



Jacek Z. Kubiak

Rennes, 16 czerwca 2023 r.

Directeur de Recherche au CNRS

IGDR, UMR 6290 CNRS/Université Rennes 1

Rennes

France

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „The Role of the Hippo Pathway in Trophectoderm lineage Specification in the Rabbit Embryo” autorstwa pani mgr Katarzyny Michniak

W przedstawionej do mojej oceny rozprawie doktorskiej autorka zaprezentowała i przedyskutowała wyniki kompleksowych badań zmierzających do wyjaśnienia roli szlaku molekularnego kinazy Hippo w rozwoju trofektodermy zarodka królika. Doktorantka skupiła swoją uwagę na badaniu ekspresji genów zaangażowanych w te procesy, lokalizację ich produktów białkowych i zależnościach potencjalnie mających wpływ na tworzenie się trofektodermy i specyfikację jej komórek.

Poznanie mechanizmów molekularnych procesów wczesnego rozwoju zarodka królika jest bardzo istotne ponieważ większość dostępnych w literaturze naukowej informacji dotyczących tego okresu dotyczy zarodka myszy. Wiele procesów rozwojowych na tym etapie ma podobny, ale nie taki sam przebieg u różnych ssaków. Opieranie wiedzy na ten temat na jednym tylko modelu mysim może prowadzić do nieuprawnionych uogólnień. Właśnie model badawczy rozwoju zarodkowego królika, przy porównaniu z jeszcze innymi modelami rozwojowymi ssaków, może przyczynić się do uzyskania szerszego spojrzenia na mechanizmy molekularne i komórkowe procesów rozwojowych dotyczących również rozwoju człowieka.

Doktorat napisany jest bardzo dobrze i starannie w języku angielskim. Nie znalazłem żadnych błędów, czy literówek w tekście, co jest rzeczą rzadką. Doktorat składa się ze 169 stron i jest dość bogato ilustrowany, co ułatwia jego lekturę i wywód doktorantki.

Podstawowe części rozprawy to: Streszczenie, Wstęp, Hipotezy badawcze, Cele doktoratu, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja z konkluzjami, opisem ograniczeń własnych badań i przyszłymi perspektywami, lista cytowanych publikacji i dodatkowe dane.

We Wstępie doktorantka przedstawia najważniejsze fakty i hipotezy dotyczące procesów polaryzacji komórek zarodka, tworzenia się trofektoderm i węzła zarodkowego, udziału poszczególnych genów i szlaków metabolicznych ze szczególnym uwzględnieniem szlaku kinazy Hippo i białek Rho/ROCK, które ściśle za sobą współpracują i są głównym obiektem badań tej rozprawy.

Trzy wymienione przez doktorantkę hipotezy badawcze dotyczą: 1. Związków polaryzacji komórek zarodka z różnicowaniem trofektoderm, 2. Kontroli szlaku Hippo nad procesem różnicowania się trofektoderm i 3. Różnic pomiędzy regulacją specyfikacji trofektoderm pomiędzy zarodkiem myszy i królika.

Doktorantka wytycza również trzy jasne cele swojej rozprawy. Są to: 1. Zbadanie czy istnieją różnice w ekspresji genów zaangażowanych w szlak Hippo na poszczególnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodka królika, 2. Zbadanie rozmieszczenia poszczególnych składników białkowych szlaku Hippo i białek biorących udział w polaryzacji zarodka królika oczynając od stadium 4-komórkowego do blastocysty, 3. Zweryfikowanie udziału szlaku Hippo i kinazy ROCK w różnicowaniu trofektoderm przy użyciu specyficznych inhibitorów kinazy ROCK.

Materiał i Metody są przedstawione w sposób jasny i przejrzysty z uwzględnieniem wielu szczegółów pozwalających na zrozumienie sposobów prowadzonych badań.

Na Wyniki składa się opis doświadczeń polegających na badaniu ekspresji i lokalizacji produktów poszczególnych genów, których rolą interesuje się doktorantka. Bardzo ciekawa jest drobiazgowość analiza zależności lokalizacji białka YAP w jądrach komórkowych w zależności od lokalizacji białka GATA3, który jest wczesnym markerem trofektoderm. Równie ciekawe są wyniki doświadczeń prowadzonych przy użyciu inhibitora kinazy ROCK – Y-27632.

Diskusja jest bardzo długa i szczegółowa. Doktorantka porównuje swoje wyniki uzyskane na zarodku królika z danymi literaturowymi dotyczącymi zarodków **Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.** innych gatunków ssaków, w tym głównie myszy, ludzi i bydła. Na stronie 139 w Fig. 42 doktorantka przedstawia schematycznie porównanie zasobów dotychczasowej wiedzy na temat regulacji szlaku Hippo w zewnętrznych i wewnętrznych komórkach moruli i w komórkach trofektoderm blastocysty królika, myszy, człowieka i bydła. Dzięki temu graficznemu podsumowaniu czytelnik dostrzega wyraźnie różnice w regulacji badanych procesów u tych czterech gatunków.

Wśród ośmiu konkluzji przedstawionych na str. 140 rozprawy najistotniejsze wydają mi się te, które uzupełniają luki w wiedzy na temat roli szlaku sygnalizacyjnego Hippo w procesach różnicowania i specyfikacji komórek trofektoderm zarodka królika: TEAD4 wydaje się szczególnie mocno zaangażowanym białkiem z rodziny białek TEAD, poziom ekspresji białek szlaku Hippo jest równomierny w trakcie rozwoju przedimplantacyjnego, GATA3 jest wczesnym markerem trofektoderm, lokalizacja białek YAP i GATA3 jest istotna dla regulacji badanych procesów, rola kinazy ROCK jest istotna w procesie polaryzacji komórek zarodka, jednak sama polaryzacja nie wydaje się decydującym czynnikiem ani w lokalizacji białka YAP, ani w regulacji specyfikacji komórek trofektoderm przez szlak sygnalizacyjny kinazy Hippo.

Lista cytowanych publikacji jest pełna, aktualna i obejmuje najważniejsze pozycje z literatury naukowej na temat badanych w doktoracie procesów wczesnego rozwoju zarodka królika i innych ssaków.

Jednym z zastrzeżeń do technicznej strony przedstawionych w rozprawie badań jest brak kontroli polegającej na wybarwieniu immunocytochemicznym zarodków samymi przeciwciałami drugorzędowymi (przy braku specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych). Takie kontrole wykonuje się rutynowo przed przystąpieniem do badań immunolokalizacji białek, więc sędzę, że doktorantka wykonała je, ale nie przedstawiła w swojej rozprawie.

Na ilustracji nr 10 (str. 63) pokazującej lokalizację fosforylowanej formy ezryny zarodki 4- i 8-komórkowy są w osłonce przejrzystej (*zona pellucida*), która bardzo intensywnie i niespecyficznym barwi się przeciwciałem (tu również pytanie, którym - pierwszo- , czy drugorzędowym?), podczas, gdy inne zarodki wydają się być barwione po usunięciu tej osłonki. Dlaczego te dwa zarodki były traktowane inaczej niż pozostałe?

Na ilustracji nr 32 (str. 101) najwyraźniej brakuje lokalizacji aPKC. Według legendy miały to być fotografie 1E, 1E`, 2E i 2E`, aPKC powinna być widoczna w postaci lokalizacji koloru szarego. Doktorantka powinna przedstawić te brakujące ilustracje w trakcie obrony.

Chciałbym także zadać doktorantce pytanie jak w wyniku własnych badań ocenia zależność polaryzacji komórek zarodka, lokalizacji białka YAP i pozostałych składników szlaku sygnalizacyjnego Hippo w procesie specyfikacji trofektodermi.

W przedstawionej tutaj ocenie skupiłem się na formalnej stronie rozprawy ze szczególnym uwzględnieniem merytorycznej i technicznej jakości przedstawionych badań, wykazaniem się umiejętnościami doświadczałnymi przez autorkę, jak również zdolnościami przekazania informacji naukowej w formie pisemnej. Wszystkie te aspekty są w rozprawie bez zarzutu.

Podsumowując, pracę przedstawioną do mojej oceny uważam za bardzo wartościową i w pełni spełniającą wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi. Jest ona na bardzo wysokim poziomie naukowym i z pewnością zasługuje na wyróżnienie, o które w tym miejscu jednoznacznie postuluje. Dlatego z przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Michniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego i szczerze gratuluję jej doskonale wykonanej i zaprezentowanej rozprawy doktorskiej.

Jacek Kubiak