



Wrocław, 01/11/2023

Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr inż. Anety Grymanowskiej:

Ocena zmienności kształtu jądra neuralnych komórek macierzystych neurogenezy hipokampalnej dorosłych.

Praca doktorska mgr inż. Anety Grymanowskiej powstała w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pan dr hab. Robert Filipkowski a promotorem pomocniczym Pani dr hab. Adriana Magalska. W pracy znajduje się informacja o finansowaniu części badań zamieszczonych w pracy w ramach projektu Harmonia (NCN nr2014/14/M/NZ4/00561). Część doświadczeń była prowadzona we współpracy z Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN, Pracownią Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej IBD im. Nenckiego PAN, Pracownią Neuroinformatyki IBD im. Nenckiego PAN oraz Interdyscyplinarnym Centrum Matematycznego Programowania i Modelowania Uniwersytetu Warszawskiego

Cel Pracy został klarownie przedstawiony w tytule rozprawy doktorskiej a następnie bardziej szczegółowo w rozdziale pt. "Cele pracy" rozbitym na trzy element składowe: 1.Opracowanie metody służącej do oceny kształtu jąder komórkowych przy zastosowaniu obrazowania w mikroskopie konfokalnym; 2.Kompleksowe opisanie i scharakteryzowanie cech kształtu jąder komórek neurogenezy hipokampalnej w komórkach rozróżnianych ze względu na etap różnicowania, stan aktywności, a także różnice w morfologii komórki; 3.Weryfikacja zastosowanej metody do oceny kształtu jąder komórek w modelu nowotworowym.

Autorka w pracy analizowała technikami mikroskopii konfokalnej skrawki uzyskane z hipokampu myszy a uzyskane obrazy mikroskopowe analizowała różnymi narzędziami bioinformatycznymi, oprogramowaniem o zróżnicowanych algorytmach dla uzyskania danych porównawczych na temat wielkości, parametrów kształtu, intensywności fluorescencji DNA oraz jej heterogeniczności. Uzyskane dane z komórek NeuSC na różnych etapach od typu 1 do 4 posłużyły do oceny przydatności takich analiz w analizach różnicowania dorosłych NSC i detekcji tą metodą stanu lub etapu różnicowania niezależnie od typowych markerów różnicowania.

W moim przekonaniu Autorka podjęła się dotknąć w swojej pracy jednego z kluczowych problemów współczesnej molekularnej biologii komórki: korelacji pomiędzy wzorem ekspresji genów, stanem metabolizmu, aktywnością szlaków sygnalizacyjnych, docierającymi sygnałami, dostępnością materiałów budulcowych, parametrami fizykochemicznymi i mechanicznymi środowiska zewnętrznego,



szybkością migracji oraz stadium cyklu komórkowego a tak łatwo teoretycznie mierzalnym parametrem danej komórki jak kształt jej jądra komórkowego. By uzmysłowić skalę trudności uzyskania takich korelacji w banalnie teoretycznie prostym modelu np. komórek fibroblastów skórnych – np. linii HDF to w typowej pożywce kształt i wielkość jądra zależy od tego czy jest „przyklejona” do podłoża czy nie, od fazy cyklu komórkowego - we wczesnej G0/G1 jest bardziej kuliste i mniejsze, potem większe i wydłużone a stopień wydłużenia w osi X/Y i spłaszczenia w osi z zależy od twardości, podłoża czy środowiska jeśli je hodujemy „zatopione” w zestalonym środowisku. Brak, dysfunkcja, niedobór lub nadmiar jednego z kluczowych elementów struktury jądra, dysfunkcja połączenia szkieletu jądrowego ze szkieletem cytoplazmatycznym lub samej NE skutkuje zmianą kształtu komórki i jądra komórkowego i jednocześnie zmianą wzoru ekspresji dla od kilkunastu do kilkuset genów lub zmianą aktywności wewnętrznych szlaków sygnalizacyjnych dla podobnej liczby białek. Jeśli takie fibroblasty hodujemy w postaci tzw. podwieszanej kropli jako skupisko wielokomórkowe to komórki wewnątrz mają inny kształt jader (są bardziej kuliste) niż komórki na zewnątrz, różnią się wzorem i poziomem ekspresji białek cytoszkieletu i szkieletu jądrowego. Zwykła nadekspresja niektórych białek integralnych NE (LBR, laminy typu B lub innych białek np. z domeną CAAX (np. progeryna)), białek integralnych z domeną LEM lub samych fragmentów białek z taką domeną lub z motywem CAAX skutkuje deformacją jądra i lobulacją NE co jest zwykle skorelowane ze zmianami w ekspresji relatywnie niewielkiej grupy genów czy szlaków sygnalizacyjnych. Choć oczywiście są wyjątki np. ekspresja progeryny (HGPS) czy zablokowanie procesowania farnezylowanych białek (np. brak proteazy ZEMPSTE24/FACE1-Dermopatia restryktywna). Przykładem klasycznym wpływu dostępności materiałów budulcowych na wielkość jąder komórkowych są zmieniające się wielkości komórek i jąder komórkowych oocytów tkankowców i rozwijającego się zarodka w miarę wyczerpywania zgromadzonych w oocycie „zapasów” (np. jeżowiec, *Drosophila*, *Xenopus*). Podobnie można manipulować wielkością jader komórkowych lub zablokować ich tworzenie lub tworzenie NPC lub dekondensację chromatyny w systemie *in vitro* nuclear assembly limitując lipidy, robiąc deplecję określonego białka czy wzbogacając system o tzw. „dominujące mutanty delecyjne”

Tym nieco przydługim wstępem chciałem Państwu przybliżyć stopień złożoności problemu którego dotknąć podjęła się Autorka biorąc jako model badawczy znacznie bardziej skomplikowany układ badawczy – komórki niszy neurogennej w hipokampie myszy i ocenę zmienności kształtu jąder komórkowych na różnym etapie różnicowania od dorosłych NSC do dojrzałych neuronów w oparciu o techniki obrazowania w mikroskopii konfokalnej i analizę bioinformatyczną.

Formalna ocena pracy: Praca liczy 96 stron numerowanych o prawidłowym podziale na rozdziały i o prawidłowej kolejności rozdziałów. Praca zawiera 22 ryciny oraz 3 tabele. Wstęp liczy 21 stron, Materiały i Metody 7 stron, Wyniki 24 strony, Dyskusja 10 a Bibliografia liczy 195 pozycji, w większości dobrze dobranych i zajmuje 14 stron.



Pozostałe to Podsumowanie wyników i Wnioski, Streszczenie, Abstract, Innowacyjność rozprawy doktorskiej oraz Lista publikacji Autorki rozprawy zawierająca 5 pozycji literaturowych: 4 prace eksperymentalne, luźno związane z tematyką rozprawy a Autorka nie jest w nich pierwszym autorem oraz 1 praca przeglądowa współautorska z promotorem, w której Autorka jest pierwszym autorem a praca jest ściśle związana z tematyką rozprawy.

Głównymi metodami badawczymi oraz **modelem badawczym** zastosowanymi przez Autorkę są: linia myszy transgeniczných z wprowadzonym genem GFP pod kontrolą promotora genu nestyny (*Nestin-GFP*), odpowiednio wypreparowane i utrwalone skrawki mózgu myszy przygotowane do analiz techniką mikroskopii konfokalnej i mikroskopii elektronowej, analizy immunohistochemiczne (immunofluorescencja i „immunogold”), oprogramowanie bioinformatyczne i statystyczne (m.in.: VisNow, ITK-SNAP, ANOVA, analiza PCA, ...).

Merytoryczna ocena pracy

Wstęp jest napisany jasno i zrozumiale, dobrze podzielony na elementy opisujące ogólną wiedzę na temat budowy i funkcji jądra komórkowego jak i sekcje dotyczące wprowadzenia do tematyki pracy i relacji pomiędzy wzorem ekspresji genów strukturą chromatyny a kształtem jądra komórkowego. Część bezpośrednio wprowadzająca do celu pracy zawiera wystarczające ilości danych dla zrozumienia problematyki funkcjonowania populacji dorosłych komórek macierzystych nerwowych, niszy dorosłych NSC oraz procesu różnicowania do frakcji NeuN. Pewnym zaskoczeniem jest dla mnie nieco specyficzny i tendencyjny dobór cytowań podpierających założenia przedstawiane w części ogólnej. Rozumiem intencje Autorki chcącej jak najlepiej ukierunkować czytelnika i uzasadnić swoje tezy wyjściowe rozprawy. Mam jednak drobne uwagi co do niektórych tez oraz interpretacji wyników niektórych prac czy zjawisk udokumentowanych cytowaniami. Ponadto mam wrażenie, że zbyt wiele uwagi Autorka poświęca danym z modelu drożdżowego czy *C.elegans* zamiast danym z modelu komórkowego/zwierzęcego kręgowców czy ssaków lub ewentualnie *Drosophila* które mają mitozę typu otwartego (dwa pierwsze modele mają mitozę typu zamkniętego). Niektóre cytowania dotyczące komórek ssaków czy modelu *Drosophila* nie są zbyt fortunnie dobrane, np. Ahs i wsp. 2019 (HeLa) czy Otsuki i Brand 2018 (embriogeneza *Drosophila*). Niektóre z cytowań nieco się zdezaktualizowały w sensie danych eksperymentalnych jak i ich interpretacji. Niektóre z interpretacji Autorki danych z cytowań oraz wysuniętych hipotez mogłyby być podstawą do dyskusji polemicznej. W tym kontekście mam także pytanie do Autorki o źródło danych do schematów na rycinach 1-4 oraz autorstwo rycin 1-5. Szczegółową listę zagadnień do potencjalnej dyskusji z Autorką zebranych z całości rozprawy załączę jako osobny tekst do recenzji. Rycina 5 jest bardzo pomocna dla zrozumienia procesu różnicowania dorosłych komórek macierzystych w NeuN jednak zabrakło mi informacji tutaj lub w M&M jak ma się ułożenie skrawka wycinanego z hipokampa w stosunku do wektora



siły grawitacji bądź nacisku warstw leżących powyżej w oryginalnym położeniu w mózgu.

Materiały i Metody

Ten rozdział zawiera większość istotnych informacji niezbędnych do pełnej analizy prowadzonych eksperymentów oraz analizy przedstawionej dokumentacji i oceny uzyskanych wyników. Czasami brakuje informacji (3.3.1) czy wszystkie te barwienia wizualizowano razem z obrazowaniem opisanym w rozdziale 3.4 i w jakich kombinacjach oraz czy wizualizowano całe komórki ze skrawka jednocześnie z obrazowaniem jąder komórkowych. W Tabeli 2 przedstawiono jedynie zestawienie markerów dla identyfikacji typu komórki. W rozdziale 3.3.2 zabrakło informacji o średnicy złotych kulek, brak informacji zrozumiałej dla laika lub referencji do opisu oprogramowania dla zastosowanych programów i algorytmów. Dobrze byłoby pokazać w M&M rozkład danych z analizy PCA (wykres oryginalny oraz rozkład po odrzuceniu przez macierz kowariancji). Ryciny 5 i 6 okazały się bardzo pomocne w zrozumieniu badanych parametrów i identyfikacji osi X, Y, Z prawidłowo do wysokości, szerokości i głębokości choć miałem z tym pewne trudności opierając się na Tabeli 1. oraz dwóch niejasnych wzmiankach w tekście.

Wyniki

Wyniki przedstawione w tym rozdziale pochodzą z 5 doświadczeń (Rozdział 3.9). W pierwszych trzech Autorka dokonywała oceny zmienności kształtu jądra w zależności od stadium dojrzałości komórek, od stanu aktywacji komórek oraz od cech morfologicznych komórki. W doświadczeniu czwartym zastosowano automatyczną metodę analizy parametrów kształtu w zależności od stadium dojrzałości a w ostatnim doświadczeniu analizowano ultrastrukturę jądra komórki *Nestin*-GFP metodą mikroskopii elektronowej oraz dokonano rekonstrukcji 3D tego jądra. Rycina 7 ilustruje, że jądra komórkowe różnią się, statystycznie istotnie, pod względem wyliczonych: powierzchni, objętości kulistości, wysokości oraz „gęstości DNA”. Przy czym generalnie najbardziej od innych, oraz od siebie, różni się typ 3 i 4. Typ 2a i 2b we wszystkich mierzonych parametrach były do siebie bardzo zbliżone. Następnie Autorka dokumentuje zdjęciami z mikroskopu konfokalnego (wizualizacja wyłącznie fluorescencji z barwienia DNA) niektóre opisane różnice w budowie jąder komórkowych dla komórek typu 1-4 neurogenezy hipokampalnej (Ryc.9-10). Następnie dokonuje porównania parametrów jąder czterech różnych grup neuronalnych komórek macierzystych o różnej aktywności demonstrując różnice jedynie w kulistości pomiędzy jądrami komórek pozytywnych względem nestyny i Ki67 łącznie oraz komórkami z obecnością GFAP, GFAP i nestyny oraz samej nestyny. Dodatkowo Autorka w analizie w mikroskopii elektronowej i konfokalnej plus wizualizacji 3D (Ryc. 19-21) potwierdza obecność nieregularności i wpukleń kształtu jąder komórkowych barwionych na DNA. Wyniki tych eksperymentów są bardzo interesujące i sugerują, że istotnie parametry kształtu jąder komórkowych zmieniają



się pomiędzy różnymi typami komórek co może wskazywać na co najmniej kilka potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten mierzony parametr. Czy te wykazane mierzalne parametry mogą być wykorzystywane w celach identyfikacyjnych i wyłącznie w barwieniach na DNA bez weryfikacji wstępnej typu komórki stosowanymi markerami typu komórek lub bez analizy kształtu komórek (np. do analiz automatycznych) – mam pewne wątpliwości. Niemniej dane są bardzo interesujące, otwierają szeroko drzwi do bardziej zaawansowanych badań nad molekularnymi aspektami tych różnic. Na ile są one efektem ubocznym zmian w transkrypcji, proteomie, interaktomie czy aktywności szlaków sygnalizacyjnych, zmiany niszy/gęstości otoczenia, nabrania zdolności migracji, itd. wymaga to wielu skomplikowanych eksperymentów i analiz. Plusem tej części pracy jest bardzo dobre opanowanie przez Autorkę wszystkich stosowanych narzędzi zarówno z tzw. „wet lab” jak i „soft lab” czy bardzo sprawnego zastosowania narzędzi bioinformatycznych do analizy danych i obróbki statystycznej danych. Minusem dla mnie jako molekularnego biologa komórki jest brak przykładowej dokumentacji z mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej z barwieniami markerowymi i wizualizacją GFP do każdego z eksperymentów do własnej analizy eksperymentów i interpretacji (do eksperymentów z Rycin 7-12). Dodatkowo mam pytanie do Autorki w kwestii danych przedstawionych na Rycinach 9, 10 i 20. Czy obecne na rycinach inne niezaznaczone jądra komórkowe a podobne kształtem do zaznaczonego typu nie ekspresjonują żadnego z tych markerów co jądra z „obwódka” (np. Ryc 20, Ryc 9)?

Czy typ 1 z typem 2 (warstwa podziarnista) nie powinien zajmować miejsca w innej warstwie od typu 4 (warstwa ziarnista) czyli nie powinien sąsiadować ze sobą w tej samej warstwie (np. schemat na Rycinie 5)? Trudno odnieść się do wyników eksperymentów z rozdziału 4.4 nie wiedząc jaka była orientacja wycinka tkanki w oryginalnym hipokampie względem wektora grawitacji i który to byłby wymiar na wykresach. Wydruki na Rycinie 19 nie pozwalają na samodzielną ocenę przez recenzenta dokumentacji z barwienia techniką „immunogold” zarówno w A jak i B a szczególnie na powiększeniach.

Analiza statystyczna z eksperymentu kontrolnego z analizą skrawków nowotworowych i kontrolnego przedstawiona dla zastosowanej przez Autorkę metody analizy kształtu (bez przedstawienia typowych barwień będących podstawą analizy statystycznej), wykazuje istotne różnice statystyczne pomiędzy kontrolą i nowotworami oraz w niektórych parametrach pomiędzy nowotworami między sobą. W takim układzie eksperymentalnym uzyskane dane wyglądają obiecująco jako teoretycznie potencjalne narzędzie do detekcji automatycznej. Pozostaje jednak wątpliwość jak efektywna i wiarygodna byłaby taka analiza na typowych wycinkach z biopsji gdzie mamy różne komórki i inne elementy mniej lub bardziej „wymieszane” z komórkami nowotworowymi jeśli Autorka sama przyznaje w Podsumowaniu, że efektywność identyfikacji dla komórek hipokampa wynosi 46%. Ponadto istnieją, z tego co wiem,



mniej skomplikowane, szybsze i mniej kosztowne zapewne i o sprawdzonej wiarygodności testy histochemiczne do pierwotnej detekcji nowotworów.

Dyskusja

Rozdział napisany jest klarownie i bardzo precyzyjnie. Autorka bardzo sprawnie porusza się w krytycznej analizie wyników poszczególnych eksperymentów. Autorka prawidłowo i umiejętnie dokonuje analizy wyników eksperymentów. Zgadzam się z Autorką, że praca jest oryginalna w pomyśle i wykonaniu. Jest to pierwsza praca systematycznie analizująca korelację parametrów kształtu jądra ze stanem fizjologicznym, etapem różnicowania i markerami różnicowania dojrzałych komórek neurogennych w niszy neurogennej hipokampa. Jest więc pracą o charakterze pionierskim i innowacyjnym w tej tematyce. Nie do końca podzielam natomiast entuzjazm Autorki w kwestii potencjalnych zastosowań jej metody i wariantów automatycznych do oceny kształtu jąder innych komórek eukariotycznych i ich korelacji z organizacją chromatyny, wzorem ekspresji genów, stanem fizjologicznym czy stanem różnicowania. Podobnie nie do końca podzielam entuzjazm Autorki do potencjalnego zastosowania jej metody i wariantów do diagnostyki nowotworów. Zapraszam do ewentualnej dyskusji w tej kwestii podczas publicznej obrony. Bardzo pozytywnie oceniam zaprezentowanie w Dyskusji w tym temacie również opinii krytycznych co do potencjału metody do detekcji komórek nowotworowych (strona 70; ostatni akapit), co wskazuje na dużą dojrzałość naukową Autorki i jej duży potencjał jako młodego naukowca. Dodatkowo w Podsumowaniu Autorka podkreśla jedynie 46% efektywność przyporządkowania jądra do danego typu komórki w procesie neurogenezy hipokampalnej co podkreśla po raz kolejny umiejętność krytycznej analizy uzyskanych danych i obiektywizm interpretacyjny który musi być podstawą pracy każdego naukowca. Autorka w pełni wypełnia ten warunek.

Podsumowanie:

W mojej ocenie stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi nowe i innowacyjne rozwiązanie problemu naukowego w dziedzinie identyfikacji typów komórek w procesie neurogenezy hipokampalnej. Rozprawa prezentuje bardzo dużą wiedzę teoretyczną Autorki w uprawianej dyscyplinie naukowej w tematyce struktury i funkcji jąder komórkowych generalnie oraz w szczególności w obszarze neurogenezy hipokampalnej. Praca dobrze też ilustruje umiejętność samodzielnej pracy i samodzielnego myślenia w pracy naukowej.

W związku z tym oświadczam, że praca doktorska mgr inż. Anety Grymanowskiej spełnia wszystkie wymagania art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnoszę wniosek do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej



PAN im. Mirosława Mossakowskiego o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z powierzeniem

Pracownia Białek Jądrowych
KIEROWNIK
prof. dr hab. Ryszard Rzepecki

