

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Michniak
pt.: „**THE ROLE OF THE HIPPO PATHWAY IN THE TROPHECTODERM LINEAGE SPECIFICATION
IN THE RABBIT EMBRYO**”

Rozwój zarodkowy ssaków jest procesem, w trakcie którego potencjał rozwojowy komórek ulega stopniowemu ograniczeniu. blastocysta składa się z trofektodermi (TE) oraz wężła zarodkowego (ICM). TE to pozazarodkowa linia komórkowa powstające ze spolaryzowanych komórek zewnętrznych, otaczająca ICM. TE jest zaangażowana w późniejszy proces implantacji oraz w powstawanie zarodkowej części łożyska. Prawidłowe różnicowanie TE jest kluczowe dla właściwego przebiegu procesu implantacji oraz utrzymania ciąży.

Zaangażowanie szlaku sygnałowego Hippo w regulację potencji komórek macierzystych, proliferacji czy różnicowania komórek, zostało potwierdzone w badaniach na wielu typach komórek, a w przedimplantacyjnych zarodkach myszy, gdzie szlak Hippo został obszernie zbadany, stwierdzono jego kluczową rolę w trakcie różnicowania TE. Odmienna aktywność szlaku Hippo pomiędzy zewnętrznymi i wewnętrznymi komórkami zarodka inicjuje proces różnicowania w kierunku TE lub ICM. Do tej pory rola szlaku Hippo nie została zbadana w trakcie przedimplantacyjnego rozwoju królika. Dlaczego królik i czy warto wkładać tyle wysiłku w tego typu badania na króliku?

Królik jest hodowany głównie do produkcji mięsa i futer, a także częstym towarzyszem i zwierzęciem laboratoryjnym. Króliki są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym jako bioreaktory do produkcji białek terapeutycznych i do produkcji przeciwciał. Zdolność królików do szybkiego przybierania na wadze w odpowiedzi na wysokokaloryczną dietę o niskiej zawartości błonnika sprawiła, że zwierzęta te są doskonałym modelem do badania metabolizmu tłuszczów oraz chorób związanych z otyłością u ludzi, takich jak hiperlipidemia, miażdżyca tętnic oraz zakrzepica. Transgeniczne szczepy królicze zostały wykorzystane jako model dla chorób serca. Patogeneza chorób bakteryjnych i wirusowych u królików jest często bardzo podobna do tej u ludzi, dlatego też królik znalazł miejsce jako model dla chorób zakaźnych. Model królika jest pomocny w badaniu chorób wirusowych wywołanych przez opryszczkę zwykłą (HSV1), wirus brodawczaka ludzkiego (HPV). Linie transgeniczne królików są modelem choroby AIDS w badaniach, aby zrozumieć mechanizmy początku i rozwoju choroby, a także skuteczność potencjalnych leków i szczepionek.

Króliki wyróżniają się unikalną cechą indukowanej owulacji. Wydzielanie GnRH (hormonu uwalniającego gonadotropinę), neuropeptydu podwzgórza, który kontroluje funkcje rozrodcze i przedowulacyjny wzrost LH (hormonu luteinizującego), jest indukowane przez odbieranie bodźców somatosensorycznych narządów płciowych podczas kopulacji. U królików owulacja

występuje po 10-13 hpc (Harper 1961). Długość okresu przedimplantacyjnego u królika wynosi 6 dni, a okres ciąży średnio 31 dni. Dzięki tym cechom możliwe jest pozyskiwanie i badanie zarodków lub płodów króliczych w kolejnych stadiach rozwojowych w krótkim czasie po kryciu, inseminacji lub transferze zarodków.

Królik wykazuje cechy dogodne do trzymania i manipulacji w celach badawczych, w tym wielkość samicy i jej układ rozrodczy. Lejek jajowodu czy przesmyk jajowodowo-maciczny są widoczne bez powiększenia.

Wielkogabarytowe blastocysty sprawiają, że królik jest wygodnym modelem badawczym do przeprowadzania mikromanipulacji zarodków lub prowadzenia analiz specyficznych dla danej linii komórkowej.

Rozwój, funkcja i morfologia łożyska królika są bardziej podobne do ludzi niż gryzoni, co początkowo uczyniło ten gatunek ważnym modelem do badań nad rozwojem zarodków ssaków. Zatem powyższy wywód przekonuje, że warto badać królika tym bardziej że jest atrakcyjnym modelem do studiowania biologii rozrodu i rozwoju.

O wysokim znaczeniu badań nie trzeba przekonywać. Doktorantka badała różnicowanie TE które jest kluczowe dla właściwego przebiegu procesu implantacji oraz utrzymania ciąży. Szacuje się, że ponad 20% par sygnalizuje problem z uzyskaniem potomka drogą naturalną, a ponad 10% wymaga interwencji medycznej w postaci odpowiedniej diagnostyki, a wreszcie leczenia. Zważywszy na obecne problemy naszej populacji światowej i polskiej w dziedzinie zapłodnienia zakończonego urodzeniem zdrowego potomstwa oraz spadające wskaźniki demograficzne, niniejsze badania są odpowiedzią na obecne problemy i wyzwania.

W przedstawionej mi do oceny pracy Autorka przedstawiła dowody na obecność szlaku Hippo w różnicowaniu TE/ICM w zarodku królika poprzez szczegółową analizę immunolokalizacji wybranych białek od stadium wczesnej moruli do stadium blastocysty. Także względny poziom ekspresji genów zaangażowanych w regulację szlaku Hippo został porównany między poszczególnymi stadiami rozwojowymi królika. W swoich badaniach Autorka sprawdziła wpływ inhibicji kinazy ROCK na przedimplantacyjny rozwój królika. Sygnał immunofluorescencyjny białek YAP oraz GATA3 nie różnił się między zarodkami kontrolnymi oraz traktowanymi inhibitorem ROCK (Y-27632), chociaż inhibicja ROCK zaburzyła proces kawitacji oraz przyczyniła się do nietypowej dystrybucji białek aPKC oraz F-aktyny.

Uzyskane wyniki pozwoliły porównać model królika z dostępną wiedzą na temat innych modeli ssaków, wskazując na różnice i podobieństwa w polaryzacji komórek i regulacji szlaku Hippo podczas pierwszej decyzji o losach komórek.

Ocena pracy

Praca napisana jest w języku angielskim, wg. mnie poprawnym, ale ja niestety nie jestem filologiem. Pracę dobrze się czyta, że posłużę się kolokwialnym zwrotem, jednak w pełni oddaje on klarowność w jakim jest napisana.

Wstęp jest obszernym opracowaniem liczącym 25 stron i zawiera przejrzyste skonstruowany blok informacji podzielony na 8 wątków: Preimplantation development of the mammalian

embryo; Embryo compaction; The cell polarity; Trophectoderm versus Inner Cell Mass – the first cell-fate decision; Trophectoderm - specific markers; The Hippo pathway signalling; The role of the RHO-ROCK signalling in trophectoderm differentiation in mammals; The rabbit as a valuable animal model in biological and medical research.

Rozdział ten uzupełniony jest pięcioma kolorowymi rycinami w czytelny sposób podsumowujący opisane zagadnienia (Rycina 1. *The timeframe of the rabbit embryo development showing morphology changes at subsequent stages*; Rycina 2. *Mouse at 8-cell stage undergoes morphogenetic event – the compaction. Simultaneously with compaction, the apicobasal polarity is established in the outer cell as represented by the apical (magenta) and basolateral (blue) membrane domains of specific blastomeres*; Rycina 3. *CDX2 and GATA3 colocalisation in rabbit embryos at stage VI (3.25 dpc)*; Rycina 4. *Regulation of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) differentiation by the Hippo pathway in the mouse embryo*; Rycina 5 *The mechanism of RHO-ROCK-dependent regulation of trophectoderm differentiation in mammals through the Hippo pathway*. Wyrażam uznanie za przystępny przekaz tej wiedzy embriologicznej, co nie jest łatwe.

Kolejno przedstawia Autorka trzy hipotezy badawcze, którym odpowiadają trzy cele badawcze.

Hipotezy badawcze I. Różnicowanie trofektodermi w zarodku królika zależy od ustalenia polarności na etapie moruli. II. Różnicowanie trofektodermi w zarodku królika jest kontrolowane przez aktywność szlaku Hippo. III. Regulacja specyfikacji TE różni się u myszy i królika.

Cele badań I. Zbadanie, czy istnieją różnice w ekspresji genów biorących udział w kaskadzie szlaku Hippo między poszczególnymi etapami przedimplantacyjnymi w zarodku królika. II. Zbadanie dystrybucji szlaku Hippo i czynników polaryzacji od stadium 4-komórkowego do stadium blastocysty w zarodku królika. III. Zweryfikowanie udziału szlaku Hippo i kinazy ROCK w różnicowaniu trofektodermi przez inhibicję ROCK w embrionach królików.

Nie wnoszę żadnych uwag krytycznych do tych części pracy.

Rozdział **Materiały i metody** liczący 18 stron, rozpoczyna się opisem zwierząt użytych w doświadczeniach. Na przeprowadzenie doświadczeń opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej zgodę wydała Lokalna Komisja Etyczna nr 3 w Warszawie (uchwały nr: 167/2018). Adekwatnie do postawionych 3 celów badawczych w kolejnych rozdziałach opisano metodykę badań. I tak, metodyka badań obejmuje opis pożywek do hodowli, pozyskiwania zarodków przez wypłukiwanie jajowodów i macicy, hodowle zarodków in vitro wraz z ich obserwacją przy udziale systemu Primo Vision EVO+ (Vitrolife), traktowanie zarodków inhibitorami kinaz ROCK. Kolejne rozdziały obejmują opis utrwalania zarodków, usuwania osłonek zarodka (ZP I i płaszcz mucynowy), immunofluorescencyjną detekcję białek. Rozdział ten prawidłowo został opatrzony tabelami z wypisanymi specyfikacjami użytych przeciwciał pierwszo- i drugo- rzędowych oraz zastosowanym w procedurze rozcieńczeniem. Kolejne rozdziały opisują użyte barwienia: falodyną (Phalloidin staining) dla określenia lokalizacji F-aktyny w cytoszkielecie oraz barwienie jąder komórkowych Hoechst'em. Wybarwione zarodki należy ocenić pod mikroskopem, co zostało opisane w rozdziale obrazowanie zarodków przy użyciu mikroskopu konfokalnego oraz analiza

uzyskanych obrazów konfokalnych. Rozdział wzbogacony jest ryciną 6. opisującą sposób pomiaru intensywności pikseli w komórkach zewnętrznych zarodka. Kolejny rozdział obejmuje opis użytych metod biologii molekularnej takich jak: pobieranie próbek do analizy ekspresji genów, ekstrakcja RNA, wytrącanie RNA, RT-PCR (z tabelą przedstawiającą składniki reakcji i ich objętość na 1 reakcję oraz składowe Master mixu), projektowanie starterów (z tabelą przedstawiającą sekwencje użytych starterów, długość produktu i temperaturę topnienia dla 10 genów w tym 3 kontrolnych), ilościowy PCR z tabelą prezentującą składniki reakcji i użyty program oraz elektroforezę w żelu agarozowym. Kolejny podrozdział traktuje o odczynnikach i zestawach użytych w pracy. Cały rozdział Materiał i metody kończy podrozdział opisujący wykorzystane w pracy metody statystyczne. Opis części metodycznej jest wzbogacony wspomnianą ryciną 6 i 9. tabelami. Wszystkie tabele i rycina są czytelne i klarownie przedstawiają opisywany etap doświadczenia. Jestem pod wrażeniem szerokiego warsztatu metodycznego jakim posługiwała się doktorantka. Posiada wysokie umiejętności manualne (uzyskiwanie zarodków, manipulacja zarodkami: dezagregacja zarodków, izolacja ICM, TE) jak i biologii molekularnej (RT-qPCR). Opanowała też w stopniu doskonałym warsztat obserwacji mikroskopowej w tym mikroskopii konfokalnej jak i jej dokumentacji. Techniki wybarwiania i immunofluorescencji wydają się nie mieć tajemnic dla mgr Michniak. Widać to na znakomitej jakości fotografiach. Sposób opisu wszystkich wykonanych badań jest zwięzły i czytelny, a jednocześnie podane są wszystkie potrzebne informacje do samodzielnego powtórzenia eksperymentu przez czytelnika. Nie mam żadnych zastrzeżeń to tej części pracy.

WYNIKI podzielone są na 8 części obejmują: Kalendarium rozwoju zarodka królika *in vitro* od stadium zygoty do stadium blastocysty; Analiza względnych poziomów ekspresji genów biorących udział w kaskadzie szlaku Hippo w zarodkach królików w kolejnych stadiach: 1,5, 2,5, 3,25, 4,0 dpc.; Lokalizacja wczesnego markera TE, GATA3 w przedimplantacyjnym zarodku królika, czyli P-Ezrina (P-ERM)+ kinaza białkowa C (aPKC)+ F-aktyna + β -katenina. Kolejne cztery części wyników dotyczą: 1. Lokalizacji YAP w zarodku królika od stadium 8-komórkowego do stadium blastocysty 2. Kolokalizacji YAP i GATA3; 3. Analizy roli szlaku Hippo i polaryzacji w zarodku królika poprzez hamowanie kinazy ROCK i 4. Wpływu hamowania ROCK na szlak Hippo i rozmieszczenie markerów polaryzacji. Dwa z wymienionych podrozdziałów są podzielone na kolejne 2 subrozdziały, z czego jeden podzielony jest na 4 subrozdziały, a jeden na trzy. Struktura wyników pokazuje jak ogromną pracę wykonała Doktorantka. Wyniki prezentowane są w poprawnym ciągu logicznym. Po uzyskaniu wyników dla danego etapu, Autorka stawiała sobie zasadne pytania na które odpowiadają wyniki uzyskane w kolejnym etapie. Wszystko to świadczy o dojrzałym podejściu do badań, a w szczególności do weryfikacji stawianych hipotez i otwartym umyśle w reagowaniu na otrzymane rezultaty. Czasami ma się wrażenie, że Autor za wszelką cenę chce udowodnić pierwotną hipotezę, Autorka do takich badaczy na szczęście nie należy.

Wyniki zostały zaprezentowane ogółem na 61 stronach A4, w tym w formie 1 tabeli i aż 32 zdjęć/wykresów/rycin. Jedna rycina w ocenianej pracy często składa się ze zdjęć z mikroskopu konfokalnego oraz schematu, zatem podana liczba rycin jest w rzeczywistości

znacznie większa. Niekiedy rycina składa się z 3 elementów- ww. plus wykresy. Przedstawiona mi do oceny praca ma tak znakomite ryciny, że w zasadzie nie trzeba czytać tekstu, wystarczy postudiować zdjęcia i schematy, żeby wyciągnąć właściwe wnioski. Jakość zdjęć z mikroskopu konfokalnego jest zachwycająca. Sposób przedstawienia w odniesieniu do poszczególnych stadiów rozwoju przedimplantacyjnego zarodka królika jak i poszczególnych białek różniących się kolorem potęguje wrażenie uporządkowania i przejrzystości. Konieczne informacje są uwzględnione na rycinach i dodatkowo schematach. Bardzo starannie przygotowana część pracy, głęboko przemyślana. Opis legendy pod rycinami jest bez zarzutu. Wszędzie, gdzie umieszczono zdjęcia podane są skale. Nie mam zastrzeżeń odnoszących się do merytorycznej strony uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko. Opis każdego z uzyskanych wyników kończy się konkluzją, z którą się zgadzam. Konkluzja w znakomitej większości oparta jest o wynik, nie jest przypuszczeniem. Prezentowane wyniki są ponadprzeciętne, jak i sposób ich prezentacji jest znakomity. W odniesieniu do królika uzyskane wyniki są wysoce oryginalne. Zwarzywszy na skąpe doniesienia światowe w tym temacie, wyniki mają szansę zostać zauważone na arenie światowej. Dodatkowo jak dowiedziałam się z dyskusji, w kilku przypadkach uzyskane dane różnią się od wcześniejszych badań, co czyni prezentowane doświadczenia jeszcze bardziej wartościowymi. W moim przekonaniu warsztat Doktorantki jest profesjonalny, co skłania mnie do przyłożenia większej wagi to wyników Autorki niż innych światowych, uzyskanych prostszymi, mniej zaawansowanymi metodami. Fakt, że wyniki są graficznie bardzo dobrze opracowane ułatwi ich publikację w czasopiśmie z wysokim IF, czego z serca Pani mgr Machnik życzę.

Słów kilka o statystyce. Autorka pilnuje czy wyniki podlegają rozkładowi normalnemu. To jest punktem odniesienia do doboru konkretnych testów statystycznych. Autorka używała kilku: unpaired two-tailed t-Student and Mann-Whitney test, odpowiednio dla danych o rozkładzie normalnym i nienormalnym. Porównania więcej niż dwóch grup przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej ANOVA (dla danych o rozkładzie normalnym) lub testu Kruskala-Wallisa (dla danych o rozkładzie nienormalnym), gdzie lokalizację YAP lub kategorię komórek uznano za czynniki niezależne. W przypadku istotności statystycznej wykazanej testem ANOVA lub Kruskala-Wallisa włączono dalszą analizę post-hoc z wykorzystaniem testu Tukeya lub testu Dunna. Do oceny korelacji obliczono współczynnik korelacji Pearsona. Aby określić, czy istnieje istotny związek między dwiema zmiennymi kategorycznymi dla grupy kontrolnej i zarodków zahamowanych przez ROCK, zastosowano test chi-kwadrat. Wszystkie wyniki uznano za statystycznie istotne dla $p < 0,05$. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią \pm SEM (jeśli dotyczy).

Za szczególnie cenne uważam wyniki gdzie statystyczna istotność jest $p \leq 0,01$. U Autorki jest kilka wyników o jeszcze wyższej istotności statystycznej. Przykłady: *Figure 17. Comparison of the YAP^{N+} cells contribution in the outside compartment between stages V-IX. Percentage of outside/TE cells with YAP nuclear localisation. Post-hoc comparisons are denoted by symbol * (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; Dunn's multiple comparison test); Figure 28. Embryos after 72h of in vitro culture.*

A Representative images of control embryos, B and ROCKi embryos after 72h of culture. Embryos that failed to cavitate are marked by yellow arrows. A' and B' Inserts show enlarged details of one embryo

for each group, embryo with a cavity in the control (**A**) and embryo with no cavity in the treated group (**B**). **C** Averaged percentages of blastocysts (cavity) and morulae (no cavity) in control and experimental groups presented in the graph, Chi-square test, **** p -value<0.0001. Scale bar = 100 μ m.

Figure 29. Average diameter values of the control and ROCK-inhibited (ROCKi) embryos after 48h and 72h of in vitro culture. **A** Image representing the morula diameter after 48h of culture; **B** Image representing the morula/blastocyst diameter after 72h of culture. **C** Comparison of the size (diameter) of embryos between control and experimental groups after 48h of culture. **D** Comparison of the size (diameter) of embryos between control and experimental groups after 72h of culture. (** p <0.005; unpaired t-test; Mann-Whitney test). Scale bar =100 μ m.

Figure 30. Total cell count of rabbit embryos after two different time intervals (48h and 72h) in in vitro culture. Quantification of total cell number in rabbit embryos after 48h and 72h of culture with ROCK inhibitor. (** p <0.01; unpaired t-test)

Figure 38. The contribution of aPKC localising in a polarised manner in outside cells in control and ROCK-inhibited embryos. **A** Correlation between the total number of outside cells and the number of outside cells with aPKC localisation in apical domains for the control embryos ($r=0.6963$; $p<0.001$; $n=46$). **B** Correlation between the total number of outside cells and the number of outside cells with aPKC localisation in apical domains for the control embryos and for the ROCK-inhibited embryos ($r=0.9571$; $p<0.001$; $n=51$). **C** In control and ROCK-inhibited embryos, the percentage of outer cells with aPKC distribution in apical domains (relative to all outer cells). (** p <0.001, Pearson correlation coefficients; **** p <0.0001, Mann-Whitney test, 3 independent experiments)

Figure 39. Changes in aPKC distribution after ROCK inhibition treatment in the rabbit embryo. **A** The representative confocal z-section of the control embryo, **B** and the ROCK-inhibited embryo after 48h of in vitro culture. **A-B** In order to quantify differences in aPKC distribution in the apical domain after treatment, the intensity profile of the aPKC signal was obtained at ~ 10 similar arbitrary locations within each embryo from both groups (yellow lines). **A1, A2, B1** Representative intensity profiles (blue line). A plot (the intensity profile) generally shows one peak of intensity corresponding to the apical domains and a plateau region observed with much lower signal intensity. A Gaussian curve (orange line) was fitted to all profiles obtained from every embryo ($n=30$) to acquire precise values for each peak and plateau. **C** Graph of Individual values presenting ratio of maximum peak and plateau in the outside cells of control and ROCK-inhibited embryos (10 lines per embryo, $n=15$ per group). (**** p <0.0001, Mann-Whitney test; $n=30$ embryos, 3 independent experiments).

Dyskusja podzielona jest na 9 części/podrozdziałów z czego dwie ostatnie to wnioski i ograniczenia badań oraz plany na przyszłość. Podział na części jest adekwatny do prezentacji metodyki jak i przedstawienia wyników.

Moje wagi, pytania, komentarze do Doktorantki:

1. „My research combines analyses of both in vivo and in vitro developing embryos. Thus, it is important to understand that embryonic development under both conditions is not fully equivalent..”- może przeoczyłam, ale nie zauważyłam odniesień w wynikach, czy we wnioskach do zarodków hodowanych *in vitro* i *in vivo*
2. Proszę przedstawić konkrety jak Pani wyniki mogą być zastosowane w rozrodzie u ludzi (badania, analizy, leczenie, diagnostyka)?

3. *Pisze Pani o wpływie działań mechanicznych na różnicowanie TE a może i ICM. Proszę powiedzieć jaki wpływ na różnicowanie TE a może i ICM może mieć izolowanie pojedynczych blastomerów z zarodków ludzkich celem wykonania np. analiz genetycznych? Czy działania takie mogą mieć wpływ na dalsze różnicowanie listków zarodkowych?*
4. *Na str. 120 pisze Pani „...moje odkrycia zostały niedawno potwierdzone przez nasze laboratorium we współpracy z dr hab. Piotr Pawlak (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) poprzez analizę transkryptomyczną zarodków królików. Według analizy całych zarodków królików (dane niepublikowane), ekspresja TEAD1, TEAD2, TEAD3, LATS1 była na bardzo niskich poziomach u królików w 2,0 dpc i 3,0 dpc, podczas gdy transkrypty YAP, TEAD4 i LATS2 wykryto, ale ich poziomy ekspresji nie różniły się między 2,0 dpc a 3,0 dpc” Interesuje mnie, czy nie wykazano statystycznie istotnych różnic dla TEAD1, TEAD2, TEAD3, LATS1 w całych zarodkach królika? W jakim stopniu Pani badania pokrywają się z badaniami dr hab. Piotra Pawlaka?*
5. *Jak podano na str. 121, „.. stwierdziłam w większości przypadków brak różnic w poziomach ekspresji analizowanych genów pomiędzy kolejnymi stadiami rozwojowymi zarodka królika, w przeciwieństwie do danych u innych gatunków ssaków. W związku z tym jest bardziej prawdopodobne, że aktywność składników szlaku Hippo u królików będzie modulowana przez modyfikacje potranslacyjne lub zmiany aktywności białka, w tym lokalizację białka w komórce, fosforylację lub interakcje z innymi białkami, niż przez transkrypcję genu. Dlatego proponuję, aby wszystkie analizowane geny szlaku Hippo i ich dalsze efekторы były utrzymywane w zarodkach króliczych przed implantacją na stałym poziomie ekspresji podczas rozwoju przedimplantacyjnego, jak to jest powszechnie obserwowane w różnych szlakach sygnalizacji komórkowej (przeгляд w El-Brolosy i Stainier 2017).” Jeżeli te geny są zaangażowane w ścieżkę Hippo, to modyfikacje potranslacyjne lub zmiany w aktywności białka, w tym w lokalizacji subkomórkowej białka, fosforylacji lub interakcjach z innymi białkami, te wszystkie wymienione mechanizmy nie są możliwe bez transkrypcji, zatem jeśli białko powstanie powinien spaść poziom transkryptu. Stały poziom produkcji- ok- ale wtedy też stały poziom przepisywania na białko – translacja też zaburza poziom bazalny transkryptu.*
6. *Szkoda, że Bouchereau i in. 2022 wyprzedzili Panią w publikacji ☺ „W konsekwencji, poprzez te badania, wykazałam, że w przeciwieństwie do wcześniej wspomnianego CDX2, GATA3 pozostaje dobrym kandydatem na czynnik inicjujący linię TE w embrionach królików. Moje odkrycia zostały niedawno potwierdzone przez podobną obserwację przeprowadzoną przez Bouchereau i współpracowników, którzy ogłosili wysoki poziom ekspresji GATA3 w morulach królika przy 2,7 dpc (Bouchereau i in. 2022)”. Z ciekawości- czy ma Pani doniesienie przed nimi?*
7. *Bardzo podoba mi się Ryc.40 - jest bardzo czytelna z podziałem na stadia rozwoju i regiony zarodka, tabela w połączeniu z schematami i kolory korespondujące między*

tabelą a grafiką stadiów rozwojowych- rewelacyjna prezentacja wyników- czy w 100% to Pani dzieło?

8. *YAP protein might be regulated in the embryo through mechanisms controlling the protein localisation in the nucleus or the cytoplasm rather than on the gene activity level.- ciekawa interpretacja, że regulacja YAP jest przez lokalizację a nie transkrypcję, ale lokalizacja nie wyklucza transkrypcji, przecież te białka muszą powstać z wykorzystaniem znanej nam drogi- gen-transkrypcja- translacja- no i jeszcze później mechanizmy potranslacyjne żeby białko było aktywne. Proszę rozwinąć ten mechanizm, zatem kiedy ma miejsce transkrypcja i translacja i jak regulowana może być zmiana lokalizacji?*

Moje uwagi nie umniejszają wartości uzyskanych wyników czy dyskusji na ich temat, która jest prowadzona bardzo prawidłowo i wskazuje na dużą znajomość tematu przez Doktorantkę jak i na doskonałą znajomość literatury światowej. Liczba cytowanych pozycji w pracy jest ogromna. Według moich obliczeń wynosi 282 prace.

Reasumując w **DYSKUSJI** zawartej na 23 stronach Doktorantka przedstawiła kilka wątków na temat:

1. Ekspresja genów biorących udział w szlaku Hippo (TEAD1-4, LATS1/2, YAP);
2. Czynniki transkrypcyjne specyficzne dla TE w zarodku królika;
3. Czynniki związane z polaryzacją: P-Ezrin, aPKC, F-aktyna, β -katenina;
4. Dynamiczne wzorce lokalizacji YAP podczas wczesnego rozwoju królika;
5. Kolokalizacja GATA3 i YAP w zarodku przedimplantacyjnym;
6. Wpływ sygnalizacji RHO-ROCK na szlak Hippo i różnicowanie TE;
7. Różnice w regulacji sygnalizacji Hippo między królikami a innymi gatunkami ssaków.

Rozdział Dyskusja przedstawiony jest rzeczowo, koncentrując się na osiągniętych wynikach i ich interpretacji na tle prac innych Autorów. Doktorantka wykazała się bardzo szeroką wiedzą i ponadprzeciętną znajomością literatury. Piśmiennictwo bardzo bogate, obejmujące aż 282 pozycje, zawiera odpowiednio dobrane z tematem pracy publikacje. Na uwagę zasługuje umiejętność mgr Michniak jasnego formułowania myśli. Wywody przeprowadzone są logicznie. Wysoka dojrzałość Doktorantki w realizacji dysertacji wynika z faktu, że jest członkiem prężnego i aktywnego zespołu kierowanego przez dr hab. Annę Piliszek, którą wysoko cenie.

Wnioski

Obszerna dyskusja płynnie podprowadza do sformułowania wniosków, których jest aż osiem. Należą do nich:

1. TEAD4 jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem z rodziny TEAD, która jest zaangażowana w szlak Hippo w embrionach królików, podobnie jak w modelu myszy i u ludzi.
2. Poziomy transkryptu analizowanych genów szlaku Hippo są podobne w różnych stadiach i kompartmentach ICM/TE, co sugeruje dodatkowy mechanizm regulacji aktywności szlaku Hippo
3. GATA3 jest wczesnym markerem linii TE w zarodku królika
4. Polarność komórek wraz z zagęszczaniem jest inicjowana w stadium 8-komórkowym zarodka królika i oba są procesami ciągłymi aż do stadium 64-komórkowego
5. Lokalizacja YAP zaczyna być

ograniczona do jąder komórek TE w 3,0-3,25 dpc 6. YAP może być wymagany do zainicjowania ekspresji GATA3 w komórkach TE, ale utrzymanie GATA3 prawdopodobnie obejmuje mechanizm niezależny od YAP 7. ROCK kontroluje polaryzację komórek w komórkach TE zarodka 8. Polaryzacja komórek nie jest niezbędna do regulacji subkomórkowej lokalizacji YAP w zewnętrznych komórkach zbitej moruli królika, co oznacza, że polaryzacja komórek nie jest zaangażowana w regulację szlaku Hippo podczas specyfikacji TE.

Proszę zauważyć, że z 8. wniosków tylko jeden, nr 6 jest przypuszczeniem- wszystkie pozostałe są twierdzeniem, zbadanym i potwierdzonym faktem. Trudno wybrać mi najistotniejsze wnioski, gdyż wszystkie uważam za jednakowo ważne. Praca 'przeciera' szlaki w omawianym temacie u królika, co tylko podnosi ich wartość. Wnioski są oryginalne i mają swoje poparcie w wynikach.

Rozdział 'Ograniczenia badawcze i dalsze kierunki' ładnie spina całość dysertacji. Doktorat został złożony, ale problem nie jest do końca rozwiązany. Życzę kontynuowania zarysowanej linii badawczej wedle wytyczonych planów.

Po referencjach umieszczono jeszcze materiał dodatkowy, analizy wykonane na pojedynczych zarodkach dotyczące: Quantification of the contribution of YAP+ and GATA3+ cells in individual embryos at stages III-IV, V, VI, VII oraz Colocalisation of nuclear YAP and GATA3 in the inside and outside cells of control and ROCK-inhibited embryos.

Reasumując uważam, że Autorka wykonała ambitną pracę, starannie zrealizowaną i wartościową. Odnosi się to zarówno do samego zakresu przeprowadzonych badań, których wykonanie wymagało opanowania trudnych i żmudnych czasami metod, jak też uzyskanych wyników, które oceniam jako wartościowe w poznaniu roli szlaku Hippo w różnicowaniu trofektodermi zarodków królików.

Upoważnia mnie to stwierdzenia, iż przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. **Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Michniak do następnych etapów przewodu doktorskiego.**

Ponadto ze względu na aktualność i rangę podjętej problematyki, opanowanie i zastosowanie nowoczesnych metod badawczych, staranność przygotowania dysertacji, a przede wszystkim uzyskanie bardzo wartościowych i ważnych wyników, **proponuję wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Jolanta Opule