



Łukasiewicz
PORT
Polski Ośrodek
Rozwoju
Technologii

Dr hab. Tomasz J. Prószyński

Wrocław, 28.02.2023

ŁUKASIEWICZ – PORT

Polski Ośrodek Rozwoju Technologii

Ul. Stabłowicka 147

54-066 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Mrówczyńskiej pt. „Wpływ zelsoliny, nieintegrynowego receptora lamininy oraz kinazy zależnej od integryny na rozwój obwodowego układu nerwowego zarodka kurzego”

Pracę wykonano w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Antoniny Mazur.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań podstawowych nad rozwojem obwodowego układu nerwowego, który umożliwia przekazywanie informacji pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym a docelowymi narządami. Rozwój obwodowego układu nerwowego jest wieloetapowym procesem, który rozpoczyna się na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. Podczas tworzenia się cewy nerwowej dochodzi do wyodrębnienia grupy multi-potencjalnych komórek tworzących grzebienie nerwowy. Komórki te różnicują się i migrują do różnych części zarodka, tworząc m.in. obwodowy układ nerwowy, w którego skład wchodzi neurony, komórki glejowe zwane komórkami Schwanna oraz prekursorzy tych komórek. Zdolność komórek do migracji warunkowana jest wieloma czynnikami, takimi jak interakcje międzykomórkowe, czynniki

Strona 1 z 8



wewnątrzkomórkowe oraz pozakomórkowe. Na poziomie molekularnym ważną rolę w tym procesie odgrywają składowe macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym lamininy. Są one wiązane na powierzchni komórki przez receptory integrynowe, kompleks dystroglikanu, białko LamR i inne. Interakcje laminin z receptorami umożliwiają uruchomienie szlaków sygnałowych wewnątrz komórki, organizację aparatu adhezyjnego komórki i przebudowę cytoszkieletu. Procesy te wpływają na migrację komórek, regulację ich morfologii oraz możliwości współtworzenia tkanek. Zaburzenia oddziaływań z macierzą zewnątrzkomórkową oraz w organizacji wewnątrzkomórkowych procesów przez nie regulowanych może prowadzić do wielu schorzeń rozwojowych.

Omawiana rozprawa dotyczy badań nad lokalizacją i funkcją trzech białek w rozwoju zarodkowym kury - nieintegrynowego receptora lamininy (LamR), kinazy zależnej od integryn (ILK) oraz żelsoliny (GSN). Zarówno dane literaturowe, jak i badania kierowane przez promotora pracy wskazują na ważną funkcję powyższych białek w rozwoju obwodowego układu nerwowego. Podjęta tematyka badawcza jest szczególnie ciekawa, ponieważ różne typy komórek często wykazują odmienne mechanizmy interakcji z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulacji mechanizmów w odpowiedzi na sygnały z zewnątrz komórki.

Ogólny opis pracy

Rozprawa ma poprawną strukturę prac doktorskich i zawiera szczegółowy spis treści, wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, przedstawienie założeń i celów pracy, opis użytych materiałów i metod, przedstawienie wyników, rozdział poświęcony wnioskowi, spis rycin oraz bibliografię.

Wstęp jest obszerny, napisany w sposób zrozumiały i ciekawy. Autorka wprowadza czytelnika w organizację ośrodkowego układu nerwowego,

Strona 2 z 8



mechanizmy jego powstawania, przy czym dokładnie opisuje mechanizmy migracji komórek pochodzących z grzebienia nerwowego. Następnie opisana jest organizacja i funkcje macierzy pozakomórkowej ze szczególnym uwzględnieniem lamininy oraz receptorów laminin na powierzchni komórek. Ta część połączona jest z opisem regulacji adhezji komórkowej i cytoszkieletu aktynowego oraz ich znaczenia w migracji komórek. Następnie omówiona jest delaminacja grzebienia nerwowego oraz migracja komórek grzebienia podczas rozwoju zarodkowego. Na koniec wstępu znajdują się rozdziały poświęcone patologiom związanym z komórkami pochodzącymi z grzebienia nerwowego oraz dokładne opisy budowy i funkcji białek, na których autorka koncentruje swoje badania, czyli GSN, ILK i LamR. Wstęp zawiera 15 kolorowych rycin, które są czytelne i łatwe do interpretacji. Trochę skrótowo przedstawiony został stan wiedzy dotyczącej funkcji trzech badanych białek w rozwoju obwodowego układu nerwowego – informacje te zawarte są dopiero w dyskusji. Utrudnia to trochę zrozumienie nowości stawianych hipotez oraz proponowanych badań w kontekście wiedzy już istniejącej. Dodatkowo można było zawrzeć trochę lepsze uzasadnienie zastosowania modelu kurzego w stosunku do innych modeli badawczych np. modelu mysiego.

Szczegółowe cele pracy zostały zawarte w 5 punktach oraz poprzedzone krótkim wstępem o lamininie-1 (zwanej również 111) oraz badanych białka. Wstęp ten zawiera odniesienie do nieopublikowanych wyników przedstawionych na ryc. 10, które sugerują interakcje pomiędzy GSN, a LamR i ILK.

Materiały i metody to 45 stron dokładnego opisu odczynników i zastosowanych technik badawczych. Rozdział zawiera opis stadiów rozwoju zarodka kury, skład użytych buforów, numery katalogowe przeciwciał oraz zastosowane rozcieńczenia. W tej części rozprawy znajdują się mapy użytych plazmidów, sekwencje starterów DNA oraz sond do hybrydyzacji. Opis



zastosowanych technik jest dość imponujący. W badaniach zastosowano procedury elektroporacji *in ovo*, hodowli eksplantów *ex vivo* oraz komórek *in vitro*. Dodatkowo Autorka używała technik molekularnych, biochemicznych i mikroskopowych. Tak rzetelnie przygotowane opisy z pewnością umożliwią ponowne przeprowadzenie doświadczeń, gdyby zaszła taka potrzeba.

Wyniki

Przedstawione wyniki badań rozpoczynają się potwierdzeniem i oszacowaniem poziomu ekspresji genów ILK i LamR przy użyciu techniki RT-PCR, hybrydyzacji *in situ* oraz western blot. Analiza ekspresji GSN została opublikowana wcześniej (Mazur AJ, et al., Brain Struct. Funct. 2016). Wyniki sugerują produkcję mRNA oraz białek ILK i LamR już na wczesnych etapach rozwoju zarodka kury (HH6) i zróżnicowany wzór ekspresji w różnych narządach na późniejszym etapie rozwoju (HH36). Obecność mRNA wykryta została w tkankach i narządach, które są pochodnymi komórek grzebienia nerwowego, na których Autorka koncentruje swoje dalsze eksperymenty. Wyniki są spójne i przekonujące, choć badania ekspresji metodą RT-PCR mogłyby być poddane analizie ilościowej.

Dalej Autorka przeprowadziła analizę wpływu wyciszenia ekspresji badanych genów przy użyciu shRNA na migrację komórek grzebienia nerwowego *in ovo*. Na uznanie zasługuje wykorzystanie plazmidów z dość zaawansowanymi systemami Tol2 i Tet-ON, które umożliwiają odpowiednio integrację konstruktów z genomem oraz regulację ekspresji poprzez podanie deoksycykliny. Przedstawione wyniki sugerują, że wyciszenie ekspresji LamR zaburzało delaminację komórek grzebienia nerwowego z grzbietowej części cewy nerwowej, a zahamowanie ekspresji GSN prowadziło do zaburzeń w migracji komórek grzebienia nerwowego. Nie zaobserwowano natomiast znaczących zmian w delaminacji lub migracji komórek po wyciszeniu ekspresji ILK. Są to ciekawe obserwacje, choć zabrakło dodatkowych kontroli w



eksperymentach, a mianowicie zbadania skuteczności użytych shRNA w wyciszaniu ekspresji badanych genów.

Kolejne dwa rozdziały rozprawy poświęcone są badaniom nad migracją komórek grzebienia nerwowego w hodowanych eksplantach cewy nerwowej oraz rozwojowi aksonów neuronów czuciowych i towarzyszących im prekursorów komórek Schwanna pochodzących z hodowanych zwojów korzeni grzbietowych (DRG). W obu modelach badawczych zastosowano podobny schemat eksperymentalny.

Zbadano wpływ lamininy-1 podanej do pożywki hodowlanej lub użytej do pokrycia powierzchni hodowlanych na zdolności migracyjne komórek. Komórki były również stymulowane peptydami zawierającymi trzy biologicznie aktywne fragmenty lamininy-1 odpowiedzialne za wiązanie receptorów powierzchniowych. W powyższych warunkach testowano obecność trzech badanych białek ILK, LamR i GSN w homogenacie komórkowym oraz w pożywce hodowlanej przy zastosowaniu techniki western blot. Uzyskane wyniki uzupełniały systematyczne badania immunocytochemiczne, obrazujące lokalizację badanych białek w środku komórek oraz na ich powierzchni. Kolejne w serii doświadczeń były eksperymenty z zaburzeniem funkcji białek ILK, LamR i GSN, poprzez dodanie do pożywki hodowlanej przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom. W doświadczeniach tych badano zdolność komórek do migracji, ich morfologię, zdolność komórek do wytwarzania ognisk adhezyjnych oraz filopodiów. Co więcej, w systemie opartym na hodowanych DRG testowana była zdolność neuronów do ukierunkowanego rozwoju aksonów.

Ostatnia rycina w części rozprawy poświęconej wynikom przedstawia wyniki eksperymentów mających na celu scharakteryzowanie specyficzności i funkcjonalności przeciwciał użytych do zaburzenia funkcji badanych białek. Autorka wykazała, że używane przeciwciała przeciwko LamR, ILK i GSN są



wysoco specyficzne w technice western blot, w której wykrywane są zdenaturowane białka. Zablockowanie ILK przy użyciu przeciwciał zmniejszyło poziom fosforylacji białek sygnałowych Akt oraz GSK3. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko LamR zmniejszyło adhezję komórek, a przeciwciał na GSN wpływało na stosunek F-aktyny do G-aktyny w hodowanych DRG. Omawiana figura przedstawia ważne wyniki sugerujące specyficzność przeciwciał używanych w wielu eksperymentach opisanych w rozprawie. Podobne doświadczenia z blokowaniem funkcji badanych białek przy użyciu przeciwciał dodawanych do pożywki hodowlanej były wcześniej opisane w literaturze.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach sugerują, że Laminina-1 oraz peptyd IKAV (ale nie GRGDS i YIGSR) pełnią ważną funkcję w rozwoju obwodowego układu nerwowego wpływając na wiele procesów, w tym regulację adhezji i migrację komórek pochodzących z grzebienia nerwowego oraz DRG. Ponadto białka GSN, ILK oraz LamR są produkowane w komórkach biorących udział w formowaniu się obwodowego układu nerwowego – komórkach grzebienia nerwowego, neuronach czuciowych oraz prekursorach komórek Schwanna. Białka ILK i LamR są wykrywane zarówno wewnątrz, jak i na powierzchni komórek grzebienia nerwowego, podobnie jak GSN oraz ILK w komórkach pochodzących z DRG. Autorka wykazała również, że w obu systemach eksperymentalnych białko GSN jest wydzielane na zewnątrz hodowanych komórek. Przeprowadzone badania sugerują, że białka ILK, LamR i GSN pełnią ważne funkcje w rozwoju obwodowego układu nerwowego, wpływając na adhezje komórek, ich morfologię i zdolność do poruszania się. Uzyskane wyniki sugerują dodatkowo, że przeciwciała stosowane w celu zaburzenia funkcji ILK i LamR najprawdopodobniej blokują aktywność białek, które rozpoznają, a przeciwciała przeciwko GSN prawdopodobnie prowadzą do jej aktywacji.



Na uznanie zasługuje przeprowadzenie szeregu systematycznie wykonanych eksperymentów w trzech modelach badawczych. Szczególnie ciekawe i nowatorskie są doświadczenia dotyczące potencjalnych nieznanych funkcji wydzielniczej formy GSN, gdyż białko to jest głównie znane z regulacji cytoszkieletu aktynowego wewnątrz komórki. Również ciekawy jest fakt wykrycia białka ILK na powierzchni komórek, choć zazwyczaj obecne jest w cytoplazmie. Przy tak nieoczekiwanym wyniku dotyczącym ILK należałoby przeprowadzić więcej eksperymentów kontrolnych, które miałyby wykluczyć nieswoiste wiązanie się przeciwciał pierwszorzędowych na powierzchni komórek. Podobnie też użycie przeciwciał do eksperymentów funkcjonalnych powinno być wsparte większą ilością eksperymentów kontrolnych wykazujących swoiste oddziaływanie z badanymi białkami w warunkach, w których zachowana jest ich struktura. Ciekawe jest też czy Autorka użyła tych samych przeciwciał, które były wcześniej opisywane w literaturze, czy innych, lecz skierowanych przeciwko tym samym białkom. Przynajmniej teoretycznie można sobie wyobrazić, że dodanie dużych ilości niespecyficznych przeciwciał również mogłoby wpływać np. na adhezję komórek. Chciałbym więc zapytać, czy Autorka mogłaby zasugerować dodatkowe doświadczenia kontrolne, które zwiększyłyby zaufanie do użytych przeciwciał, a które być może z braku czasu nie mogły być wykonane w ramach przedstawionej rozprawy. Alternatywnym rozwiązaniem byłoby też przeprowadzenie doświadczeń potwierdzających funkcje badanych białek, które nie opierałyby się na zastosowaniu przeciwciał.

Dyskusja w rozprawie doktorskiej jest napisana w sposób zrozumiały i ciekawy. Autorka omawia własne wyniki dotyczące znaczenia lamininy-1 oraz jej trzech biologicznie aktywnych fragmentów w rozwoju obwodowego układu nerwowego kury w kontekście wcześniejszych badań prowadzonych z użyciem różnych systemów eksperymentalnych. W dalszej części dyskusji zamieszczone są trzy rozdziały poświęcone roli każdego z badanych białek.



Dyskusja jest dość obszerna i prowadzona w sposób systematyczny z omówieniem poziomu ekspresji, lokalizacji i funkcji badanych białek w komórkach grzebienia nerwowego oraz komórkach pochodzących z DRG. Dla białka ILK Autorka poświęca też uwagę możliwym mechanizmom jego egzocytozy. Tu być może wkraść się błąd, ponieważ wiązanie do PIP3 nie może uzasadniać obecności białka na zewnętrznej stronie błony, gdyż lipidy te znajdują się po jej cytoplazmatycznej stronie. Być może w dyskusji warto byłoby też poruszyć wątek alternatywnych szlaków sekrecyjnych, które mogą regulować wydalanie na zewnątrz komórek białek nieposiadających sekwencji sygnałowej lub domen transbłonowych.

Podsumowanie

Autorka podjęła ważny i ciekawy temat badawczy. W badaniach zastosowano trzy systemy eksperymentalne oraz szereg technik badawczych. Doświadczenia doprowadziły do uzyskania dużej ilości wyników, które przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów leżących u podstaw rozwoju obwodowego układu nerwowego. Warto podkreślić, że wg otrzymanego wykazu Autorka jest współautorem 10 publikacji naukowych, z czego w trzech występuje jako wiodący autor. Dorobek ten jest imponujący. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska 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 późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Wrocławskim o dopuszczenie Pani mgr Ewy Mrówczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Tomasz J. Prószyński

Kierownik Laboratorium Synaptogenezy

Strona 8 z 8

