryzuje się odpowiednią jakością naukową. Stwierdzam także, że kandydat wykazuje istotną aktywność naukową, dydaktyczną oraz popularyzatorską, udokumentowaną w przedstawionej do oceny dokumentacji, w pełni odpowiadającą wymaganiom postępowania habilitacyjnego, zgodnie z przepisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668).

Na podstawie jak wyżej przedkładałam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne, Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o nadanie dr. Rafałowi P. Piprekowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.



Michał Witt

Poznań, 14 września 2020 roku