

Jastrzębiec dn.25.02.2022

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

**Recenzja osiągnięcia naukowego na podstawie cyklu prac  
„Analizy molekularne i genetyczne układu komórek  
mózgu u danio przegowanego”  
oraz aktywności naukowej, dydaktycznej i popularyzatorskiej w postępowaniu o  
nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.  
dr Vladimira Korzha**

**I. Przebieg kariery zawodowej**

Habilitant ukończył studia na Uniwersytecie Kijowskim w 1976 r. uzyskując dyplom licencjata w zakresie biologii. W latach 1976-1981 był uczestnikiem studiów doktorskich Instytutu Biologii Rozwoju im. N.K. Koltsowa, uzyskał tytuł naukowy doktora biologii broniąc pracy pod tytułem: „ Mikroiniekcja makrocząsteczek i mitochondriów do jaj piskorza (*Misgurnus fossilis* L.)”. W Instytucie tym prowadził też badania do roku 1990. W latach 1990-1992 przebywał na stypendium podoktorskim w laboratorium prof. Andersa Fjose, Instytutu Biologii Medycznej na Uniwersytecie Tromsø, w Norwegii; a następnie w latach 1992-1995 w laboratorium mikrobiologii prof. Thomasa Edlunda, na Wydziale Mikrobiologii, Uniwersytetu Umeå, w Szwecji. W dalszej karierze naukowej przez wiele lat przebywał w Singapurze, był członkiem założycielem Instytutu Agrobiologii Molekularnej gdzie pracował w latach 1995-2002. W latach 1999-2016 był też adiunktem na Wydziale Nauk Biologicznych w Narodowym Uniwersytecie Singapuru, równocześnie też od 2002 do 2016 r. pracował w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Singapurze, w którym od 2013 do 2016 r. pełnił rolę kierownika Zakładu Biologii Stosowanej Danio przegowanego (Zebrafish Translational Unit). Natomiast od października 2016 r. do chwili obecnej miejscem pracy naukowej dr Vladimira Korzha jest Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, gdzie zajmuje stanowisko profesora wizytującego.

## **II. Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wnioskowania o stopień doktora habilitowanego, prezentowanego w cyklu publikacji pt. Analizy molekularne i genetyczne układu komórek mózgu u danio pręgowanego.**

Przygotowany przez Habilitanta cykl publikacji przedstawiony jako osiągnięcie naukowe składa się z 6 oryginalnych prac twórczych, opublikowanych w latach 2004 -2017, oraz 3 artykułów przeglądowych z lat 2014 -2020. Tematyka prezentowana w publikacjach jest też syntetycznie i klarownie omówiona w przygotowanym autoreferacie. We wstępie zaprezentowana jest aktualna wiedza dotycząca rozwoju układu komórek mózgowych w tym uzyskana w dużej mierze z wykorzystaniem Danio pręgowanego, jako modelu zwierzęcego. **Habilitant** przedstawia też kolejne etapy badań, opisuje bardziej szczegółowo cele i zagadnienia ujęte w poszczególnych publikacjach w następujących 6 punktach:

### **1. Opracowanie metody wysokowydajnej transgenezy.**

W pierwszej publikacji z roku 2004 prezentowane są wyniki badań, których celem było opracowanie efektywnej metody transgenezy, która jest ważnym elementem pozwalającym na odpowiednie manipulacje i modyfikacje w obrębie genomu w modelowych badaniach z wykorzystaniem danio pręgowanego. Szczególnej weryfikacji poddany został system wektorowy Tol2, oceniony jako wysoce skuteczny system wykorzystany we wprowadzaniu obcego DNA do genomu komórek gospodarza, oraz system AC/DS., który jest jednym z pierwszych systemów transpozonowych rozpoznanych w komórkach kukurydzy. Habilitant wraz z zespołem udowodnił skuteczność systemu Tol2, uzyskując aż 28 transgenicznych linii danio pręgowanego. Udało się też zidentyfikować 65 interakcji transpozonu z genomem, co stanowi wymierny dowód skuteczności zastosowanych metod. Należy podkreślić, że były to pierwsze tego typu badania opisane w literaturze, przedstawiające skuteczne zastosowanie metody transgenezy opartej o konstrukt „enhancer-trap”. Opracowana metoda przyczyniła się do intensywnego rozwoju badań z wykorzystaniem danio pręgowanego jako organizmu modelowego, o czym najlepiej świadczą cytowania pracy w liczbie 252.

## **2. Stworzenie dużej liczby transgenicznych linii danio pręgowanego metodą „enhancer-trap”**

W drugiej publikacji z 2009 r. Habilitant kontynuując swoje badania wykorzystał transgeniczne linie uzyskane w poprzednich badaniach w tym ET33, z insercją transpozonu do intronu genu *zic6*, z ekspresją genu reporterowego EGFP. Istotą podjętych badań było określenie zdolności remobilizacji transgenicznych wstawek Tol2 po wstrzyknięciu enzymu transpozazy do transgenicznych zarodków. Przeprowadzone analizy pozwoliły nie tylko lepiej zrozumieć procesy integracji Tol2 do genomu oraz jego aktywacji w obecności transpozazy, ale także zaowocowały uzyskaniem dużej liczby nowych transgenicznych linii danio pręgowanego. Linie te, ze wstawkami zlokalizowanymi w różnych genach zostały zdeponowane w European Zebrafish Stock Center w KIT w Karlsruhe w Niemczech, tym samym stając się dostępnym dla innych zespołów, cennym materiałem badawczym. Wiele z tak uzyskanych transgenicznych linii zostało wykorzystanych w dalszych pracach badawczych Habilitanta, ale też, co zasługuje na uwagę i świadczy o ich wartości, jako modelu badawczego, zostało wysłanych do kilkudziesięciu laboratoriów na całym świecie. Szczególne zainteresowanie w badaniach innych zespołów, co też należy odnotować znalazły dwie linie ET4 i ET20 z ekspresją EGFP w komórkach mechanosensorycznych i ich progenitorach, potwierdzone przez ponad 40 publikacji innych autorów.

## **3. Rozwój narządów okołokomorowych: *in-vivo* analiza morfogenezy splotu naczyniówkowego**

W kolejnej pracy z 2008 r. omówione zostały zagadnienia związane z rozwojem narządów okołokomorowych. Należy podkreślić, że Habilitant prowadził pionierskie badania *in-vivo* dotyczące powstawania splotu naczyniówkowego (SN). Istotna wartość poznawcza tych badań wynika z faktu, że splot naczyniówkowy jest głównym źródłem większości płynu mózgowordzeniowego, przez co odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie i zachowanie homeostazy chroniącej rozwijający się mózg, w szczególności właściwej, zharmonizowanej migracji neuronów podczas rozwoju jego struktur. Należy podkreślić, że dzięki pracom badawczym z wykorzystaniem transgenicznych linii danio pręgowanego stało się możliwe dokładniejsze poznanie procesu powstawania splotu naczyniówkowego IV komory. Prace te, co ważne były pionierskim osiągnięciem umożliwiającym szczegółowe obrazowanie rozwoju tych struktur pokonując dotychczasowe ograniczenia techniczne. Habilitant przeprowadził szeroką weryfikację wpływu wybranych mutacji w oparciu o zastosowanie bogatego wachlarza metodologicznego w obrazowaniu *in-vivo*, w badaniach z zastosowaniem immunohistochemii

oraz analizach histologicznych. Dzięki tym badaniom precyzyjniej scharakteryzował rolę szlaków sygnałowych Notch i Hedgehog aktywowanych podczas różnych faz rozwojowych splotu naczyniówkowego. Zagadnienia te wciąż są obiektem badań Habilitanta i są rozwijane, na co wskazują przytoczone inne jego publikacje niewchodzące w skład przedstawionych do oceny osiągnięć naukowych.

#### 4. Morfogeneza cewy nerwowej: przypadek roof plate

W czwartej pracy z 2013r. Habilitant zaprezentował badania dotyczące procesu neurulacji - morfogenezy cewy nerwowej, bazując na utworzonych transgenicznym liniach danio przęgowanego. Przedstawione badania scharakteryzowały zasadnicze różnice, jakie występują w tym procesie u różnych gatunków kręgowców, a analiza przeprowadzona z obrazowaniem in-vivo pozwoliła po raz pierwszy scharakteryzować proces konwersji komórek roof plate, identyfikując istotną rolę genu *Zic6* i kinazy związanej z Rho (Rock). Uzyskane wyniki stanowią istotny element poznawczy w badaniach podstawowych wczesnego etapu rozwoju układu nerwowego z udziałem transformujących czynników wzrostu, jakimi są uwalnianie przez różnicujące się komórki białka BMPs.

#### 5. Identyfikacja nowych regulatorów rozwojowych układu komorowego mózgu.

W następnej pracy z 2015 r., która była kontynuacją badań w zakresie charakterystyki czynników regulujących rozwój układu komór mózgu, Habilitant zidentyfikował i opisał istotną rolę kanałów potasowych w komórkach neuroepitelialnych w morfogenezie układu komór mózgu (UKM). Przeprowadzając badania z wykorzystaniem mutageny opartej na metodzie CRISPR-Cas9 wykazał istotne znaczenie genu *KCNB1* (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily B Member 1). Mutacje inaktywujące w tym genie były przyczyną mikrocefalii, podobny skutek przynosiły też mutacje powodujące wzmocnienie aktywności *KCNG4B*. Natomiast wzmocnienie *KCNB1* powodowało wodogłowie, znosząc oddziaływanie wzmocnienia *KCNG4B* (potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4b) . Przeprowadzone badania dostarczyły dowodów na znaczącą rolę kanału potasowego Kv2 w morfogenezie UKM. Uzyskane wyniki dostarczają cennych informacji dotyczących regulacji rozwoju UKM jak i wskazówek dla wyjaśnienia występowania pewnych zaburzeń rozwojowych w tym mikrocefalii.

## **6. Narządy okołokomorowe mózgu jako regulatory rozwoju mózgu i użyteczne markery morfologiczne układu komór mózgu**

Tematyka badań podjętych w ostatniej z prezentowanego cyklu prac z 2017 r. dotyczy narządów okołokomorowych. Habilitant szczegółowo przedstawia neuroanatomiczną lokalizację wszystkich narządów okołokomorowych, wykorzystując wcześniej wytworzone transgeniczne linie danio pręgowanego ET33-E20. Przeprowadzone badania wykazały, że NOK rozwijają się nie tylko z wyściółki UKM (ependymy) jak to wcześniej było sugerowane, ale także przy udziale struktur linii środkowej - *roof plate* i *floor plate*. Habilitant dokładniej definiuje znaczenie narządu podspoidłowego wykazując, że zmniejszenie ekspresji genu *Camel* (*CHL1B*) skutkuje niedoborem włókien Reissnera oraz powoduje wodogłowie i skoliozę.

Wszystkie prace przedstawione, jako osiągnięcie habilitacyjne zostały opublikowane w znaczących, renomowanych czasopismach z dziedziny neurobiologii. Uzyskane wyniki dostarczyły cennych, nowych odkryć dotyczących znaczenia i udziału narządów okołokomorowych w rozwoju mózgu. Ponadto, co zasługuje na szczególne podkreślenie dokumentują istotny wkład habilitanta w opracowanie nowych transgenicznych linii danio pręgowanego, który stał się popularnym modelem w badaniach in-vivo opisujących procesy rozwoju układu nerwowego, jak i charakterystyce pojawiających się wad rozwojowych takich jak m.in. skolioza, wodogłowie czy procesy neurodegeneracyjne. Na szczególne uznanie zasługuje też skrupulatne metodyczne opracowanie dotyczące zastosowanej mutagenyzy w uzyskiwaniu licznych transgenicznych linii. To opracowanie i zdeponowanie uzyskanych transgenicznych linii w Europejskim Centrum Zasobów Danio pręgowanego, oferuje bogaty materiał do manipulacji genetycznych, molekularnych i komórkowych. Stanowi on obecnie podstawowy, systemowy model u kręgowców, jedyne w swoim rodzaju narzędzie umożliwiające badania przesiewowe zmian fenotypowych w odpowiedzi na zmiany genetyczne in-vivo. Biorąc pod uwagę fakt, że ponad 70% genów genomu danio pręgowanego znajduje odzwierciedlenie w genomie ludzkim, mutanty danio pręgowanego z powodzeniem służą, jako podstawowe modele wielu ludzkich schorzeń, genetycznie determinowanych wad rozwojowych. Ten model zwierzęcy odnotowuje też wyraźny wzrost znaczenia w badaniach przesiewowych i toksykologicznych leków.

W świetle przedstawionych w publikacjach informacji, udział autorski Habilitanta był kluczowy, zarówno od strony opracowania koncepcji badań jak i ich realizacji oraz końcowej interpretacji wyników, a w szczególności opracowania nowatorskich metod badawczych. Zostało to udokumentowane zarówno pionierskimi badaniami jak i znaczącymi odkryciami dotyczącymi procesów związanych z wczesnym rozwojem centralnego układu nerwowego w

tym znaczenia oraz charakterystyki narządów okołokomorowych. Należy podkreślić, że Habilitant wraz z zespołem, jako pierwszy zidentyfikował i scharakteryzował rozwój splotu naczyniówkowego w modelu in-vivo. Wykazał się też widoczną konsekwencją w podejmowaniu żmudnych, wymagających obszernej wiedzy badań, dzięki czemu wskazał kluczowe elementy regulujące rozwój struktur okołokomorowych w tym, w szczególności rolę kluczowych genów. Znaczenie poznawcze zaprezentowanych prac bez wątpienia zasługuje na uznanie, co jest też w miarodajny sposób potwierdzone licznymi cytowaniami jego prac. Szerokim zainteresowaniem środowiska naukowego cieszą się nie tylko opracowania naukowe – publikacje, ale też liczne wyprowadzone przez dr Korzha, transgeniczne linie danio przęgowanego, które są wykorzystywane, jako materiał badawczy w kilkudziesięciu laboratoriach na całym świecie.

### **III. Ocena innych osiągnięć naukowo badawczych**

Eksperska pozycja habilitanta jest również udokumentowana w postaci bardzo interesujących opracowań przeglądowych z zakresu rozwoju struktur mózgowych u kręgowców, syntetycznie opisujących obecną wiedzę w ujęciu ewolucyjnym. Autor precyzyjnie charakteryzuje i definiuje mechanizmy rozwojowe oraz ich potencjalne zaburzenia, wskazując przy tym na możliwe przyczyny wyjaśniające występowanie wrodzonych wad neurologicznych u ludzi.

### **IV. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych organizacyjnych oraz popularyzatorskich.**

Dr Vladimir Korzh odbył liczne kilkuletnie staże naukowe w zagranicznych jednostkach naukowych, w tym dwa dwuletnie pobyty naukowe, jako stypendysta podoktorski na Uniwersytecie Tromsø, w Norwegii i Uniwersytecie Umeå, w Szwecji. Istotny rozwój kariery naukowej związany był z jednostkami naukowymi w Singapurze, gdzie był członkiem założycielem Instytutu Agrobiologii Molekularnej oraz pracownikiem naukowym w Narodowym Uniwersytecie w Singapurze. Tam też od 2013 do 2016 roku pełnił funkcję kierownika Zakładu Biologii Stosowanej - danio przęgowanego. Był też, od 2001 do 2014 r. wykładowcą prowadzącym zajęcia z zakresu biologii rozwoju na Wydziale Nauk Biologicznych Narodowego Uniwersytetu w Singapurze, oraz organizatorem i wykładowcą Podyplomowego Studium biologii rozwoju zwierząt (w latach 1997-2002) Instytutu Agrobiologii Molekularnej.

W kwestii osiągnięć dydaktycznych Habilitant również legitymuje się imponującym dorobkiem. Sprawował opiekę nad 25 licencjatami (w tym 19 z Uniwersytetu Technologicznego Nanyang; 4 Narodowego Uniwersytetu w Singapurze; 2 Uniwersytetu Fudan, Szanghaj Chiny), 4 magistrantami (Narodowego Uniwersytetu w Singapurze) oraz 19 doktorantami, jako

promotor i 2 jako promotor pomocniczy. Ponadto sprawował opiekę nad 30 stażystami, oraz 22 stypendystami podoktorskimi.

Aktywnie uczestniczył też w popularyzowaniu nauki, w tym jako Członek Komitetu Organizacyjnego singapurskich Targów nauki "X-periment" w centrum handlowym i Koordynator prezentacji IMCB w latach : 2007-2008; 2013-2014.

Na uwagę zasługuje duża aktywność naukowa objawiająca się szeroką współpracą z innymi renomowanymi ośrodkami w Polsce i na świecie w tym w Indiach i Singapurze, dotyczącymi badań m.in. kanału przedsionkowo-komorowego oraz pierścienia zatokowo-predsionkowego serca danio pręgowanego. Bada też zmienność behawioralną związaną ze zmianą pobudliwości neuronalnej u danio pręgowanego oraz zagadnienia niedoboru sygnalizacji Hedgehog u danio pręgowanego i związane z tym zaburzenia rozwoju trzustki. Przedstawiony wycinek aktywności naukowej Habilitanta bez wątpienia dowodzi nie tylko dużej wiedzy i uznania w środowisku naukowym, ale też wskazuje na wyjątkową pasję naukową, bez której trudno byłoby osiągnąć takie rezultaty.

#### **V podsumowanie oceny działalności naukowej**

Dorobek naukowy Habilitanta wynosi 186 prac naukowych index Hirsha wg bazy scopus - 48, ponad 9 tys. cytowań w tym 8,5 tys. bez autocytowań, wskaźniki te dobitnie wskazują na wybitny dorobek naukowy Habilitanta. Dr Vladimir Korzh aktywnie też uczestniczy w opracowywaniu i realizacji badań w ramach projektów naukowych. W tym, jako kierownik projektu OPUS NCN pt.: „Analiza eksperymentalna determinant molekularnych związanych z padaczką”(budżet ~1.8 mln) , oraz jako koordynator w części badań realizowanych w ramach projektu pt.: **Tworzenie genomowego atlasu wad rozwojowych ucha wewnętrznego człowieka”** w konsorcjum z **Instytutem Fizjologii i Patologii Słuchu (budżet całego projektu ~3.0 mln) 2.9 zł**

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy dotyczące dorobku naukowego, niekwestionowane wartości merytoryczne prezentowanych osiągnięć, jak i dydaktyczne, popularyzatorskie oraz organizacyjne, stwierdzam, że dr Vladimir Korzh, spełnia kryteria wynikające z ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. z 2020 r. poz 85 z póź. Zm.). Zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego PAN z wnioskiem o nadanie dr Vladimirowi Korzh stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie z pełnym przekonaniem zgłaszam wniosek o przyznanie wyróżnienia za przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe.

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała