



UNIwersytet
Warszawski

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



Warszawa, 18 stycznia 2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. Eugeniusza Tralle:
Cell lineage tracing in zebrafish heart development**

Praca doktorska Pana mgr. Eugeniusza Tralle powstała w Laboratorium Genomiki Rozwoju *Danio* Pręgowanego, Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Promotorką była dr hab. Cecilia Winata

Celem pracy była charakterystyka mechanizmów molekularnych zaangażowanych w powstawanie wtórnego pola/obszaru sercotwórczego podczas rozwoju zarodkowego *Danio rerio* oraz stworzenie narzędzi badawczych umożliwiających analizę losów komórek i ekspresji genów w pojedynczych komórkach tworzących pola sercotwórcze. Podczas realizacji tych celów Doktorant skupiał się na roli czynników biorących udział w specyfikacji komórek progenitorowych serca, w szczególności na *Nkx2.5*, ale także na *Isl1* i innych. U podłoża badań leżały odkrycia wykazujące na istnienie zróżnicowania wśród prekursorów komórek tworzących pola sercotwórcze, których wyjaśnienie, rzecz jasna, może być kluczowe dla zrozumienia rozwoju serca kręgowców. Może mieć także wpływ na określenie podłoża zaburzeń kardiomiogeny a być może także na terapię niektórych patologii.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to licząca 88 stron praca w języku angielskim, która została podzielona na dwie części. Obie poprzedzono wspólnym **Wstępem**, który stanowi 11 stron. **Materiały i metody** części I to 4 strony, części II to 6 stron; **Wyniki** części I to 17 stron, części II to 14 stron, **Dyskusja** części I to 4 strony, części II to 3 strony. Koniec pracy stanowią wspólne **Konkluzje**. Ponadto, praca zawiera **Spis treści**, **Spis rycin i tabel**, **Spis skrótów**, **Streszczenia** w języku polskim i angielskim, **Bibliografię** (131 pozycji). Dodatkowo Doktorant zamieścił spis stypendiów oraz dane bibliograficzne dwóch publikacji, których jest autorem (niezwiązanych z tematyką doktoratu). Praca ma więc nietypową formę, sprawia raczej wrażenie dwóch manuskryptów (*in statu nascendi*) niż tradycyjnej rozprawy doktorskiej. Jest bardzo zwięzła, a to nie zawsze działało na jej korzyść.

Wstęp. W pierwszej części przedstawiono *Danio rerio*, jako świetny model do badań z dziedziny biologii rozwoju. Następnie scharakteryzowany został przebieg rozwoju serca kręgowców. Pomocny byłby schemat obrazujący kolejne etapy tego procesu i wskazujący na te, które były celem

przewodzonych badań. Ważnym aspektem tego rozdziału jest wskazanie na historię badań nad wtórnym polem sercotorwórczym oraz czynnikami regulującymi specyfikację jego komórek. W tej części Doktorant opisał m.in. czynniki Nkx2.5, Isl1. Bardzo skrótowo (dwa akapity) przedstawiono narzędzia, takie jak „single cell sequencing” czy „lineage tracing” – zabrakło mi informacji czy i jak techniki te wykorzystywane były w przeszłości w badaniach rozwoju *Danio rerio* czy innych organizmów modelowych, a w szczególności badaniach rozwoju serca. Nie wiem też czy Fig. 2 zawiera zdjęcia wykonane przez Doktoranta. Nie mniej jednak, pomimo pewnych braków, *Wstęp* dobrze spełnia swoje zadanie, odwołuje się do aktualnych publikacji i świadczy o tym, że Doktorant w sposób dojrzały podchodzi do zadań badawczych. *Cele pracy* również zostały przedstawione w sposób klarowny.

Materiały i metody, jak już wspomniałam, zostały podzielone na dwie części. Ten zabieg sam w sobie nie byłby „szkodliwy” gdyby nie to, że wykorzystane techniki zostały opisane bardzo powierzchownie, a niektóre wcale nie zostały przedstawione. Są to zdecydowanie najsłabsze fragmenty pracy. W skrócie, w obu częściach brakuje m.in. informacji czy uzyskano odpowiednie zgody na pracę z GMM, opisu warunków hodowli *D. rerio*, opisu składu buforów i pożywek (np. E3), informacji na temat stosowanych odczynników, ich pochodzenia, metod stosowania (np. barwnika LIVE/DEAD), precyzyjnego opisu klonowania (niektóre informacje, np. o tym że wektor zawierał gen warunkujący oporność na ampicylinę umieszczone są w *Wynikach* – powinny trafić do sekcji Mat i met). Brakuje dobrych opisów FACS (zamieszczono jedynie odniesienie do literatury i bardzo lakoniczny opis pod Fig. 10), qPCR (np. nie przedstawiono wszystkich starterów, nie wiadomo czy ekspresję badanych genów odnoszono do poziomu transkryptu GAPDH? aktywny? innych?), technik mikroskopii (np. Fig. 9 – nie jest jasne co kryje się za stwierdzeniem „time series”), opisu wykorzystanego sprzętu (np. FACS, mikroskop konfokalny i inne). Informacja na temat wykorzystanego urządzenia mogłaby mi pomóc w zrozumieniu zastosowanej metody genotypowania, opisanej na str. 55. Doktorat napisał, że wykorzystał technikę PCR jednak w tabeli 2 przedstawia startery opisane jako qPCR, nie umieszcza jednak informacji o sondach. Oczywiście mogłabym przeczytać publikację Nieścierowicza i wsp. (2022), ale to nie ją poddaję ocenie. W zasadzie na podstawie przedstawionych w rozprawie informacji wykonane przez Doktoranta doświadczenia byłyby trudne do powtórzenia. Klarowny i szczegółowy opis użytych materiałów i zastosowanych metod dokumentuje także zrozumienie wykorzystanych technik badawczych, to też ma udowadniać rozprawa doktorska.

Nie mniej jednak, bazując na obu częściach *Materiałów i metod* oraz lekturze obu części *Wyników*, można stwierdzić, że Autor wykorzystał wiele podejść badawczych. Począwszy od hodowli *D. rerio*, uzyskiwaniu zmodyfikowanych genetycznie osobników, wykorzystaniu techniki wyciszenia ekspresji genów, analizy ekspresji genów, mikroskopii konfokalnej, FACS, oraz, co dla tej pracy było niezwykle istotne, analizy *in silico*. Uzyskane wyniki poddano odpowiednim testom statystycznym. Lektura *Wyników* świadczy o tym, że techniki te zostały przez Doktoranta opanowane i świetnie wykorzystane, co pozwoliło na udoskonalenie warsztatu badawczego i uzyskanie cennych danych.

Wyniki przedstawiono w dwóch zwięzłych częściach. *Pierwsza* dotyczy identyfikacji regionów regulatorowych genu *isl1a*. W wyniku analiz *in silico* zidentyfikowano 7 rejonów regulatorowych, które przetestowano stosując test opierający się na badaniu ich wpływu na ekspresję genu

markerowego - eGFP, w rozwijającym się zarodku ryby. Kontrolę w tym przypadku stanowiły zarodki, do których wstrzyknięto „pusty” wektor. Wpływ podawanych konstruktów na przeżywalność zarodków był podobny. Różnice ekspresji eGFP w zarodkach miały służyć jako dowód na to, że badana sekwencja wzmacniająca/enhancer była aktywna. Doktorant wykazał, że w przypadku zastosowania 4 z badanych regionów regulatorowych uzyskano znacząco większą liczbę żywych zarodków eGFP+. Ponadto, aktywność 4 sekwencji (określoną dzięki ekspresji eGFP) wykryto w rozwijającym się sercu. Jeden z badanych enhancerów (I3) wybijał się na tle innych – odsetek zarodków, w których wykryto „sercową” lokalizację eGFP był najwyższy. W pracy umieszczono dokumentację fotograficzną przedstawiającą tylko jeden zarodek z badanych grup. Szkoda, że nie przygotowano panelu ze zdjęciami większej liczby zarodków. Pozwoliłoby to określić jak różnorodna była reakcja.

Kolejny etap badań polegał na uzyskaniu stabilnej linii *D. rerio*, dzięki której można było określić, w których obszarach rozwijającego się serca jest aktywny I3. Sposób uzyskania tych zwierząt został opisany bardzo powierzchownie. Nie podano dlaczego wybrano i czym charakteryzują się zwierzęta Tg(myf7:mRFP). Co koduje myf7? Wszystkie tego rodzaju informacje powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej, inaczej może ona okazać się zbyt hermetyczna dla odbiorców innych niż specjaliści w danej dziedzinie. Nie znalazłam także informacji jakie zwierzęta stanowiły kontrolę w tych doświadczeniach. Następnie, wykorzystując FACS analizowano komórki eGFP+ izolowane z zarodków i określono w nich poziom ekspresji badanych czynników transkrypcyjnych i innych wybranych genów markerowych. Wykonaną pracę należy uznać za ogromną (podobną uwagę mam do analizy opisanej w II części doktoratu) - komórki uzyskano z około 500 zarodków. Zabrakło mi informacji dlaczego wybrano te nie inne markery? Co kodują wybrane geny? Jakie funkcje ich produkty pełnią podczas rozwoju zarodkowego? Podobna uwaga dotyczy genów wymienionych w rozdziale 2.2.7, jako te które kodują czynniki transkrypcyjne potencjalnie oddziałujące z sekwencją I3 (str. 43). Znaczenie tych genów/białek być może jest oczywiste dla Doktoranta, ale uzasadnienie ich wyboru/funkcji powinno znaleźć się w rozprawie doktorskiej. Fig. 11 przedstawia wykres, na którym umieszczono odchylenia standardowe obejmujące wartości poniżej osi X (*isl1*, *nkx2.3*). Należałoby wybrać inny sposób prezentacji wyników (może wykres punktowy?). Analizy *in silico* wykazały, że do czynników mogących oddziaływać z I3 można zaliczyć MEF2C.

Fragment będący **Dyskusją** wyników przedstawionych w tej części pracy jest ich podsumowaniem, krytyczną analizą i świadczy o wiedzy i dojrzałości naukowej Autora. Zestawia on rezultaty swoich badań z tymi uzyskanymi przez innych naukowców, wskazuje na ograniczenia i perspektywy dalszych badań. Nie mam do niego zastrzeżeń.

Podsumowując, badania opisane w **części I** przyniosły nowatorskie wyniki - udowodniły, że sekwencja I3 jest aktywna w komórkach wtórnego pola sercotwórczego oraz w komórkach tworzących komory rozwijającego się serca, w obszarze szerszym niż ten, w którym wykrywana była ekspresja *isl1a*. Ponadto, MEF2C został wskazany jako czynnik mogący oddziaływać na ekspresję *isl1a* poprzez I3. To Bardzo interesujący wynik, sprecyzowanie jego znaczenia wymaga jednak dalszych badań.

Część II **Wyników** opisuje uzyskiwanie zwierząt, w których komórkach wyciszona/obniżona została ekspresja genów *nkx2.5/nkx2.7*. Zastosowanie odpowiednich morfolino doprowadziło do zaburzeń w formowaniu serca - a więc do uzyskania poszukiwanego fenotypu. Czy sprawdzono jak bardzo obniżył się poziom produktów badanych genów? Z zarodków Tg(*nkx2.5:EGFP*) wyizolowano komórki ekspresujące eGFP. Komórki izolowano na różnych stadiach rozwoju - określonych raz w liczbie somitów a raz w godzinach po zapłodnieniu. Trudno więc porównać te stadia jeżeli nie hoduje się osobiście *D. rerio*. Fig. 15 jest nieczytelna - legendy osi X i Y nieodczytywalne, nie sposób ocenić uzyskany wynik na podstawie "dot plotów" i krótkiego opisu w tekście.

Niezwykle ciekawy etap doktoratu dotyczył analiz komórek izolowanych z zarodków kontrolnych i takich traktowanych morfolino (te ostatnie znikają jednak z pola widzenia czytelnika) mającej na celu ustalenie roli *nkx2.5/nkx2.7* w rozwoju serca. Doktorant wyizolował z ogromnej liczby zarodków od 5 to kilkudziesięciu tysięcy komórek (w zależności od stadium rozwojowego), co powinno mu pozwolić na uzyskanie odpowiedniej liczby komórek a co za tym idzie odczytów. Nie wszystkie etapy analiz zakończyły się pełnym sukcesem. Jednak uzyskany materiał jest cenny i stanowi bazę do dalszych analiz.

Kolejnym zadaniem była adaptacja systemu eGESTALT do śledzenia linii komórkowych w zarodku *D. rerio*. W tym w fragmencie doktoratu, podobnie jak i w poprzednich opisujących uzyskiwanie linii komórkowych, zabrakło ilustracji wykorzystywanych konstruktów i strategii modyfikacji genomu. Odpowiednie mapy a nawet schematy doświadczenia bardzo pomogłyby w lekturze **Wyników**. Zadanie zakończyło się sukcesem, o czym świadczy chociażby Fig. 22. Ponownie żałuję, że nie zostały umieszczone zdjęcia większej liczby zarodków. Uzyskanie zwierząt modyfikowanych genetycznie to duże osiągnięcie i, ponownie, solidna podstawa dla dalszych badań.

Dyskusja tej części pracy jest zwięzła. Odnosi się jednak fachowo do problematyki badań. Doktorant opisuje przypuszczalne przyczyny napotkanych problemów i przedstawia plany na badania, które można przeprowadzić po udoskonaleniu stosowanych technik. Przedstawia także jak można wykorzystać transgeniczne zwierzęta. Dyskusja jest wyważona i rzeczowa.

Podsumowując, **część II** pracy wymagała dużej sprawności technicznej i determinacji. Stworzono bazę dla dalszych badań.

W **Konkluzjach** Autor podsumował najważniejsze osiągnięcia swojej pracy. Identyfikację regionu wzmacniającego wpływającego na ekspresję *islla* w sercu, wskazanie na MYF2c, jako czynnika zaangażowanego w regulację z wykorzystaniem badanego regionu wzmacniającego, czy też uzyskanie doskonałych narzędzi do dalszych badań nad regulacją rozwoju serca.

Rozprawa doktorska napisana jest zrozumiałym językiem angielskim. Moja znajomość tego języka nie jest na tyle dobra żebym mogła wskazać na błędy stylistyczne czy gramatyczne. Mogę za to zwrócić uwagę na użycie wyrazu lineaż w polskim streszczeniu, który to wyraz określa raczej wszystkich przodków w linii prostej niż linię komórkową. Ilustracje są dobre, chociaż dwie z nich nie są wystarczająco czytelne (Fig. 15 i 19)

Uważam, że uzyskane wyniki są nowatorskie, opracowane techniki kluczowe dla dalszych badań nad rozwojem serca. Największe osiągnięcia swojej pracy Doktorant wymienił w **Konkluzjach** i przychyliam się do jego opinii. Moje uwagi krytyczne odnoszą się do lakoniczności czy chaotyczności w opisie **Materialów i metod** oraz zbyt skrótowych opisów niektórych partii **Wyników**. Uzyskane dane można było lepiej zaprezentować, ale to oczywiście nie umniejsza ich wartości i osiągnięć Doktoranta. Pomimo moich uwag krytycznych pracę oceniam jako wartościową.

Podsumowując, pan mgr Eugeniusz Tralle zrealizował postawione sobie cele. Przeprowadzone przez niego badania doprowadziły do uzyskania nowych i bardzo interesujących wyników. Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania 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 Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.