

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogólne, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwycionych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokość ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlatego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłyby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgrNA, optymalizowania stężenia, a później pracowitej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteiny macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano esaju typowo adhezyjnego, tylko esej konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznanym mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowania do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanika, a później pojawia się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury *in vitro* różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie myli, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbicie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogólne, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwyconych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokości ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlaczego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłyby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgRNA, optymalizowania stężenia, a później pracownej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteiny macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano eseju typowo adhezyjnego, tylko eseju konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznanym mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowania do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanika, a później pojawia się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury in vitro różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie mylę, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbicie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogólne, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwyconych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokości ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlaczego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłyby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgRNA, optymalizowania stężenia, a później pracowitej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteiny macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano eseju typowo adhezyjnego, tylko esej konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznan mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowanie do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanik, a później pojawianie się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury in vitro różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie mylę, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbicie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogóle, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwycionych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokości ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlaczego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłyby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgRNA, optymalizowania stężenia, a później pracownej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteiny macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano esaju typowo adhezyjnego, tylko esej konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznan mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowanie do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanik, a później pojawianie się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury in vitro różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie mylę, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbicie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogóle, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwyczonych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokości ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlatego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłoby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgRNA, optymalizowania stężenia, a później pracowitej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteiny macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano eseju typowo adhezyjnego, tylko esej konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznan mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowanie do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanik, a później pojawianie się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury in vitro różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie mylę, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbitcie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel

dr hab. Maciej Figiel, profesor ICHB

Poznań, 29.11.22

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: mgr Natalia Maria Ziojła

Tytuł rozprawy.: *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki*

Promotorka pracy: prof. UAM dr. hab. Małgorzata Borowiak

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody, liczne tabele oraz 75 rycin. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. Rozprawa doktorska jest poparta publikacjami, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ziojła wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który jest niezwykle merytoryczny i obejmuje 41 stron informacji bardzo potrzebnych do zrozumienia części eksperymentalnej i dyskusji. Dużą część wstępu zajmuje świetne opracowanie tematu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można zarówno informacje bardziej ogóle, jak i szczegółowe na temat regulacji stanu pluripotencji, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Wszystkie informacje opatrzone są bardzo dobrymi rysunkami pomagającymi zrozumieć wymagającą tematykę.

Rysunki są przygotowane ze znacznym wkładem pracy i nie oszczędzono na nie miejsca. Następnie omawiany jest modelowy organ badań, trzustka i jej biologia komórkowa. Poruszony zostaje temat medycyny regeneracyjnej i fakt, że trzustka i cukrzyca są dobrym modelem do takich badań. Autorka wyjaśnia, że w trzustce tylko jeden typ komórek produkuje insulinę i ten typ właśnie ulega zniszczeniu na skutek procesów autoodpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do schorzenia. Dlatego w przypadku terapii regeneracyjnej cukrzycy należałoby naprawić wybiórczo tylko komórki beta trzustki. Poruszane są aspekty powstawania i różnicowania komórek trzustki w czasie rozwoju embrionalnego. Wiąże się to bezpośrednio z późniejszymi wnioskami na temat roli ETV1, który jest głównym bohaterem rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” mgr Ziojła wspomina, że rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w komórkach pluripotencjalnych i w komórkach embrionalnych trzustki w rozwoju tego organu nie została jeszcze poznana. Celem było zbadanie roli ETV1 w trzustce embrionalnej i dorosłej i komórkach PSC. Aby poznać rolę ETV1, wygenerowano model, w którym wyłączono gen ETV1 w komórkach PSC. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji oraz nad ekspresji ETV1 co doprowadziło do nakreślenia roli tego faktora w rozwoju trzustki. Oceniam postawione cele rozprawy jako niezwykle ambitne, a ich poznanie za ważne dla zrozumienia biologii trzustki.

Już pobieżny przegląd rozdziału wyniki (sekcja liczy sobie ponad 120 stron) potwierdza wstępny wniosek, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem pracy.

Analiza danych

W tym obszernym podsumowaniu Autorka postanowiła przeanalizować ekspresję mRNA ETV1 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji ETV1 w stadiach rozwojowych takich jak PSC, mysiej rozwijającej się trzustki, w mysiej dojrzałej i ludzkiej trzustce. Pod rysunkami da się znaleźć odnośniki internetowe do narzędzi on-line i źródłowe publikacje, jednak nie ma podrozdziału w metodach ani w wynikach, który podsumowałby sposób przeprowadzenia analiz. Technika scRNAseq jest stosunkowo niestandardyzowana (kapsułkowanie, komórki i jądra komórkowe, liczba komórek, końcowa liczba uchwycionych transkryptów na komórkę, liczba odczytów, rozwój metod pomiędzy rokiem 2016 - 2019 itp.) Parametry te w różnych eksperymentach w istotny sposób mogą wpływać na wnioski końcowe. Czy w jakiś sposób standaryzowano wyniki? Przytoczonych jest sporo wizualizacji, jednak trudno za nimi szybko podążać. Dlatego w końcowym rezultacie bardzo pomocna byłaby tabelka lub heatmap podsumowująca populacje i stadia rozwojowe z ETV1, a także jego poziom w odniesieniu do innych populacji.

W wynikach czasami można przeczytać zbyt ogólne: „...czynnik ETV1 ulega wysokiej ekspresji...” lub „...poziom ekspresji ETV1 był niższy niż...” i nie towarzyszą temu żadne liczby charakteryzujące wysokość ekspresji, rozkład w populacjach lub konkretną liczbę komórek w populacjach (w niektórych miejscach są przytoczone liczby z odsetkami populacji). Single Cell Expression Atlas EMBL dla zestawu danych oferuje zestaw plików rezultatów w sekcji „downloads” do dokładniejszej analizy. Wizualizacje rozkładu ekspresji genów w populacjach i wnioskowanie w wynikach jest zgodne z prawdą, ale w niektórych przypadkach jest niezrozumiałe. Na przykład (Rys. 10), ewidentne jest, że ekspresja ETV1 jest wyższa w aktywowanych względem ekspresji ETV1 w naiwnych populacjach PSC, natomiast w przypadku NANOG jego ekspresja jest mniej lub bardziej równa w obu populacjach. Natomiast porównanie poziomu ekspresji NANOG z poziomem ekspresji ETV1 jest dla mnie niezrozumiałe i dlaczego porównanie tylko liczby transkryptów ETV1 do NANOG miałyby wskazywać na rolę biologiczną. Chyba że znaczenie jest takie, że profil występowania Nanog w populacji jest inny w porównaniu do profilu ETV1? Należy też powiedzieć, że czasami wnioskowanie mogłyby być bardziej ostrożne. Na przykład w rozprawie znajduje się stwierdzenie, że ekspresję ETV1 wykryto we wszystkich grupach komórek trzustki. Na wizualizacji widać, że 71% komórek nie zawierało ekspresji ETV1, dlatego można sobie wyobrazić, że wśród tych komórek można wyizolować jeszcze wiele populacji o dużym znaczeniu biologicznym, które w ogóle nie posiadają ETV1 lub populacje, która posiadają np. 2-5 komórek pozytywnych, a reszta komórek w tym typie jest negatywna na ETV1. Dodatkowo czytając pierwszą analityczną część wyników, ma się pewne wrażenie, że znaczna część tekstu w istocie bardziej nadawałoby się do dyskusji, a nie do wyników.

Rozwojowa analiza obecności ETV

Następna część wyników to badanie obecności białka ETV1 na różnych etapach rozwoju w modelu mysim (E16-17, dorosłym) i ludzkim w ko-ekspresji z GCG, czyli wczesne komórki alfa. Dodatkowo wysoka ekspresja ETV jest w komórkach PP i wczesnych beta. Obserwacja również wcześniejszych stadiów rozwoju trzustki (E9-10) stanowiłoby bardziej jednolity układ eksperymentalny.

Model KO ETV1

Następny etap w pracy to uzyskanie linii KO ETV1, które są bezcennym narzędziem do badania roli ETV1 w rozwoju trzustki. Pragnę pogratulować Autorce za sukces na tym etapie i konstrukcję tego modelu badawczego, chociaż wymaga to czasochłonnego przetestowania sgRNA, optymalizowania stężenia, a później pracownej izolacji i genotypowania klonów.

Przebiegając dalej po tekście rozprawy, napotykałem badania funkcjonalne i dalej dopiero w rozdziale 3.5.6 badanie pluripotencji ETV1-KO vs WT, w postaci badania Oct, Sox i Nanog (brak zmiany). Jeszcze dalej w 3.6.1 jest spontaniczne różnicowanie, które w zasadzie jest testem pluripotencji i widać tu duże różnice. W związku z tym drobna uwaga co do kolejności: czy pluripotencja uzyskanych klonów nie powinna być sprawdzona niezwłocznie po wygenerowaniu klonów ETV1-KO zamiast na samym końcu po badaniu adhezji, transkryptomu i poziom białek adhezyjnych.

Charakterystyka funkcjonalna KO ETV1

W rozprawie badania homeostazy w PSC ETV1-KO skupiają się na ocenie proliferacji komórek z użyciem aparatu Incucyte. Oceniono przyrost konfluencji po wysianiu m.in. $1,5 \times 10^4$ po 24 h i 48 h - krzywa wzrostu jest praktycznie taka sama, a dopiero później można obserwować zmiany w konfluencji. Świadczyłoby to o innym mechanizmie powstawania szybszej konfluencji niż proliferacja i rzeczywiście fosforylacja histonu H3 jako esej proliferacyjny nie wykazał zmian. Ponieważ proliferacja nie była zmieniona, zbadano adhezję komórek na podłożach i tutaj wykryto większe przywierania ETV1-KO na różnych substratach ECM. Co ciekawe doniesienia z literatury wskazują, że genami, które są celem czynnika transkrypcyjnego ETV1, są metaloproteinazy macierzy zewnątrz komórkowej. Wszystko te badania razem wskazywałoby na zmiany w migracji komórek ETV1-KO niż zmiany w proliferacji. Doniesienia literaturowe wskazują również na regulację enzymów proteolitycznych przez fosforylację PI3K/AKT. Autorka udowodniła, że ETV1 jest regulowany przez tę ścieżkę w komórkach PSC z użyciem inhibitorów oraz badania konfluencji. Dlaczego nie zastosowano eseju typowo adhezyjnego, tylko esej konfluencji, który można mylić z proliferacją. Podsumowując tę część, trzeba przyznać, że Autorka bardzo dobrze udokumentowała funkcję ETV1 w adhezji.

Rola ETV w różnicowaniu komórek trzustki

Końcowa część wyników opisuje rolę ETV1 w różnicowaniu komórek pluripotencjalnych do listków zarodkowych oraz indukowane różnicowanie do komórek trzustki. Spontaniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych wykazało wysoką ekspresję markerów endodermy i mezodermy, a niską ekspresję markerów ektodermy w tych komórkach w porównaniu do PSC WT. Komórki ETV1-KO powinny zatem efektywnie tworzyć komórki endodermy, a później komórki progenitorowe. Jednak dalsze eksperymenty wykazują, że te komórki się wykształcają, ale mimo to ich różnicowanie nie postępuje dalej do komórek beta. Świadczy o tym fakt, że w komórkach EP marker komórek beta NKX6-1 jest na niskim poziomie (eksperymenty immunobarwienia i scRNAseq). Pojawiają się natomiast markery komórek alfa trzustki. Godnym zastanowienia jest fakt, czy istnieją genetyczne zaburzenia rozwojowe, w których następuje

deficyt różnicowania do komórek beta trzustki i czy takie genetyczne zaburzenia mają coś wspólnego z wpływem ETV1. To samo dotyczy modelu knock-out, w którym można zaobserwować, czy istnieją jakieś sygnały parakryne, które kompensują brak ETV-1 w trzustce. Modele KO istnieją i rodzą się żywe, mimo ciężkiego fenotypu neurologicznego nie opisano stanu trzustki.

Końcowe wnioski w pracy

ETV1 jest regulatorem różnicowania i dojrzewania embionalnej trzustki co jest powiązane z funkcją ETV1 w regulacji adhezji i wpływem tego białka na różne typy pluripotencji komórki PSC. Wynika z tego jeszcze nieznan mechanizm, który wpływa na zablokowanie różnicowanie do komórek beta trzustki. W dyskusji znajduje się krótkie omówienie na temat mechanizmów, które mogą grać rolę i udział innych białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych takich jak kinaza FAK, integryny oraz inne białka ETV. Jednak w porównaniu do poprzednich obszernych rozdziałów, dyskusja mogłaby ująć więcej aspektów. W jaki sposób modulacja ETV1 i adhezji mogłaby zostać użyta do regeneracji komórek beta? Również ze względu na charakterystyczny profil ekspresji ETV1 w rozwoju (ekspresja w PSC jest znacząca, potem zanik, a później pojawianie się w finalnie zróżnicowanych komórkach). Jak użycie modulacji ETV1 do regeneracji ma się do potencjału onkologicznego tego białka?

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością, obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/CAS, cytometrię przepływową i sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Metody są udokumentowane bardzo starannie i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Niezwykle ciekawe są procedury in vitro różnicowania komórek trzustki z komórek pluripotencjalnych.

Końcowa uwaga od rozprawy jest związana z ilością prób i powtórzeń biologicznych. Mimo że w eksperymentach w pracy przedstawione są statystyki dla poszczególnych prób, jednakże jeżeli się nie mylę, to wnioski w rozprawie są oparte na jednym lub dwóch klonach ETV1-KO. Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu ETV1, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub zostaje nabyta podczas wielokrotnego pasażowania PSC przy generowaniu klonów komórek.

3. Uwagi techniczne

Wyłącznie techniczne uwagi do tekstu rozprawy są związane z jej aranżacją i rozbudowaną liczbą stron i rycin. Taki rozbudowany sposób przekazu zdecydowanie utrudnia czytanie. Do ogromnej ilości stron przyczyniają się rysunki, które są w nadmiernej liczbie i nadmiernie powiększone. Powiększone

rysunki powodują rozbicie względnie krótkiego tekstu między nimi. Przykładem mogą być schematy sygnalizacji komórkowej (ale też inne), które obejmują całą stronę A4. Pragnę się zgodzić, że rysunki wyraźne, dobrze zaaranżowane i o odpowiedniej wielkości są zawsze zaletą. Natomiast powiększanie ponad pewien rozmiar już nie poprawia ich czytelności, a tylko zajmuje miejsce.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojła została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Marii Ziojła zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia biologii komórkowej trzustki, jej rozwoju, różnicowania i komórek macierzystych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Natalii Marii Ziojła spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Natalia Maria Ziojła powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel