

Prof. dr hab. Bogdan Kałużewski
SPZOZ Centralny Szpital Kliniczny
Instytut Stomatologii Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi 92-213 Łódź,
ul. Pomorska 251

Łódź, 09 czerwca 2014

Sygnatura: L.

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ:

„ZMIANY ARCHITEKTURY JĄDROWEJ I TRANSKRYPTOMU W PROCESIE
RÓŻNICOWANIA LUDZKICH KOMÓREK MACIERZYSTYCH POCHODZENIA
BIOGENNEGO”

MGR. TOMASZA JANA KOLANOWSKIEGO

ZAKŁAD BIOLOGII ROZRODU I KOMÓREK MACIERZYSTYCH
INSTYTUTU GENETYKI CZŁOWIEKA POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Odpowiadając na prośbę Pana Prof. dr. hab. n. med. Ryszarda Słomskiego, Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Instytutu Genetyki Człowieka PAN z dnia 05.05.2014, zapoznałem się z manuskryptem rozprawy doktorskiej autorstwa Tomasza Jana Kolanowskiego: „Zmiany architektury jądrowej i transkryptomu w procesie różnicowania ludzkich komórek macierzystych pochodzenia miogenne”. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Maciej Kurpisz, promotorem pomocniczym dr Natalia Rozwadowska. Rozprawa licząca 172 strony posiada typowy układ dla tego typu dysertacji naukowych. W tekście wykorzystano cytaty pochodzące z 235 publikacji naukowych, które w znakomitej większości opublikowano po roku 2000. W pracy zamieszczono 40 rycin oraz 35 tabel. Manuskrypt zaopatrzone również w Wykaz Skrótów. Ze Wstępu rozprawy, który zajmuje 52 strony w sposób zwięzły, ale wyczerpujący pozyskujemy wiedzę o szeregu aspektów budowy i organizacji jądra komórkowego. W tym fragmencie pracy znajdujemy ważne stwierdzenie wyartykułowane na podstawie danych literaturowych, cyt. str. 25: *”Co więcej, odkrycia te wymusiły również zmianę definicji podstawowych jednostek funkcjonalnych systemu dziedziczenia i ekspresji informacji genetycznej. Otóż, aktualnie transkrypt definiowany jest,*



w bardzo ogólnym ujęciu, jako pojedynczy element transkryptomu, natomiast pojęcie genu zostało zrewidowane i przeniesione na wyższy poziom organizacji informacji genetycznej, umożliwiając zawarcie w tej jednostce całej złożoności funkcjonalnie powiązanej grupy transkryptomów”. Jest to ważne stwierdzenie, dokumentujące dojrzałą świadomość autora, wkraczaniu nauk biologicznych w nowy etap rozumienia regulacji ekspresji. W dalszej lekturze Wstępu szczególnie interesującym jest uwzględnienie wybranych aspektów epigenetycznej regulacji ekspresji. Pozwolę sobie zacytować kolejny fragment rozprawy: str. 27: „Mimo, iż według klasycznego ujęcia mechanizmy regulatorowe są w większości kodowane przez genom, istnieje coraz więcej dowodów na ważną rolę jaką spełniają czynniki epigenetyczne” i dalej na tej samej stronie cyt: „W tym aspekcie, epigenetyczna regulacja ekspresji to pojęcie obejmujące czynniki wpływające na aktywność genów, nie wynikające z sekwencji kodowanej przez nią informacji”. Umieszczenie w rozprawie obu sformułowań świadczy, o dojrzałej dociekliwości autora w ocenie meritum nadchodzących zmian i konsekwencji tego podejścia dla zrozumienia złożoności regulacji ekspresji również w aspekcie roli czynników epigenetycznych w etiopatogenezie chorób. W sumie, podstawowymi mechanizmami regulacji epigenetycznej modyfikacji ekspresji genów niezależnych od sekwencji są: metylacja DNA, modyfikacja histonów oraz przebudowa histonów. Wszystkie trzy mechanizmy zostały w pracy opisane, przy wykorzystaniu danych literaturowych ostatnich lat. Ten fragment Wstępu kończy ciekawy rozdział, w którym opisano aktywność transkrypcyjną zależną od lokalizacji chromosomów w jądrze komórkowym. Ten podrozdział Wstępu kończy ważne sformułowanie cyt. str. 37: „Przedstawione dane wskazują na istnienie realnych korelacji pomiędzy lokalizacją jądrową danego genu a jego ekspresją”. To ostatnie stwierdzenie stanowi kluczowy argument do sformułowania Celów naukowych rozprawy, str. 53. Na stronach 38-45 znajdujemy wyczerpujący opis procesu miogenezy, w Rozdziale 3, natomiast opis genów pozostających w związku z miogenezą i kontrolą różnicowania mioblastów. Cele, w liczbie siedmiu, podjętych badań przedstawiono na stronie 53 Rozprawy. Syntetycznie rzecz ujmując, projekt miał na celu opisanie zmian lokalizacji pewnych fragmentów genomu w trakcie procesu różnicowania ludzkich mioblastów, oraz porównania zmian lokalizacji z profilami ekspresji wybranych genów biorących udział w procesie różnicowania mioblastów do miotub. Na stronach 54 - 95 Rozprawy znajdujemy dokładny opis aplikowanych metod cytogenetycznych oraz molekularnych. W sumie wykorzystany został materiał pochodzący z dwóch tkanek. Źródłem komórek miogennych był fragment mięśnia (o wym. ok. 0,5 cm³), badania kontrolne, których celem było zbadanie specyficzności własnoręcznie przygotowanych



sond centromerowych i specyficznych były limfocyty PHA-reaktywne pozyskiwane z krwi obwodowej. Pewną niezręcznością techniczną jest fragment tekstu zamieszczony na stronie 86, 6 wiersz od góry strony - cyt.: "*Preparaty leukocytów po hodowli z kolcemidem przygotowywano według wcześniej opisanej procedury*" (zwykle ten etap procedury opisujemy jako inkubację, autor stosował inkubację 60 minutową, zwykle jest to inkubacja 30 minutowa). I dalej: „*Celem nałożenia komórek jądrzastych krwi na preparat, próbkę rozpuszczono w utrwalaczu...*” (komórek nie rozpuszczamy, a raczej je zawieszamy w utrwalaczu). Jak rozumiem, ten opis procedury jest opisem uproszczonym. Przechodząc do opisu wyników chciałbym zwrócić uwagę na fakt, że badania przeprowadzono wykorzystując populację proliferujących mioblastów, które znajdowały się w logarytmicznej fazie wzrostu, oraz populację komórek, które poddano w pewnym sensie procesowi synchronizacji (hodowla w warunkach suboptymalnych, wycofanie czynnika wzrostu fibroblastów, obniżenie zawartości surowicy do 2% surowicy końskiej). Proces synchronizacji był wydajny, za czym przemawiają rezultaty badań immunofluorescencyjnych, ale również uważna analiza zdjęcia D Rye. IV-3, gdzie można zidentyfikować około 10% komórek jednojądrzastych w stadium G1 lub G2 i tylko 3% komórek w stadium S cyklu życiowego. Myślę, że fakt powyższy nie miał większego praktycznego znaczenia, ale trochę zabrakło mi w Dyskusji lub w komentarzu do opisu metod, dyskusji na ten temat. Tym bardziej, że autor w podrozdziale 1.2.2 zwraca uwagę na zjawisko zmian położenia chromosomów, zachodzące w ramach odpowiedzi na suboptymalne warunki hodowlane, które mogą być zależne od białek transportowych, patrz również pozycja 29 spisu Bibliografii „Mehta J.S i inni: „*Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts*” Biol.11,R5 (2010). Myślę, że powyższy komentarz byłby celowym przy interpretacji wyników analizy zmian morfologii jąder komórkowych (podrozdział 4.1. Analiza zmian morfologii jąder komórkowych). Bardzo dobre wrażenie robi lektura Rozdz. 3. Przygotowanie sond i optymalizacja techniki FISH. Począwszy od podrozdziału 3.1 Walidacja otrzymanych klonów bakterii aż po rozdział 3.3 Potwierdzenie specyficzności wybranych klonów. Wydaje się, że sposób podejścia metodologicznego autora rozprawy jest nowatorski i wart jest naśladowania w przyszłych badaniach. W tej sytuacji bardzo interesującym jest wynik opisany na str. 119 rozprawy, cyt. " *W przypadku chromosomu X, pomiary uwzględniały oba chromosomy. Nie wykazano jednak różnic w rozkładzie odległości od centrum jądra, co więcej, wykres rozkładu sugeruje, iż jest on stabilny między porównywanymi populacjami komórek*". Wynik ten weryfikuje nasze dotychczasowe wyobrażenie o lokalizacji przestrzennej obu chromosomów, zgodnie, z którym chromosom



heterocykliczny (o obniżonej aktywności) lokalizowany był peryferyjnie. Z drugiej strony ten od dekad ustalony pogląd, wsparty był lokalizacją obu chromosomów w płytkach metafazalnych uzyskiwanych w standardowych warunkach cytogenetycznej, takich komórek monojądrzastych jak limfocyty PHA-reaktywne, czy też fibroblasty. Nasza diagnostyka płci chromosomowej, którą prowadziliśmy przed laty, oparta na lokalizacji tzw. ciałek Barra, uwzględniała lokalizację tych heterochromatycznych grudek leżących również na obwodzie jądra komórkowego. Ja rozumiem intencję autora, który mierząc odległości między sygnałami leżącymi wewnątrz określonych chromosomów, odrzucił wyniki identyfikowane z nieaktywnym chromosomem X, cyt. str. 120: *„Wyjątkiem był chromosom X, dla którego rozpatrywana była jedynie odległość pochodząca z chromosomu aktywnego, zaś zdecydowanie niższe wartości, zakładające istnienie ciała Barra, były odrzucane”*. Zwracam jednak uwagę na rolę chromosomów XX (wszystkie badane próbki pochodziły od kobiet), bowiem do pewnego stopnia fenomen inaktywacji i lokalizacji w jądrze komórkowym mógłby być modelowym. Uwagi powyższe nie mają znaczenia w ocenie całego projektu, w którym zaprezentowano unikalny model śledzenia zmian ekspresji wybranych genów w trakcie procesu różnicowania komórki od mioblastu do mikrotubuli, wykazując istnienie zależności pomiędzy zmianami ekspresji genów a zmianami ich fizycznej lokalizacji w trakcie różnicowania. Sekwencje aktywowane w czasie różnicowania komórkowego lokalizowały się w połowie odległości pomiędzy centrum, a peryferiami jądra komórkowego miotub. Z kolei badania genów o obniżonej ekspresji, wykazywały lokalizację w bliskiej odległości od lamin jądrowych. Prezentowane wyniki badań mają charakter pionierski, zgodnie z moim stanem wiedzy, autor doskonale wykorzystał tradycyjne możliwości techniki FISH oraz innowacyjnie i skutecznie wykorzystał możliwości mikroskopii konfokalnej. Sposób wykorzystania danych uzyskanych dzięki mikromacierzom ekspresyjnym budzi szacunek. Rozmach przeprowadzonych badań, celowość użytych narzędzi zasługują na uznanie. Bardzo cenię opis badań nad ko-lokalizacją sond z białkami jądrowymi. Autor przyznaje - cyt. str. 127 *„Jednakże, wyniki otrzymane z eksperymentów FISH oraz barwień immunofluorescencyjnych wymusiły rewizję wcześniejszych oczekiwań”*. Taka opinia daje świadectwo rzetelności, skromności oraz potwierdza prawdziwą pasję naukową autora. Prezentowane wnioski w liczbie trzech w pełni spełniają założone cele pracy, mają charakter nowatorski i stymulują do prowadzenia dalszych badań. Na 172 stronach manuskryptu znalazłem tylko dwa błędy literowe, wszystkie ryciny i tabele doskonale ilustrują prezentowane treści, wykorzystane cytowania są celowe. W mojej ponad dwudziestoletniej karierze recenzenta prac doktorskich, habilitacyjnych i profesur,



manuskrypt Kol. T. J. Kolanowskiego jest na pierwszym miejscu. Chciałbym jednak namówić autora do rezygnacji z używania terminu „schorzenie” str. 19, głównie, dlatego że nie używamy go w opisach medycznych, bowiem nie znamy kryteriów, które pozwoliłyby ten stan odróżnić od choroby. Realizując program badań wykorzystano środki finansowe dwóch grantów naukowych oraz środki z Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Podczas realizacji projektu powstała jedna publikacja, kolejna jest w opracowaniu. Niezależnie od realizacji projektu, Kol. T. J. Kolanowski jest autorem lub współautorem siedmiu kolejnych publikacji pośrednio związanych z prezentową rozprawą. Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki badań zostały opublikowane oraz doceniając nowatorski charakter zastosowanego warsztatu badawczego, biorąc również pod uwagę, wysoką staranność, z jaką przygotowano manuskrypt rozprawy, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o dopuszczenie Kol. mgr. Tomasza Jana Kolanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stawiam również wniosek o wyróżnienie

Leopoldina Bogdan