



UNIwersytet
WARSAWski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 7 grudnia 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej "Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynej trzustki" autorstwa mgr Natalii Ziojły.

Praca doktorska Pani mgr Natalii Ziojły powstała w Zakładzie Ekspresji Genów, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorką pracy jest dr hab. Małgorzata Borowiak, prof. UAM.

Celem pracy było określenie roli czynnika transkrypcyjnego ETV1 w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych, określanych w całej pracy, jako pluripotencjalne komórki macierzyste (PSC), zarówno w stanie niezróżnicowanym jak i podczas różnicowania w endoderme i komórki trzustki. Tytuł dosyć dobrze opisuje zawartość pracy, chociaż stwierdzenie, że badany był rozwój trzustki *in vitro* jest zbyt dużym skrótem myślowym. Zadania szczegółowe prowadzonych badań poszerzały znacząco ten cel o precyzyjną analizę ekspresji genów w pluripotencjalnych i różnicujących hESC, nie tylko tych, które zależne były od ETV1. Z punktu widzenia badań podstawowych a także medycyny regeneracyjnej efekty przeprowadzonych badań mogą doprowadzić do praktycznego wykorzystania komórek macierzystych w medycynie. Biorąc pod uwagę wzrastającą liczbę chorych na cukrzycę precyzyjne opisanie molekularnych mechanizmów rozwoju trzustki oraz ich przełożenie na opracowanie metod terapii komórkowych jest kluczowe.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 252 strony (!). To masywne dzieło składa się z *Wykazu stosowanych skrótów*, *Streszczeń* w języku polskim i angielskim, *Wstępu*, *Celu pracy*, *Wyników*, *Dyskusji i perspektyw na przyszłe badania*, *Podsumowania*, *Materialów i metod* oraz *Spisu literaturowego* (oszacowałam go na około 250 pozycji). Praca zawiera także spis publikacji, autorstwa Doktorantki, które są związane z tematyką doktoratu (3), innych publikacji (1) oraz doniesień konferencyjnych (4).

Wstęp do rozprawy został bardzo dobrze przygotowany. W sposób szczegółowy i przystępny przedstawia pluripotencjalne komórki macierzyste, kładąc szczególny nacisk na różne odcienie pluripotencji.

Opisuje mechanizmy molekularne zaangażowane w jej utrzymanie a także możliwe wykorzystanie PSC w terapiach *in vitro*. Bardzo dobrze scharakteryzowana została budowa i funkcja trzustki, jej rozwój a także możliwość wykorzystania komórek macierzystych w medycynie. Na końcu przedstawiono czynnik transkrypcyjny ETV1. Odpowiedni poziom wnikliwości, świetne ilustracje, dobry język (co nie jest stałą cechą całej pracy, ale o tym napiszę w dalszej części recenzji) sprawiają, że *Wstęp* już w obecnej formie mógłby stanowić artykuł przeglądowy. Wbrew pozorom polskojęzyczne prace tego rodzaju stanowią pożądane materiały edukacyjne, zarówno dla studentów jak i dla uczniów szkół średnich. Po zakończeniu lektury *Wstępu* czułam się gotowa do *Wyników*.

W zasadzie brakuje mi dobrego, krótkiego określenia dla *Wyników*. Może powinnam napisać, że są totalne? Ich ogrom na wstępie przytłacza, ale kiedy wpadnie się w rytm, opisywane analizy zaczynają wciągać w wielowątkową historię. Pierwsza część *Wyników* dotyczy sposobu selekcji ETV1, jako czynnika potencjalnie zaangażowanego w rozwój trzustki. Dokonano tego na podstawie wnikliwej analizy już dostępnych danych. Wyniki z licznych prac oraz te umieszczone w bazach dane zostały przeanalizowane przez Doktorantkę. Dzięki temu podsumowana została analiza ekspresji genów badanych metodą scRNAseq w rozwijających się zarodkach, ale przede wszystkim w różnicujących *in vitro* mysich i ludzkich komórkach pluripotencjalnych. Czynnik ETV1 wyrażany był zarówno w epiblaście jak i w pierwotnej endodermie zarodka, a następnie w komórkach endokrynych trzustki, w nieodróżnicowanych komórkach hESC, ale także podczas ich różnicowania w komórki endodermalne *in vitro*. Pozwolę sobie już tutaj zwrócić uwagę na określenie "rozwijająca się trzustka podczas różnicowania *in vitro* z ludzkich komórek PSC". No cóż, trzustka rozwija się *in vivo*, w zarodku. PSC *in vitro* różnicują w takie czy inne komórki ani nie rozwijają się w ten czy inny narząd. Te precyzyjne zestawienia i analizy dostępnych danych dały podstawę do sformułowania hipotezy, że ETV1 odgrywa rolę w rozwoju trzustki. To założenie zostało na kolejnych etapach doktoratu skutecznie zweryfikowane serią precyzyjnie zaplanowanych doświadczeń i analiz wykorzystujących zarówno mysie tkanki jak i różnicujące *in vitro* ludzkie ESC.

Wstępne badania potwierdziły ekspresję ETV1 w komórkach endokrynych trzustek zarodków myszy. Do kolejnych analiz posłużyły ludzkie ESC (hESC) linii Hues-iCas9. Patrząc na ogrom przeprowadzonych analiz nie będę marudzić, że do badań wybrano tylko jedną linię komórkową, chociaż dobrze wiadomo, że każda linia jest odmienna i mogą różnić się one zdolnościami do różnicowania. Co może stanowić zagrożenie dla prowadzonych badań. Szczęśliwie, jak wykazała Doktorantka, wybrana linia hESC była zdolna do różnicowania w kierunku komórek trzustki.

Kluczową częścią doktoratu było określenie roli ETV1 w pluripotencji i różnicowaniu wykorzystując komórki, w których doprowadzono do wyłączenia jego ekspresji. Przebieg doświadczeń mających na celu uzyskanie linii ETV1-KO został bardzo szczegółowo opisany. Pewien defekt tej części pracy stanowią nieczytelne ryciny (rycina 25A, 27A). W zasadzie mogłoby ich nie być. Czcionki są tak małe, że nawet gdybym chciała analizować sekwencje to nie byłoby to możliwe. Porównanie komórek WT i ETV1-KO

przeprowadzono zarówno dla komórek pluripotencjalnych jak i różnicujących. Zastosowano wiele technik pozwalających na stwierdzenie, że komórki te raczej nie różnią się potencjałem proliferacyjnym od komórek kontrolnych a w niektórych warunkach hodowlanych charakteryzują się zwiększoną przyczepnością do podłoża. Kluczowe dla tego etapu pracy było porównanie, metodą sekwencjonowania, transkryptomu komórek pluripotencjalnych obu linii WT i KO. Analiza ta wykazała szereg istotnych różnic sugerując rolę ETV1 w wielu funkcjach życiowych badanych komórek. Komórki ETV1-KO charakteryzowała wyższa ekspresja białek związanych z adhezją do podłoża. Wyniki "adhezyjne" potwierdzono analizując immunolokalizację wybranych białek adhezyjnych, Faktycznie, przy braku ETV1 zwiększa się poziom takich białek. Dokumentacja fotograficzna tych analiz nie budzi żadnych wątpliwości. Doktorantka wykazała także, że w komórkach ETV1-KO dochodzi do hiperfosforylacji AKT (na rycinie 48 brakuje opisu western blota) a następnie zbadała jak na hESC wpływa modulacja ścieżek sygnałowych PI3K/AKT dokumentując udział tej ścieżki w regulacji adhezji zależnej od ETV1. Badane były także różne aspekty regulacji pluripotencji (bez spektakularnych wyników) oraz sygnalizacji zależnej od WNT. Niestety, adhezja wymaga prawidłowego lub obniżonego poziomu ETV1. W przypadku nadekspresji tego hESC nie przylegały prawidłowo do podłoża, odklejały się, w związku z tym ich szczegółowe analizy nie były możliwe.

Drugi, etap analiz fenotypu dotyczył różnicujących *in vitro* komórek WT i ETV1-KO. Różnicowano je doprowadzając do powstawania organoidów i ich hodowli w odpowiednio dobranych warunkach. Czy w jednym dołku szalki hodowlanej powstawało wiele organoidów? Uzyskane "klastry" komórek różniły się wielkością. Czy mogło mieć to wpływ na dynamikę i efekty różnicowania? Czemu nie uzyskiwano kul zarodkowych o zbliżonych rozmiarach, np. techniką "wiszących kropel". Umieszczając w kroplach podobną liczbę komórek można uzyskać podobne kule/organoidy. Ułatwia to analizę wpływu mutacji, np. na rozmiary (proliferację), itd. Materiał jest jednak bardziej homogeny. Nie mniej jednak, analiza kolejnych etapów różnicowania wykazała szereg istotnych zmian w ekspresji genów wywołanych brakiem ETV1. Bardzo ważnym odkryciem było to, że czynnik ten jest niezbędny do powstawania ektodermy. Przy jego braku dominowały komórki pochodzenie endodermalnego i mezodermalnego. Analiza dalszych etapów różnicowania w komórki beta trzustki (scRNAseq, immunolokalizacja) udowodniła, że ETV1 istotnie odgrywa istotną rolę w powstawaniu komórek endokrynych. Gorąco zachęcam wszystkich zainteresowanych rozwojem trzustki do zapoznania się z tymi analizami. Wyniki obejmują ogrom zestawień i porównań populacji komórek obecnych na kolejnych etapach różnicowania hESC i skarbnicę, a wręcz studnię bez dna, danych. Uzyskane wyniki świetnie dokumentują kiedy ETV1 reguluje a kiedy nie reguluje różnicowania. Z całą pewnością przy jego braku ograniczona jest populacja komórek PP, co zaburzało powstawanie tzw. wczesnych komórek beta trzustki. Może to mieć związek z zaburzeniami adhezji tych komórek. Ostrzegam jedynie, że nieczytelne są ryciny 62 i 63, a przynajmniej ja nie byłam w stanie odcyfrować opisów osi.

Podsumowując, ogrom przeprowadzonych badań doprowadził do uzyskania nowatorskich i bardzo istotnych dla zrozumienia rozwoju trzustki wyników. Doktorantka zidentyfikowała i scharakteryzowała rolę ETSV1 w adhezji komórkowej oraz w powstawaniu komórek beta trzustki. Wyniki zostały przedstawione w sposób logiczny, a to przy ich ogromie niekoniecznie było łatwym zadaniem.

W **Dyskusji** wyniki zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Na szczególne podkreślenie i wyróżnienie zasługuje fakt, że ten fragment pracy jest bardzo zwięzły i dobrze przemyślany. Doktorantka uniknęła błędu wielu młodych naukowczyń i naukowców - powtarzania opisu wyników. Uważam, że to dowód dojrzałości naukowej - prawidłowa selekcja materiału do dyskusji i jednocześnie uniknięcie uproszczeń, zwrócenie uwagi na perspektywy dalszych badań. W puli uzyskanych danych jeszcze wiele pozostaje do przeanalizowania. Dyskusja nie budzi moich wątpliwości.

Materiały i metody. Podobnie jak w przypadku **Wyników** był ich ogrom. Cele doktoratu mgr Natalia Ziojła zrealizowała przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystwała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, analizy bioinformatyczne. Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, CHIP, analizy transkryptomu, qRT-PCR, immunodetekcja, Western blotting i inne. Otrzymane dane poddane zostały analizom bioinformatycznym i statystycznym. Zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło Doktorantce na doskonałe opanowanie warsztatu naukowca. **Materiały i Metody** prezentują także wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki.

Rozprawa doktorska napisana jest po polsku. W zasadzie tylko **Wstęp** jest napisany w sposób, który budził moje małe zastrzeżenia. Pozostałe części obfitują w żargonowe określenia czy błędy stylistyczne. Sprawiają wrażenie, że ten ogrom danych i ich opisanie nie było łatwe, co akurat mnie nie dziwi. W warstwie językowej czuć także trud prowadzonych badań. Komórki są odrywane, odczepiane, wyciągane z próbówki, pożywka ściągana. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilka stylistycznie wątpliwych określeń czy błędów. Przykładowo: "dorosłe komórki (str. 19)", "prymitywna endoderma" (str. 30), "sgRNA na ekson 9 ze stężeniem sgRNA .." (str. 83), "komórki w stężeniu" (str. 88), "przyrost konfluencji był analizowany z interwałem co dwie godziny.." (str. 92), "posiane w pasażu do pojedynczych komórek" (str. 92), "rozwój komórek w stronę" (str. 144), "pożywka utrzymująca plenipotencję" (str. 147), "zajdą odwrotne mechanizmy molekularne" (str. 186), "generacja organoidów" (str. 196), "w wodzie wonnej od nukleaz" (str. 202), "plazmid został transformowany do komórek" (str. 209), itd. Nie jestem pewna czy wszystkie nazwy genów należy tłumaczyć na polski - orthodenticle homeobox 2 (OTX2) brzmi zdecydowanie lepiej niż ortodontyczny gen 2. No ale nobody's perfect.

Podsumowując, mgr Natalia Ziojła zrealizowała wszystkie postawione cele. Jej TYTANICZNY wręcz wysiłek pozwolił na wielowątkową analizę ludzkich ESC, określenie roli ETSV1 w komórkach pluripotencjalnych i różnicujących w komórki beta trzustki. Dostarczył materiał do dalszych badań. Przeprowadzone doświadczenia i analiza uzyskanych wyników świadczą o samodzielności i dojrzałości

Doktorantki. Co istotne, podczas realizacji doktoratu pani mgr Ziojła opublikowała już część rezultatów oraz uczestniczyła w innych projektach badawczych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymaganiami art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Natalii Ziojły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową przedstawionej rozprawy, jej nowatorski charakter, i stworzenie podłoża do dalszych badań o dużym znaczeniu także aplikacyjnym, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

M. Ciemerych



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 7 grudnia 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej "Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki" autorstwa mgr Natalii Ziojły.

Praca doktorska Pani mgr Natalii Ziojły powstała w Zakładzie Ekspresji Genów, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorką pracy jest dr hab. Małgorzata Borowiak, prof. UAM.

Celem pracy było określenie roli czynnika transkrypcyjnego ETV1 w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych, określanym w całej pracy, jako pluripotencjalne komórki macierzyste (PSC), zarówno w stanie nieodróżnionym jak i podczas różnicowania w endoderme i komórki trzustki. Tytuł dosyć dobrze opisuje zawartość pracy, chociaż stwierdzenie, że badany był rozwój trzustki *in vitro* jest zbyt dużym skrótem myślowym. Zadania szczegółowe prowadzonych badań poszerzały znacząco ten cel o precyzyjną analizę ekspresji genów w pluripotencjalnych i różnicujących hESC, nie tylko tych, które zależne były od ETV1. Z punktu widzenia badań podstawowych a także medycyny regeneracyjnej efekty przeprowadzonych badań mogą doprowadzić do praktycznego wykorzystania komórek macierzystych w medycynie. Biorąc pod uwagę wzrastającą liczbę chorych na cukrzycę precyzyjne opisanie molekularnych mechanizmów rozwoju trzustki oraz ich przełożenie na opracowanie metod terapii komórkowych jest kluczowe.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 252 strony (!). To masywne dzieło składa się z *Wykazu stosowanych skrótów*, *Streszczeń* w języku polskim i angielskim, *Wstępu*, *Celu pracy*, *Wyników*, *Dyskusji i perspektyw na przyszłe badania*, *Podsumowania*, *Materiałów i metod* oraz *Spisu literaturowego* (oszacowałam go na około 250 pozycji). Praca zawiera także spis publikacji, autorstwa Doktorantki, które są związane z tematyką doktoratu (3), innych publikacji (1) oraz doniesień konferencyjnych (4).

Wstęp do rozprawy został bardzo dobrze przygotowany. W sposób szczegółowy i przystępny przedstawia pluripotencjalne komórki macierzyste, kładąc szczególny nacisk na różne odcienie pluripotencji.

ul. Iłji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

Opisuje mechanizmy molekularne zaangażowane w jej utrzymanie a także możliwe wykorzystanie PSC w terapiach *in vitro*. Bardzo dobrze scharakteryzowana została budowa i funkcja trzustki, jej rozwój a także możliwość wykorzystania komórek macierzystych w medycynie. Na końcu przedstawiono czynnik transkrypcyjny ETV1. Odpowiedni poziom wnikliwości, świetne ilustracje, dobry język (co nie jest stałą cechą całej pracy, ale o tym napiszę w dalszej części recenzji) sprawiają, że **Wstęp** już w obecnej formie mógłby stanowić artykuł przeglądowy. Wbrew pozorom polskojęzyczne prace tego rodzaju stanowią pożądane materiały edukacyjne, zarówno dla studentów jak i dla uczniów szkół średnich. Po zakończeniu lektury **Wstępu** czułam się gotowa do **Wyników**.

W zasadzie brakuje mi dobrego, krótkiego określenia dla **Wyników**. Może powinnam napisać, że są totalne? Ich ogrom na wstępie przytłacza, ale kiedy wpadnie się w rytm, opisywane analizy zaczynają wciągać w wielowątkową historię. Pierwsza część **Wyników** dotyczy sposobu selekcji ETV1, jako czynnika potencjalnie zaangażowanego w rozwój trzustki. Dokonano tego na podstawie wnikliwej analizy już dostępnych danych. Wyniki z licznych prac oraz te umieszczone w bazach dane zostały przeanalizowane przez Doktorantkę. Dzięki temu podsumowana została analiza ekspresji genów badanych metodą scRNAseq w rozwijających się zarodkach, ale przede wszystkim w różnicujących *in vitro* mysich i ludzkich komórkach pluripotencjalnych. Czynnik ETV1 wyrażany był zarówno w epiblaście jak i w pierwotnej endodermie zarodka, a następnie w komórkach endokrynych trzustki, w nieodróżnionych komórkach hESC, ale także podczas ich różnicowania w komórki endodermalne *in vitro*. Pozwolę sobie już tutaj zwrócić uwagę na określenie "rozwijająca się trzustka podczas różnicowania *in vitro* z ludzkich komórek PSC". No cóż, trzustka rozwija się *in vivo*, w zarodku. PSC *in vitro* różnicują w takie czy inne komórki ani nie rozwijają się w ten czy inny narząd. Te precyzyjne zestawienia i analizy dostępnych danych dały podstawę do sformułowania hipotezy, że ETV1 odgrywa rolę w rozwoju trzustki. To założenie zostało na kolejnych etapach doktoratu skutecznie zweryfikowane serią precyzyjnie zaplanowanych doświadczeń i analiz wykorzystujących zarówno mysie tkanki jak i różnicujące *in vitro* ludzkie ESC.

Wstępne badania potwierdziły ekspresję ETV1 w komórkach endokrynych trzustek zarodków myszy. Do kolejnych analiz posłużyły ludzkie ESC (hESC) linii Hues-iCas9. Patrząc na ogrom przeprowadzonych analiz nie będę marudzić, że do badań wybrano tylko jedną linię komórkową, chociaż dobrze wiadomo, że każda linia jest odmienna i mogą różnić się one zdolnościami do różnicowania. Co może stanowić zagrożenie dla prowadzonych badań. Szczęśliwie, jak wykazała Doktorantka, wybrana linia hESC była zdolna do różnicowania w kierunku komórek trzustki.

Kluczową częścią doktoratu było określenie roli ETV1 w pluripotencji i różnicowaniu wykorzystując komórki, w których doprowadzono do wyłączenia jego ekspresji. Przebieg doświadczeń mających na celu uzyskanie linii ETV1-KO został bardzo szczegółowo opisany. Pewien defekt tej części pracy stanowią nieczytelne ryciny (rycina 25A, 27A). W zasadzie mogłoby ich nie być. Czcionki są tak małe, że nawet gdybym chciała analizować sekwencje to nie byłoby to możliwe. Porównanie komórek WT i ETV1-KO

przeprowadzono zarówno dla komórek pluripotencjalnych jak i różnicujących. Zastosowano wiele technik pozwalających na stwierdzenie, że komórki te raczej nie różnią się potencjałem proliferacyjnym od komórek kontrolnych a w niektórych warunkach hodowlanych charakteryzują się zwiększoną przyczepnością do podłoża. Kluczowe dla tego etapu pracy było porównanie, metodą sekwencjowania, transkryptomu komórek pluripotencjalnych obu linii WT i KO. Analiza ta wykazała szereg istotnych różnic sugerując rolę ETV1 w wielu funkcjach życiowych badanych komórek. Komórki ETV1-KO charakteryzowała wyższa ekspresja białek związanych z adhezją do podłoża. Wyniki "adhezyjne" potwierdzono analizując immunolokalizację wybranych białek adhezyjnych, Faktycznie, przy braku ETV1 zwiększa się poziom takich białek. Dokumentacja fotograficzna tych analiz nie budzi żadnych wątpliwości. Doktorantka wykazała także, że w komórkach ETV1-KO dochodzi do hiperfosforylacji AKT (na rycinie 48 brakuje opisu western blota) a następnie zbadała jak na hESC wpływa modulacja ścieżek sygnałowych PI3K/AKT dokumentując udział tej ścieżki w regulacji adhezji zależnej od ETV1. Badane były także różne aspekty regulacji pluripotencji (bez spektakularnych wyników) oraz sygnalizacji zależnej od WNT. Niestety, adhezja wymaga prawidłowego lub obniżonego poziomu ETV1. W przypadku nadekspresji tego hESC nie przylegały prawidłowo do podłoża, odklejały się, w związku z tym ich szczegółowe analizy nie były możliwe.

Drugi, etap analiz fenotypu dotyczył różnicujących *in vitro* komórek WT i ETV1-KO. Różnicowano je doprowadzając do powstawania organoidów i ich hodowli w odpowiednio dobranych warunkach. Czy w jednym dołku szalki hodowlanej powstawało wiele organoidów? Uzyskane "klastry" komórek różniły się wielkością. Czy mogło mieć to wpływ na dynamikę i efekty różnicowania? Czemu nie uzyskiwano kul zarodkowych o zbliżonych rozmiarach, np. techniką "wiszących kropeł". Umieszczając w kroplach podobną liczbę komórek można uzyskać podobne kule/organoidy. Ułatwia to analizę wpływu mutacji, np. na rozmiary (proliferację), itd. Materiał jest jednak bardziej homogeny. Nie mniej jednak, analiza kolejnych etapów różnicowania wykazała szereg istotnych zmian w ekspresji genów wywołanych brakiem ETV1. Bardzo ważnym odkryciem było to, że czynnik ten jest niezbędny do powstawania ektodermy. Przy jego braku dominowały komórki pochodzenie endodermalnego i mezodermalnego. Analiza dalszych etapów różnicowania w komórki beta trzustki (scRNAseq, immunolokalizacja) udowodniła, że ETV1 istotnie odgrywa istotną rolę w powstawaniu komórek endokrynych. Gorąco zachęcam wszystkich zainteresowanych rozwojem trzustki do zapoznania się z tymi analizami. Wyniki obejmują ogrom zestawień i porównań populacji komórek obecnych na kolejnych etapach różnicowania hESC i skarbnicę, a wręcz studnię bez dna, danych. Uzyskane wyniki świetnie dokumentują kiedy ETV1 reguluje a kiedy nie reguluje różnicowania. Z całą pewnością przy jego braku ograniczona jest populacja komórek PP, co zaburzało powstawanie tzw. wczesnych komórek beta trzustki. Może to mieć związek z zaburzeniami adhezji tych komórek. Ostrzegam jedynie, że nieczytelne są ryciny 62 i 63, a przynajmniej ja nie byłam w stanie odcyfrować opisów osi.

Podsumowując, ogrom przeprowadzonych badań doprowadził do uzyskania nowatorskich i bardzo istotnych dla zrozumienia rozwoju trzustki wyników. Doktorantka zidentyfikowała i scharakteryzowała rolę ETSV1 w adhezji komórkowej oraz w powstawaniu komórek beta trzustki. Wyniki zostały przedstawione w sposób logiczny, a to przy ich ogromie niekoniecznie było łatwym zadaniem.

W *Dyskusji* wyniki zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Na szczególne podkreślenie i wyróżnienie zasługuje fakt, że ten fragment pracy jest bardzo zwięzły i dobrze przemyślany. Doktorantka uniknęła błędu wielu młodych naukowców i naukowców - powtarzania opisu wyników. Uważam, że to dowód dojrzałości naukowej - prawidłowa selekcja materiału do dyskusji i jednocześnie uniknięcie uproszczeń, zwrócenie uwagi na perspektywy dalszych badań. W puli uzyskanych danych jeszcze wiele pozostaje do przeanalizowania. Dyskusja nie budzi moich wątpliwości.

Materiały i metody. Podobnie jak w przypadku *Wyników* był ich ogrom. Cele doktoratu mgr Natalia Ziojła zrealizowała przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystwała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, analizy bioinformatyczne. Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, CHIP, analizy transkryptomu, qRT-PCR, immunodetekcja, Western blotting i inne. Otrzymane dane poddane zostały analizom bioinformatycznym i statystycznym. Zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło Doktorantce na doskonałe opanowanie warsztatu naukowca. *Materiały i Metody* prezentują także wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki.

Rozprawa doktorska napisana jest po polsku. W zasadzie tylko *Wstęp* jest napisany w sposób, który budził moje małe zastrzeżenia. Pozostałe części obfitują w żargonowe określenia czy błędy stylistyczne. Sprawiają wrażenie, że ten ogrom danych i ich opisanie nie było łatwe, co akurat mnie nie dziwi. W warstwie językowej czuć także trud prowadzonych badań. Komórki są odrywane, odczepiane, wyciągane z probówki, pożywka ściągana. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilka stylistycznie wątpliwych określeń czy błędów. Przykładowo: "dorosłe komórki (str. 19)", "prymitywna endoderma" (str. 30), "sgRNA na ekson 9 ze stężeniem sgRNA .." (str. 83), "komórki w stężeniu" (str. 88), "przyrost konfluencji był analizowany z interwałem co dwie godziny.." (str. 92), "posiane w pasażu do pojedynczych komórek" (str. 92), "rozwój komórek w stronę" (str. 144), "pożywka utrzymująca plenipotencję" (str. 147), "zajdą odwrotne mechanizmy molekularne" (str. 186), "generacja organoidów" (str. 196), "w wodzie wonnej od nukleaz" (str. 202), "plazmid został transformowany do komórek" (str. 209), itd. Nie jestem pewna czy wszystkie nazwy genów należy tłumaczyć na polski - orthodenticle homeobox 2 (OTX2) brzmi zdecydowanie lepiej niż ortodontyczny gen 2. No ale nobody's perfect.

Podsumowując, mgr Natalia Ziojła zrealizowała wszystkie postawione cele. Jej TYTANICZNY wręcz wysiłek pozwolił na wielowątkową analizę ludzkich ESC, określenie roli ETSV1 w komórkach pluripotencjalnych i różnicujących w komórki beta trzustki. Dostarczył materiał do dalszych badań. Przeprowadzone doświadczenia i analiza uzyskanych wyników świadczą o samodzielności i dojrzałości

Doktorantki. Co istotne, podczas realizacji doktoratu pani mgr Ziojła opublikowała już część rezultatów oraz uczestniczyła w innych projektach badawczych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Natalii Ziojły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową przedstawionej rozprawy, jej nowatorski charakter, i stworzenie podłoża do dalszych badań o dużym znaczeniu także aplikacyjnym, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

M. Ciemerych