



UNIWERSYTET WARSZAWSKI WYDZIAŁ BIOLOGII



prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko
Prodziekan ds. organizacji badań
Kierownik Zakładu Cytologii Instytutu Zoologii

Warszawa, 28 maja 2014

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Zmiany architektury jądrowej i transkryptomu w procesie różnicowania ludzkich
komórek macierzystych pochodzenia miogennego”
autorstwa Pana mgr. Tomasza Jana Kolanowskiego.

Praca doktorska autorstwa Pana mgr. Tomasza Kolanowskiego została wykonana pod kierunkiem prof. Macieja Kurpisza. Podjęte badania są nowatorskie a uzyskane wyniki w sposób znaczący przyczyniły się do zrozumienia zależności między lokalizacją jądrową a aktywnością genów związanych z różnicowaniem mioblastów mięśni szkieletowych.

Mięśnie szkieletowe uszkodzane są nie tylko w wyniku poważnych urazów mechanicznych czy chorób, takich jak na przykład dystrofie mięśniowe, ale także w trakcie uprawiania sportu czy codziennego wysiłku fizycznego. Naprawa zarówno drobnych urazów jak i poważnych uszkodzeń zależy od funkcjonowania komórek macierzystych mięśni szkieletowych, tzw. komórek satelitowych. Uszkodzenie mięśnia powoduje, że komórki te ulegają aktywacji, przekształcają się w mioblasty, które intensywnie proliferują, różnicują, fuzują tworząc wielojądrowe miotuby i w efekcie odtwarzają zniszczone włókna mięśniowe. W przypadku chorób, takich jak wspomniane już dystrofie, uszkodzenia mięśni i następujące po nich okresy regeneracji są tak częste, że pula komórek satelitowych nie jest wydajnie odnawiana i ulega wyczerpaniu. Dlatego też od wielu lat poszukiwane są źródła komórek, którymi można byłoby wspomóc regenerację. Oczywiście kandydatem są te naturalnie znajdujące się w mięśniu - czyli właśnie komórki satelitowe oraz powstające z nich mioblasty. Komórki te analizowane są także w badaniach, których celem jest terapia uszkodzonego w wyniku zawału mięśnia sercowego. Zespół prof. Kurpisza od wielu lat testuje właśnie zastosowanie mioblastów mięśni szkieletowych. Niestety dotychczas nie udało się opracować skutecznej terapii mięśni poprzecznie prążkowanych wykorzystującej mioblasty mięśni szkieletowych. Przyczyn jest wiele a ich opis stanowiłby materiał na obszerną publikację. Oczywiście jest, że wśród warunków koniecznych dla opracowania skutecznej terapii z wykorzystaniem mioblastów jest dogłębne zrozumienie mechanizmów różnicowania komórek satelitowych. Badania podjęte przez mgr. Kolanowskiego doskonale wpisują się w nurt prac mających na celu charakterystykę różnicowania tych komórek.

Szczegółowe cele wymienione w pracy obejmowały:

- porównanie, techniką mikromacierzy ekspresyjnych, ekspresji genów w proliferujących mioblastach oraz powstałych z nich miotubach;
- ocenę zmian morfologii jąder komórkowych w różnicujących mioblastach;

- ocenę ruchu obszarów centromerowych wybranych chromosomów podczas różnicowania;
- obserwację zmian lokalizacji obszarów chromatyny zawierających geny zaangażowane w regulację miogenezy;
- korelację zmian poziomu ekspresji genów podczas różnicowania mioblastów ze zmianami położenia określonych fragmentów chromatyny.

Postawione cele mgr Kolanowski zrealizował przeprowadzając szereg świetnie zaplanowanych i wymagających dużej sprawności technicznej analiz. Realizując je Doktorant wykorzystał technik biologii molekularnej, biologii komórki, cytogenetyki, takie jak: hodowle myoblastów, hodowle bakterii, barwienia cytochemiczne, immunodetekcja antygenów, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, cytometria przepływowa, techniki mikroskopii, techniki pozyskiwania i analiz RNA. Wszystkie uzyskane dane poddane zostały niezbędnym analizom bioinformatycznym i statystycznym. Wykorzystując te metody mgr Kolanowski zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele a wyniki jego badań zostały już włączone do publikacji, która ukazała się w 2013 roku w czasopiśmie *PLOS One*. Warto także nadmienić, że oprócz tej pracy Doktorant współtworzył 6 innych prac, z których większość ukazała się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jest to niewątpliwie powód do satysfakcji i świadectwo, że mgr Kolanowski był zaangażowany w realizację wartościowych badań.

Rozprawa doktorska pana mgr Kolanowskiego poprzedzona jest bardzo dobrym *Wstępem*, wyczerpująco i precyzyjnie wprowadzającym w zagadnienia, którym poświęcona jest praca. Doktorant z dużą precyzją zaprezentował tło swoich badań. Pierwsza część *Wstępu* poświęcona jest charakterystyce jądra komórkowego oraz jego organizacji przestrzennej. Następnie opisane zostały komórki satelitarne i przebieg ich różnicowania w mioblasty oraz miotuby. Scharakteryzowane zostały geny, którym szczególną uwagę poświęcono w rozprawie. Były to geny kodujące zarówno czynniki regulujące transkrypcję jak i charakterystyczne dla mięśni szkieletowych białka strukturalne. Doskonale ilustracje uzupełniają opisy zagadnień. Dzięki *Wstępowi*, ale także i *Dyskusji*, czytelnik może ocenić jak na tle dokonań innych grup badawczych „umiejscawiają się” badania prowadzone przez pana mgr. Kolanowskiego.

Obowiązkiem recenzenta jest nie tylko omawianie zalet pracy, ale także zwracanie uwagi na jej niedoskonałości. Jednak chciałabym zauważyć, że w prezentowanej pracy nie znalazłam ich zbyt wielu. Zarówno wstęp jak i pozostałe jej części przygotowane zostały w bardzo staranny sposób. Jasno opisują prezentowane zagadnienia i wyniki, nie budzą znaczących wątpliwości. Mgr Kolanowski nie dał mi więc, jako krytykowi, zbyt dużego pola do popisu. Jedynym „zgrzytem” we *Wstępie* było odwołanie się do pracy z 1895 roku i pozostawienie zdania dotyczącego fuzji *przedjadrzy komórek germinalnych* bez najmniejszego chociaż komentarza. Muszę więc zareagować i napisać, że po pierwsze mianem przedjadrzy określa się jądra jednokomórkowych zarodków (zygot) a nie komórek rozrodczych (unikalabym określenia germinalnych) - plemników i oocytów. Po drugie, zakładając że *Wstęp* do doktoratu dotyczy ssaków i ich komórek zwracam uwagę, że w jednokomórkowych zarodkach ssaków (myszy, szczurów, ludzi) przedjadrza nie fuzują. Fuzja przedjadrzy zachodzi np. w jednokomórkowych zarodkach jeźowca. W dalszej części *Wstępu* zabrakło informacji na temat kohezyny, o której Autor wspomina (str. 33).

Informacje zawarte w części pracy poświęconej *Materiałom i Metodam* zaprezentowane zostały w bardzo jasny sposób. Podano zarówno składy wszystkich buforów, źródła odczynników, jak i bardzo szczegółowy opis procedur. Taki sposób prezentowania wykorzystanych narzędzi i technik w moim odczuciu jest wzorcowy.

Wyniki zawierają niezwykle uporządkowany i jasny opis przeprowadzonych badań. Chciałabym w sposób szczególny to podkreślić. Nie jest bowiem regułą, że recenzując prace napisane przez młodych naukowców bez najmniejszego problemu rozumiem każde przeczytane zdanie. W przypadku pracy mgr. Kolanowskiego opis badań "czyta się" z łatwością. Autor posiadał dar prostego tłumaczenia skomplikowanych procedur i uzyskanych wyników. Prezentacji danych towarzyszy opis odpowiednio zaplanowanych analiz kontrolnych. Na wstępie przedstawione zostały doświadczenia, mające na celu charakterystykę materiału, który w dalszych etapach pracy poddany został precyzyjnym analizom transkryptomycznym i cytogenetycznym. Autor udowodnił, że hodowane przez niego mioblasty różnicują w sposób prawidłowy, syntetyzują markery charakterystyczne dla komórek miogenicznych, a także co bardzo istotne, że warunki hodowli nie mają negatywnego wpływu na ich przeżywalność i różnicowanie. W kolejnych częściach *Wyników* opisano analizy mikromacierzy ekspresyjnych, dzięki którym określono profil ekspresji genów w mioblastach proliferujących oraz w uzyskanych z nich miotubach. Skorelowano zmiany w poziomie ekspresji genów związane z ich położeniem w danym chromosomie. Autor uzyskał niezwykle interesujące wyniki wskazujące na to jak w genomie zlokalizowane są geny, których ekspresja zmienia się podczas różnicowania. Do dalszych analiz wybrane zostały niektóre z nich (te związane z miogenezą) i to ich lokalizacja w jądrach komórkowych była precyzyjnie śledzona (lista genów przedstawiona została na str. 107). Analizowane było też bezpośrednie otoczenie sekwencji kodujących wybrane geny. Doktorant określił ekspresję klastrów genów w proliferujących mioblastach i miotubach. Graficzne przedstawienie wyników robi duże wrażenie, ale niestety nie towarzyszy mu wystarczająco precyzyjny opis ułatwiający analizę wykresów. Nie mniej jednak uzyskane rezultaty są logiczne i zgodne z dostępnymi danymi dotyczącymi zmian ekspresji MRF jak i białek strukturalnych, co potwierdza, że Doktorant trafnie wybrał model doświadczalny.

Kluczowym etapem badań było określenie lokalizacji jądrowej wybranych genów w proliferujących mioblastach i miotubach. Zadanie było bardzo wymagające technicznie i wymagało od Doktoranta otrzymania szeregu sond oraz optymalizacji techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Wszystkie otrzymane na tym etapie realizacji projektu "narzędzia" molekularne zostały przetestowane a ich specyficzność potwierdzona. Wykorzystując uzyskane sondy Autor przeprowadził lokalizację wybranych genów w obrębie jądra komórkowego. Zastosowanie odpowiednich algorytmów pozwoliło na dosyć precyzyjne pozycjonowanie chromosomów, zarówno w komórkach proliferujących jak i zróżnicowanych. W efekcie analizując położenie centromerów badanych chromosomów udało się prześledzić zmiany zachodzące w trakcie różnicowania. Analiza położenia wybranych genów wykazała zmiany w połowie badanych przypadków (NCAM1, miogenina, aktynina, desmina, czy DPP4). Dalsze testy wykazały, że dla NCAM1, desminy, DPP4, VCAM1 zmiana położenia korelowała z różnicowaniem - loci przesunięte były w kierunku peryferium jądra. Te i inne analizy potwierdziły fakt, że położenie chromosomów zmienia się wraz ze zmianą ekspresji genów, które są na nich zlokalizowane. Spadek ekspresji genów koreluje z przesunięciem chromosomy w kierunku peryferium jądra. Wykazano także, że nieaktywne transkrypcyjnie loci kodujące geny związane z różnicowaniem miogenicznym zlokalizowane są bliżej otoczki jądrowej.

Zarówno *Materiały i Metody*, jak i *Wyniki* ilustrowane są bardzo dobrej jakości schematami, wykresami, tabelami, oraz zdjęciami. W opisach niektórych z nich są minimalne braki (np. w legendzie ryciny IV-12, str. 116, brakuje odniesień do A, B i C, niezbyt widoczne są też linie siatki nakładanej na zarys jądra). Czasem trudno jest na wydruku zauważyć wskazywane w opisie struktury (np. rycina IV-20, C).

W bardzo dobrze przygotowanej *Dyskusji* wyniki własne zostały przedstawione na tle badań zarówno „macierzystego” zespołu jak innych grup zajmujących się podobną problematyką badawczą. Podobnie jak pozostałe części także ten fragment został sprawnie

napisany. Wszystkie główne wątki zostały fachowo przedyskutowane w oparciu o bardzo wiele prac oryginalnych (w całej pracy Autor zacytował ich 235). Mankamentem tego rozdziału jest wielokrotne bardzo szczegółowe powtarzanie wyników, łącznie z wprowadzaniem dodatkowych rycin i tabel je ilustrujących.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Znalazłam w niej jedynie nieliczne mankamenty edytorskie, stylistyczne czy związane z używaną nomenklaturą. W żadnym stopniu nie wpływają na moją wysoką ocenę. Nie mogę jednak pominąć niektórych z nich. W pracy pojawiają się określenia żargonowe: mioblasty szkieletowe (powinno być mioblasty mięśni szkieletowych) czy "Pax3 i Pax7 dodatnie". Ponadto, w języku polskim nazwy rodzajowe piszemy z małych liter (groch właściwy zamiast Groch właściwy, czy bydło domowe zamiast Bydło domowe). Proponowałabym także zastępowanie określeń obcych takich jak komórki germinalne czy komórki embrionalne polskimi - komórki rozrodcze/płciowe, komórki zarodkowe.

Podsumowując, pan mgr Kolanowski zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na zależność między ekspresją genów miogenicznych a ich położeniem w jądrach różnicujących mioblastów. Wnioski końcowe znajdują pełne poparcie w wynikach przedstawionych analiz i są bardzo dobrze umotywowane. Z całą pewnością można uznać przeprowadzone badania za nowatorskie. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Tomasza Kolanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę jakość przeprowadzonych badań i przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej zgłaszam wniosek o nagrodzenie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
ZAKŁADU CYTOLOGII INSTYTUTU ZOOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego
M. A. Ciemerych-Litwinienko
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko