

OCENA

pracy doktorskiej mgr. Pawła Leszczyńskiego pt. „Rola białka PRDM3 w procesie różnicowania neuronalnego”

Neurogeneza to proces powstawania nowych neuronów w drodze proliferacji i różnicowania neuronalnych komórek macierzystych. Wyróżniamy neurogenezę embrionalną i, zdecydowanie mniej intensywną, neurogenezę wieku dorosłego. Kierunek różnicowania się komórek, w tym komórek neuronalnych, jest wynikiem współdziałania różnych czynników zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych. Spośród czynników zewnętrznych ogromny wpływ na rozwój układu nerwowego i ukierunkowane różnicowanie neuronów ma kwas retinowy, ale wiedza na temat mechanizmu oddziaływania tego związku jest niepełna. Spośród licznych czynników wewnętrznych na proces neurogenezy mogą mieć również wpływ białka z rodziny PRDM. Szczególnie interesujące wydaje się być białko PRDM3. Wykazano, że wyłączenie ekspresji PRDM3 wywołuje morfologiczne zmiany w układzie nerwowym muszki owocowej oraz w zarodku myszy. Jednakże wiedza na temat wpływu PRDM3 na proces różnicowania neuronalnego u ssaków jest wciąż niewielka.

Jedną z metod *in vitro* wykorzystywanych w badaniach nad neurogenezą są badania na komórkach linii P19 wykazujących cechy komórek pluripotencjalnych, które pod wpływem czynników zewnętrznych mogą się zróżnicować do trzech listków zarodkowych. W obecności kwasu retinowego komórki P19 różnicują się do neuronów. Dokładne zbadanie mechanizmów zaangażowanych w neurogenezę jest jednak nadal dużym wyzwaniem, również pod względem metodycznym.

W związku z powyższym postawiony w rozprawie cel pracy, czyli opracowanie uproszczonego metodologicznie modelu do badań neurogenezy *in vitro* wykorzystującego komórki linii P19 oraz ocena roli białka PRDM3 w procesie różnicowania neuronalnego uważam za w pełni uzasadniony. Poruszony temat badawczy dotyczy aktualnych zagadnień, a otrzymane wyniki mają ogromne znaczenie nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne, gdyż w dalszej perspektywie mogą być wykorzystane np. w medycynie regeneracyjnej.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Pawła Leszczyńskiego została wykonana w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu pod kierunkiem prof. dr. hab. Mariusza Pierzchały. Promotorem pomocniczym pracy jest dr Hiroaki Taniguchi. Badania te zostały częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauk w ramach konkursu PRELUDIUM13, a także ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego "Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność".

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl publikacji składający się z wymienionych poniżej dwóch prac doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej opublikowanych w latach 2019–2020:

1. **Leszczyński P**, Śmiech M, Teeli AS, Zołocińska A, Słysz A, Pojda Z, Pierzchała M, Taniguchi H. Neurogenesis Using P19 Embryonal Carcinoma Cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2019, 2019(146): e58225.
2. **Leszczyński P**, Śmiech M, Salam Teeli A, Haque E, Viger R, Ogawa H, Pierzchała M, Taniguchi H. Deletion of the *Prdm3* Gene Causes a Neuronal Differentiation Deficiency in P19 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(19):7192.
3. **Leszczyński P**, Śmiech M, Parvanov E, Watanabe C, Mizutani KI, Taniguchi H. Emerging Roles of PRDM Factors in Stem Cells and Neuronal System: Cofactor Dependent Regulation of PRDM3/16 and FOG1/2 (Novel PRDM Factors). *Cells*. 2020, 9(12):2603.

Wszystkie prace opublikowane zostały w renomowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku wpływu (*Impact Factor*) wynoszącym 10,03 i punktacji MNiSW równej 350 pkt. We wszystkich tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują, że Pan mgr Paweł Leszczyński pełnił wiodącą rolę w planowaniu i realizacji badań oraz przygotowaniu publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Rozprawę rozpoczyna krótkie Streszczenie w języku polskim i angielskim, które wprowadza czytelnika w tematykę pracy. We Wstępie Autor pracy po krótkce charakteryzuje proces neurogenezy embrionalnej, omawia modele neurogenezy *in vitro*, czynniki regulujące neurogenezę oraz funkcje białek z rodziny PRDM, ze szczególnym zwróceniem uwagi na PRDM3. Hipotezy badawcze i cel pracy sformułowane zostały w czytelny i jasny sposób. Badania Pana mgr. Pawła Leszczyńskiego miały na celu: (a) opracowanie uproszczonego metodologicznie modelu do badań neurogenezy *in vitro* przy użyciu komórek linii P19; (b) zbadanie profilu ekspresji *Prdm3* w modelu neurogenezy *in vitro*; (c) określenie roli PRDM3 podczas różnicowania neuronów oraz (d) zbadanie mechanizmów regulujących aktywność promotora *Prdm3*. Kolejny rozdział w szczegółowy sposób opisuje użyte materiały oraz zastosowane metody. Eksperymenty zostały rzetelnie zaplanowane i przeprowadzone z wykorzystaniem różnych metod i technik badawczych.



Otrzymane wyniki zostały opisane w bardzo przystępny sposób z powołaniem się na odpowiednie ryciny w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską. Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że model neurogenezy *in vitro* wykorzystujący indukcję różnicowania neuronalnego w komórkach linii P19 za pomocą kwasu retinowego może być znacznie uproszczony. W kolejnych doświadczeniach wykazano, że ekspresja *Prdm3* wzrasta podczas neurogenezy w komórkach linii P19, a wyłączenie ekspresji *Prdm3* powoduje wcześniejsze dojrzewanie neuronów i zwiększa proliferację komórek nieneuronalnych. Wykazano również pozytywny wpływ czynników GATA i ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od kwasu retinowego na aktywność promotora *Prdm3*.

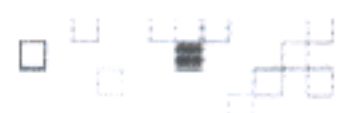
Rozprawę kończy krótka Dyskusja, w której Doktorant omówił i zinterpretował uzyskane wyniki oraz umiejętnie skonfrontował je aktualnymi danymi literaturowymi. Z przeprowadzonych badań Autor wyciągnął 7 wniosków.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Założone cele zostały w pełni zrealizowane, a otrzymane wyniki są nowatorskie i skłaniają do dalszych badań nad rolą białka PRDM3 w procesie różnicowania neuronalnego. Na uwagę zasługuje również fakt, że Doktorant musiał opanować szeroki wachlarz metod badawczych. Pracę oceniam jak najbardziej pozytywnie. Podczas jej lektury nasunęło mi się jedynie kilka uwag, które przedstawiam poniżej.

- 1) Choć cel pracy i metody badawcze zostały opisane wyczerpująco w publikacjach składających się na pracę doktorską, to w rozprawie zabrakło mi punktu przedstawiającego plan doświadczeń np. w formie graficznej.
- 2) Zarówno w publikacjach składających się na niniejszą pracę jak i w ich opisie warto byłoby nakreślić kierunek dalszych badań, gdyż otrzymane wyniki są bardzo obiecujące i zdecydowanie wskazują na konieczność kontynuowania prac nad rolą białka PRDM3 w neurogenezie.
- 3) Spośród siedmiu przedstawionych przez Doktoranta wniosków, jedynie pierwszy jest prawidłowo sformułowanym wnioskiem, a pozostałe stanowią w rzeczywistości podsumowanie uzyskanych wyników.

Wymienione powyżej uwagi oczywiście w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej ocenianej rozprawy. Warto również dodać, że publikacje składające się na niniejszą rozprawę doktorską zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez recenzentów poszczególnych czasopism.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Pawła Leszczyńskiego pt. „Rola białka PRDM3 w procesie różnicowania neuronalnego” stanowi ważny wkład w badania nad procesami neurogenezy. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie uproszczonego metodologicznie modelu do badań neurogenezy w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem komórki linii P19. Prezentowana rozprawa wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autora, umiejętność



planowania i przeprowadzania złożonych eksperymentów (w tym również aplikowania o środki finansowe na realizację badań), analizy otrzymanych wyników i ich interpretacji oraz przygotowania manuskryptów do publikacji.

Z pełnym przekonaniem uznaję, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym, oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Pawła Leszczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność poruszonej tematyki badawczej i wysoką wartość naukową niniejszej rozprawy, potwierdzoną opublikowaniem uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych, wnioskuję również o wyróżnienie ocenianej pracy.

Lublin, 14 stycznia 2021 r.

Kataryna Sowa

