

## DISSERTATION REVIEW REPORT

**Thesis Title:** „The impact of maternal obesity on leptin signaling in the ovary and effects on oocyte and cumulus cells regulation in mice”

**Ph.D. Candidate:** Mgr inż. Karoliny Wołodko

PhD thesis is presented as a cumulative paper thesis contains two scientific articles relating to a single topic, to each of which the doctoral student has made a significant contribution.

The first paper presents the original study done by Wołodko K, Walewska E, Adamowski M, Castillo-Fernandez J, Kelsey G, Galvão A. and entitled: Leptin Resistance in the Ovary of Obese Mice is Associated with Profound Changes in the Transcriptome of Cumulus Cells. (Cell Physiol Biochem. 2020 30;54(3):417-437).

The second paper is a review article by Wołodko K, Castillo-Fernandez J, Kelsey G, Galvão A. entitled: Revisiting the Impact of Local Leptin Signaling in Folliculogenesis and Oocyte Maturation in Obese Mothers. (Int J Mol Sci. 2021 Apr 20;22(8):4270.)

Two publications on international peer reviewed journals (all of them first author) is a good package for a PhD.

Regarding the first article:

The manuscript is fully completed with original work that represent an interesting advancement in the field of leptin signaling in the ovary in the course of obesity. The main goals of the study were to characterize the expression of leptin signaling components in the ovary of mice during obesity progression, and also to identify alterations in gene signatures in CCs during early obesity and contribution of leptin in the process.

The goals of the present study were fully achieved with the following results:

- Initial leptin signaling hyperactivation during early obesity in the ovary in mice followed by leptin resistance at late obesity which was manifested by the decrease in pJAK2 and increased expression of SOCS3
- Hormonal stimulation protocol in mice changes leptin signaling expression during obesity comparing to cycling animals.

- Global gene expression in cumulus cells was correlated with body female body weight.
- For the first time it has been shown the temporal changes in gene expression in cumulus cells during obesity progression. Early obesity caused an increase in expressions of genes associated with metabolism and cell stress but decrease in the ones responsible for biomolecule synthesis and chromatin organization.
- She validated the pharmacological leptinemia model, with a hyperactivation of leptin signaling in the ovary but lacking all the remaining traits of obesity. Genes associated with cytoskeleton organisation and immune responses were upregulated in cumulus cells of these mice but cell metabolism and chromatin organisation were diminished.
- The differential analysis of the CCs transcriptome between early obesity and hyperleptinemic mice showed leptin-mediated changes. The expression of genes associated with response to toxins, transport and glucose metabolism was upregulated but epigenetic regulation and cytoskeleton reorganisation were repressed.

The author has been thus faced to diverse methodologies (eg. Real-Time PCR, Western Blot, Immunohistochemistry, RNA-seq library generation) and according to the statements by co-authors she took a leading part in the project development. Throughout the whole manuscript writing is clear and excellent, measurements are described in depth, introduction and discussion are consequent and essential.

The present study found that the ovaries of obese mice develop leptin resistance and that global gene expression in CCs was correlated with body weight. The results of this work may open novel therapeutic window that include possible interventions on treatment of infertility.

The second paper is a review article and presents current up-to date knowledge on potential effects of altered leptin signaling on folliculogenesis and oocyte maturation in mice and women. The whole manuscript is perfectly written with clear figures and excellent explanation of potential influence of leptin on follicle growth and embryo development.

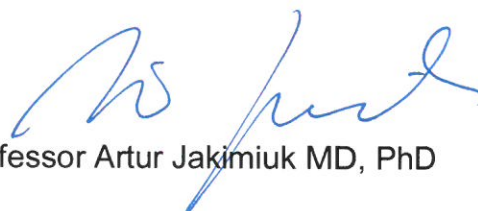
### **GENERAL COMMENTS**

The thesis research generate significant new knowledge in a scientific area. The methodology is scientifically sound and described in a way that allows reproducing the experiments. The thesis demonstrate a solid understanding of the state-of-the-art in the research area and the knowledge of the most important and current literature. The results are presented clearly, with the appropriate controls and statistical analysis and discussed in relation to the research of others.

The candidate's contribution to each aspect of the thesis (e.g. conception of ideas, experiments writing of an article etc.) are clearly stated and she appropriately acknowledged contribution by others.

## CONCLUDING REMARKS

The present thesis highlight very interesting results obtained in the framework of a consistent experimental work and well designed objectives. The reported publications indicate that the candidate has fulfilled his aims and current results pave the way to far reaching research objectives for the next future. The present thesis fulfill all criteria for a PhD Dissertation therefore I recommend it to the Senate of Medical University of Białystok to the next stages of PhD procedure and to be the subject of the public defence.



Professor Artur Jakimiuk MD, PhD

## Ocena rozprawy doktorskiej

**Tytuł rozprawy:** „The impact of maternal obesity on leptin signaling in the ovary and effects on oocyte and cumulus cells regulation in mice”

**Doktorant:** Mgr inż. Karolina Wołodko

Praca doktorska prezentowana jest w formie zbiorczej pracy zawierającej dwa artykuły naukowe dotyczące jednego tematu, z których w każdy doktorantka wniosła znaczący wkład.

Pierwsza praca przedstawia oryginalne badanie autorstwa: *Wołodko K, Walewska E, Adamowski M, Castillo-Fernandez J, Kelsey G, Galvão A. and entitled: Leptin Resistance in the Ovary of Obese Mice is Associated with Profound Changes in the Transcriptome of Cumulus Cells. (Cell Physiol Biochem. 2020 30;54(3):417-437).*

Drugi artykuł to praca przeglądowa autorstwa: *Wołodko K, Castillo-Fernandez J, Kelsey G, Galvão A. entitled: Revisiting the Impact of Local Leptin Signaling in Folliculogenesis and Oocyte Maturation in Obese Mothers. (Int J Mol Sci. 2021 Apr 20;22(8):4270.)*

Dwie publikacje w recenzowanych czasopismach międzynarodowych (we wszystkich jako pierwszy autor) to bardzo dobre dzieło na doktorat.

Pierwszego artykułu jest w pełni oryginalną pracą, która przedstawia interesujący postęp w dziedzinie szlaku sygnałowego leptyny w jajnikach w przebiegu otyłości. Głównym celem badania było scharakteryzowanie ekspresji komponent ścieżki sygnałowej leptyny w jajnikach myszy podczas progresji otyłości, a także identyfikacja zmian w ekspresji genów w komórkach wzgórka jajonośnego (CC) we wczesnej otyłości oraz udział leptyny w tym procesie.

Cele niniejszego badania zostały w pełni osiągnięte dzięki następującym wynikom:

- - Stwierdzono początkową hiperaktywację szlaku sygnałowego leptyny podczas wczesnej otyłości w jajniku u myszy, a następnie oporność na leptynę w otyłości późnej, objawiająca się obniżoną ekspresją pJAK2 i wzrostem ekspresji SOCS3

- - Protokół stymulacji hormonalnej u myszy zmieniał ekspresję szlaku sygnałowego leptyny podczas otyłości w porównaniu do zwierząt mających cykl.
- - Całościowa ekspresja genów w komórkach wzgórka była skorelowana z masą ciała.
- - Po raz pierwszy wykazano czasowe zmiany w ekspresji genów w komórkach wzgórka jajonośnego podczas progresji otyłości. Wczesna otyłość powodowała wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem i stresem komórkowym, ale spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę biomolekuł i organizację chromatyny.
- - Doktorantka zvalidowała model farmakologicznej leptynemii z hiperaktywacją szlaku sygnałowego leptynowej w jajniku, ale bez wszystkich pozostałych cech otyłości. Ekspresja genów odpowiedzialnych za organizację cytoszkieletonu i odpowiedź immunologiczną była podwyższona w komórkach wzgórka tych myszy, ale ekspresja genów związanych z metabolizmem komórkowy i organizacją chromatyny uległa zmniejszeniu.
- - Analiza różnicowa transkryptomu komórek kompleksu wzgórka jajonośnego pomiędzy myszami z wczesną otyłością a myszami hiperleptynemicznymi wykazała zmiany zależne od leptyny. Ekspresja genów związanych z odpowiedzią na toksyny, transport i metabolizm glukozy została zwiększona, ale ekspresja genów odpowiedzialnych za regulację epigenetyczną i reorganizację cytoszkieletonu została stłumiona.

Autorka użyła w pracy różnych metod badawczych (m.in. Real-Time PCR, Western Blot, immunohistochemia, RNA-seq library generation) i zgodnie z wypowiedziami współautorów wzięła wiodący udział w rozwoju projektu. Cały manuskrypt jest napisany jasnym i zrozumiałym językiem, pomiary są szczegółowo opisane, wstęp i dyskusja są konsekwentne i merytoryczne.

Niniejsze badanie wykazało, że jajniki otyłych myszy rozwijają oporność na leptynę i że całościowa ekspresja genów w komórkach kompleksu wzgórka jajonośnego jest skorelowana z masą ciała. Wyniki tej pracy mogą otworzyć nowe okno terapeutyczne, obejmujące możliwe interwencje w leczeniu niepłodności.

Druga praca jest artykułem przeglądowym i przedstawia aktualną wiedzę na temat potencjalnego wpływu zmienionego szlaku sygnalizacji leptyny na folikulogenezę i dojrzewanie oocytów u myszy i kobiet. Cały rękopis jest znakomicie napisany z wyraźnymi rysunkami i doskonałym wyjaśnieniem potencjalnego wpływu leptyny na wzrost pęcherzyka i rozwój zarodka.


## **UWAGI OGÓLNE**

Badania doktorantki wnoszą istotną nową wiedzę w dziedzinie naukowej. Metodologia badań jest naukowo uzasadniona i opisana w sposób umożliwiający odtworzenie eksperymentów. Praca charakteryzuje się solidną znajomością stanu technik w obszarze badawczym oraz znajomością najważniejszej i aktualnej literatury. Wyniki są prezentowane przejrzysto, z odpowiednią grupą kontrolną i analizą statystyczną i omówione w odniesieniu do badań innych.

Wkład kandydatki w każdy aspekt pracy (t.j.: koncepcja pomysłów, eksperymenty, napisanie artykułu etc.) są jasno określone, a doktorantka odpowiednio docenia wkład innych.

#### UWAGI KOŃCOWE

**W niniejszej rozprawie podkreślono bardzo interesujące wyniki uzyskane w ramach konsekwentnej, rzetelnej pracy eksperymentalnej oraz dobrze zaprojektowanych celów. Przedstawione publikacje wskazują, że kandydatka spełniła swoje cele, a obecne wyniki otwierają drogę do dalekosiężnych celów badawczych na przyszłość. Niniejsza praca spełnia wszystkie kryteria rozprawy doktorskiej, dlatego rekomenduję ją Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku do dalszych etapów przewodu doktorskiego i obrony publicznej.**



Prof. dr hab. n. med. Artur Jakimiuk