

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pana mgr Pawła Leszczyńskiego  
w formie zbioru publikacji prezentowanego pod tytułem:  
„Rola białka PRDM3 w procesie różnicowania neuronalnego”  
„Role of PRDM3 protein in neuronal differentiation”**

Obecnie za jedną z najważniejszych grup chorób cywilizacyjnych uznaje się choroby układu nerwowego obejmujące liczne schorzenia neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienie rozsiane. Etiologia większości z tych chorób nie została dokładnie poznana a jako główną ich przyczynę podaje się stopniową utratę funkcji i spadek ilości komórek nerwowych prowadzące do trwałych uszkodzeń tkanki nerwowej. Mimo licznych badań prowadzonych na całym świecie w zakresie analizy przyczyn występowania chorób układu nerwowego, ich rozwoju oraz możliwości leczenia, procesy molekularne zachodzące w komórkach nie zostały zidentyfikowane. Nadal brakuje informacji dotyczących podstawowych mechanizmów molekularnych zachodzących w komórkach podczas procesów chorobowych oraz dostępnych modeli badawczych zbliżonych do modelu *in vivo*.

Neurogeneza, polegająca na tworzeniu nowych komórek nerwowych, regeneracji i odbudowie uszkodzonej tkanki nerwowej, zdaje się być przyszłością medycyny neuroregeneracyjnej. Praca doktorska Pana mgr. Pawła Leszczyńskiego wpisuje się dokładnie w ten obszar nauki i stanowi kompleksowe opracowanie dotyczące roli i znaczenia czynników z rodziny PRDM w procesie neurogenezy. Dodatkowo, doktorant opracował uproszczoną metodę wyprowadzania linii neuronalnej *in vitro* jako modelu badawczego dla procesów rozwoju oraz degeneracji komórek nerwowych. Przedstawiona rozprawa doktorska obejmuje zbiór trzech publikacji naukowych – dwóch oryginalnych oraz jednej publikacji przeglądowej o łącznej punktacji 350 pkt. MNiSW oraz sumarycznym współczynnikiem wpływu Impact Factor wynoszącym 10,06 (Cells; International Journal of Molecular Science; Journal of Visualized

Experiments). Cykl publikacji stanowi spójną całość, w której udział doktoranta w zależności od publikacji wynosi od 60 do 63%.

## **Ocena merytoryczna pracy**

### ***Oryginalność tematyki i cel badań***

Proces powstawania nowych komórek nerwowych zwany neurogenezą jest kluczowy dla prawidłowej budowy i funkcjonowania układu nerwowego. Nieprawidłowości w przebiegu neurogenezy, zachodzącej zarówno w okresie prenatalnym jak i postnatalnym, mogą prowadzić do wielu schorzeń oraz upośledzenia neuroregeneracji tkanki nerwowej np. po przebytych urazach. Stopniowo wzrastającą ilość chorób układu nerwowego oraz ciągle nieznaną podłoże ich występowania sprawia, że proces neurogenezy jest szeroko badanych w wielu ośrodkach naukowych. Szczególnie istotne wydaje się poznanie procesów molekularnych regulujących kierunek różnicowania się i proliferacji neuronalnych komórek macierzystych w aspekcie opracowania możliwych rozwiązań terapeutycznych w przyszłości. Badania przedstawione w ramach cyklu publikacji w pełni wpisują się w obecne trendy. Prezentowana tematyka badań podejmuje temat istotny z punktu widzenia dalszych badań naukowych oraz wykorzystania uzyskanych wyników w medycynie. Uzasadnienie podjętego zagadnienia przedstawiono w sposób przekonujący o konieczności i celowości podjętych badań.

Cele prowadzonych badań doktorant zdefiniował w sposób klarowny i jasny dzieląc je na dwie części zamieszczone w poszczególnych publikacjach. Celem nadrzędnym prowadzonych badań było określenie roli czynnika PRDM3 w procesie neurogenezy, co określono na podstawie licznych analiz molekularnych zarówno na poziomie DNA, mRNA jak i białka. Należy zwrócić uwagę, że doktorant wykorzystuje nowoczesne metody badawcze takie jak wyciszanie genów techniką CRISPR/Cas9. Doktorant wraz z zespołem opracował i przedstawił możliwość wykorzystania komercyjnie odstępnej linii komórkowej P19 jako hodowli wyjściowej dla modelu neurogenezy w badaniach *in vitro*. Funkcja jaką pełni białko z rodziny PRDM podczas wzrostu i różnicowania się neuronalnych komórek macierzystych jest słabo poznana, dlatego też podjętą problematykę badań oceniam jako aktualną i nowatorską.

### ***Metodyka badań***

Materiał badawczy oraz zastosowane metody analiz zostały opisane szczegółowo, w sposób wyczerpujący i spełniający kryteria opracowań naukowych. Konieczność wykonania poszczególnych etapów badań i realizacja każdego z zaplanowanych etapów została obszernie

opisana. Doktorant w sposób poprawny dobrał metody badawcze, tak aby w pełni zrealizować zamierzone cele badawcze uzyskując wiarygodne i jednoznaczne wyniki. Schematyczny plan badań przedstawiono w postaci przejrzystych rycin, co ułatwia zapoznanie się z wykonywanymi badaniami.

Zakres wykorzystywanych przez doktoranta metod oceniam bardzo wysoko. Wykonane analizy były bardzo pracochłonne, wymagające precyzji i skrupulatności. Doktorant w swoich badaniach wykorzystał etap hodowli komórkowych komercyjnie dostępnej linii P19 z autorską modyfikacją warunków hodowli (dodatkiem kwasu retinowego) pozwalającą na opracowanie modelu do badań neurogenezy. Ponadto, do potwierdzenia specyficzności uzyskanych komórek odróżnicowanych w kierunku neuronów lub określenie związku genu PRDM3 z procesem neurogenezy autor wykorzystał analizę ekspresji genów metodą RT-PCR oraz qPCR, wyciszanie genów metodą CRISPR/Cas9, analizę poziomu białka (Wester Blotting) immunofluorescencyjne barwienie wybranych białek szkieletu komórkowego czy analizę sekwencji regionu promotorowego na poziomie DNA (metoda PCR-HRM, sekwencjonowanie Sanger). Zastosowane podejście metodyczne oceniam jako prawidłowe i adekwatne do tego typu analiz. Tak szerokie spektrum zastosowanych metod umożliwiła kompleksowe potwierdzenie założonej hipotezy badawczej.

Z punktu widzenia recenzenta mam jednak kilka uwag, które dotyczących opisu podejścia metodycznego. W przypadku eksperymentu potwierdzającego skuteczność modelu odróżnicowania komórek P19 w kierunku neuronów nie podano precyzyjnie ilości powtórzeń technicznych wykonanych dla hodowli komórkowych - komórki hodowano na płytce 6 dołkowej, czyli można by sądzić, że dla każdego punktu pomiarowego wykonano 6 powtórzeń? Analizę ekspresji genów wykonywano w 2 powtórzeniach i zaprezentowano wyniki dla jednej próbki. Proszę wyjaśnić, ile powtórzeń wykonano dla hodowli komórkowych w danych punkcie ponieważ, jest to istotna informacja potwierdzająca powtarzalność uzyskanych wyników w założonych warunkach eksperymentalnych. Analizy poziomu ekspresji wybranych genów zostały wykonane metodą RT-PCR, która nie jest tak dokładna jak analiza przy użyciu aparatu real-time PCR. Uważam, że nieco lepszym podejściem było by wykorzystanie dokładniejszej metody jak qPCR szczególnie, że prezentowane wyniki mając na celu potwierdzenie skuteczności zupełnie nowego podejścia metodycznego. Brak też dodatkowych informacji o stabilności wykorzystanej kontroli endogennej - GAPDH. Załączona Figura 2 może wskazywać, że zastosowany gen ulega podobnej ekspresji w każdym badanym okresie, nie jest to jednak potwierdzone ani liczbowo ani literaturowo. W zamieszczonej tabeli

prezentującej wykorzystywane startery brakuje numerów akcesyjnych dla badanych genów. Numery te nie są prezentowane również w tekście. Jest to kluczowa informacja pozwalająca na łatwą identyfikację badanej sekwencji i wykorzystanej wersji genomu referencyjnego oraz powtórzenie wykonanych analiz.

Proszę także o wyjaśnienie z czego wynikała tak duża rozbieżność w długości ampikonów wykorzystanych do reakcji RT-PCR (do 86pz do 520pz)? Tak duże różnice mogą istotnie wpłynąć na wydajność reakcji PCR.

Czy wykonano kontrolę no-RT mogącą wykluczyć ewentualne zafałszowanie uzyskanych wyników zanieczyszczeniem DNA czy zastosowano inne rozwiązanie?

Uwagi dotyczące wykorzystanej kontroli endogennej, braku numerów akcesyjnych i kontroli zanieczyszczenia DNA dotyczą również analizy wykonanej w ramach szczegółowych analiz dla genu PRDM3.

### ***Wyniki przeprowadzonych badań***

Wyniki prezentowane w przedstawionym do oceny osiągnięciu stanowią cenne źródło wiedzy na temat mechanizmów warunkujących różnicowanie się komórek w neurony oraz wskazują kolejne kierunki badań w tym zakresie. Wyniki zaprezentowano w formie przejrzystych wykresów, rycin, fotografii oraz filmu.

Doktorant wykazał, że standardowe warunki hodowli linii komórkowej P19 (medium DMEM z dodatkiem FBS) umożliwiają utrzymanie niezróżnicowanych komórek, podczas gdy dodatek kwasu retinowego RA pozwala na odróżnicowanie komórek i inicjuje proces neurogezy. Komórki charakteryzujące się cechami morfologicznymi neuronów zaobserwowano już po 4 dniu hodowli. Uzyskane wyniki potwierdzono prezentując profil ekspresji genów specyficznych dla neuronów (Map2; NeuN) oraz niezróżnicowanych komórek macierzystych (Oct4; Nanog).

Opracowany schemat indukcji neurogenezy został następnie wykorzystany przed doktoranta jako model in vitro do określenia roli jaką pełni gen PRDM3 w procesie dojrzewania i proliferacji komórek neuronalnych. Autor, wykorzystując liczne metody badawcze, udowodnił zaangażowanie genu PRDM3 w proces neurogenezy wraz ze zakazaniem mechanizmu jego działania. Zastosowanie techniki wyciszenia genów (technika CRISPR/Cas9 wraz z lipofekcją oraz sortowaniem komórek w obecności barwnika fluorescencyjnego FACS)

umożliwiło doktorantowi na jednoznaczne potwierdzenie hipotezy, że spadek ekspresji genu PRDM3 indukuje różnicowanie komórek P19 do neuronów i wcześniejsze ich dojrzewanie. W warunkach wyciszenia ekspresji genu PRDM3 wykazano także istotny wzrost poziomu proliferacji komórek nieneuronalnych. Ponadto, doktorant wykazał synergistyczny wpływ białek wiążących z rodziny GATA oraz kwasu retinowego na aktywność promotora genu PRDM3 a tym samym na nasilenie procesów neurogenezy. Autor wskazał, że białka GATA3, 4 oraz 6 oddziałują stymulująco na promotor genu PRDM3.

Dopełnienie wyników własnych stanowi obszerny opis (255 pozycji piśmiennictwa) roli czynników PRDM w regulacji samoodnowy i różnicowania komórek macierzystych zebrany w formie publikacji przeglądowej. Białka PRDM stanowią słabo poznaną grupę czynników związanych ze wzrostem i funkcją komórek wielu tkanek, które regulują poprzez szereg mechanizmów epigenetycznych. Doktorant w sposób bardzo szczegółowy opisuje białka z rodziny PRDM, kładąc nacisk na czynniki PRDM3 i PRDM16 oraz FOG1 i FOG2, jako czynniki nowe i szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania tkanki nerwowej. Doktorant w sposób interesujący dyskutuje z wynikami przedstawionymi przez innych autorów odnosząc się również do badań własnych. Dokonując analizy zebranej literatury oraz wyników badań własnych autor wyciąga wnioski i sugeruje możliwą drogę regulacji czynników PRDM w procesie różnicowania neuronów.

### ***Wnioski***

Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych literaturowych doktorant poprawnie sformułował 7 wniosków wskazując na rolę oraz mechanizmy regulacji genu PRDM3 podczas neurogenezy. Wnioski odpowiadają tezom postawionym w hipotezie badawczej. W podsumowaniu autor zaznacza również konieczność prowadzenia dalszych badań i wyznacza możliwe kierunki w tym zakresie.

Podsumowując, wyniki wykonane w ramach przedstawionego cyklu publikacji stanowią spójne i kompleksowe opracowanie. Literatura została dobrana właściwie uwzględniając najnowsze pozycje obejmujące dany obszar wiedzy. Opracowany uproszczony model może stanowić cenne narzędzie dla innych badaczy, a przedstawione wnioski wstęp do kolejnych badań.

Wymienione uwagi nie umniejszają wartości przedstawionego cyklu publikacji i prezentowanych w nim wyników. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno od strony merytorycznej jak i formy.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia wymogi określone w artykule 13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 56 poz. 595 z 2003 r. z późn. zm.) oraz przepisach wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie **mgr Pawła Leszczyńskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duży zakres zrealizowanych badań, dokładnie i skrupulatnie przeprowadzoną analizę wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

*dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ*

*Katarzyna Ropka-Molik*