

Dr hab. Edyta Kościańska
Zakład Biologii Integratywnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-740 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Kulczyńskiej
„Molekularne podstawy mechanizmu niedokrwistości wynikające z dominującej
mutacji CDA w genie czynnika transkrypcyjnego Krüppel-like factor 1”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Klaudii Kulczyńskiej została wykonana pod kierunkiem pani prof. UAM dr hab. Mirosławy Siateckiej, w Zakładzie Genetyki Instytutu Biologii Eksperymentalnej, na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Krüppel like factor 1 (KLF1) jest jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, niezbędnych w trakcie powstawania i dojrzewania erytrocytów, a jego charakterystyczną cechą jest obecność domeny wiążącej DNA zbudowanej z trzech palców cynkowych. Mutacje dominujące w KLF1, które prowadzą do ciężkich anemii u myszy i ludzi zlokalizowane są w drugim palcu cynkowym. W ocenianej pracy doktorskiej mgr Klaudia Kulczyńska badała mechanizm będący podłożem anemii dyserytropoetycznej, wynikającej z mutacji CDA (E325K) w genie *KLF1* u ludzi (anemia dyserytropoetyczna CDA typu IV). Ze względu na niewielką ilość opisanych pacjentów z CDA typu IV oraz brakiem opisanego przypadku w Polsce, Doktorantka w dużej mierze oparła swoje badania o system wykorzystujący stabilne linie komórkowe z indukowaną ekspresją CDA-KLF1. Badania dotyczące mutacji CDA w genie *KLF1* są niezmiernie ważne, ponieważ taka mutacja prowadzi nie tylko do utraty funkcji białka ale powoduje też nabywanie nowych cech. Problematyka badawcza przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowi kontynuację badań nad rolą KLF1 w namnażaniu i różnicowaniu czerwonych krwinek, które z dużym powodzeniem są od wielu lat prowadzone przez promotora dysertacji - panią prof. Siatecką. Badania Doktorantki obrazują molekularne konsekwencje, jakie wywołuje podstawienie ewolucyjnie konserwatywnego kwasu glutaminowego lizyną w obrębie ludzkiego czynnika transkrypcyjnego KLF1. Podjęta przez nią tematyka badawcza wpisuje się w nurt interesujących i bardzo ważnych badań dotyczących procesu erytropoezy oraz nieprawidłowości hematopoetycznych i znajduje głębokie uzasadnienie.

Ocena formalna i merytoryczna

Rozprawa doktorska pani Klaudii Kulczyńskiej liczy 148 stron, zawiera 32 ryciny, 33 tabele oraz 144 pozycje literaturowe. Jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i graficznym. Została napisana w układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich z rozdziałami w następującej kolejności: tytuł pracy, spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim

i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura, spis tabel, spis rycin oraz załącznik, który stanowi publikacja obejmująca wyniki rozprawy doktorskiej.

We WSTĘPIE do rozprawy Autorka na podstawie przeglądu danych literaturowych przedstawia wybrane zagadnienia związane z procesem erytropoezy u ssaków oraz sposoby regulacji procesu erytropoezy na poziomie transkrypcyjnym. Bardzo szczegółowo charakteryzuje czynnik transkrypcyjny KLF-1, jego budowę domenową i rolę w erytropoezie. Ponadto, dokładnie omawia mutacje w genie KLF1 związane z zaburzeniami oraz chorobami hematologicznymi. W końcowej części tego rozdziału Autorka przedstawia metody stosowane w badaniach oddziaływań pomiędzy białkiem a nieznanym motywem DNA. Zwraca uwagę na to jak ważne jest poznanie sekwencji rozpoznawanych i wiązanych przez czynniki transkrypcyjne, co umożliwia określenie ich genów docelowych, a w konsekwencji ich funkcji w organizmie. Przedstawione we wstępie informacje opierają się na aktualnym stanie wiedzy i są przydatne do przeanalizowania wyników badań eksperymentalnych wykonanych przez Doktorantkę. Ponadto, pozwalają zrozumieć wybór metod wykorzystanych w niniejszej pracy do określenia motywu DNA rozpoznawanego przez mutantą CDA-KLF1, który do tej pory nie został wyznaczony. Rozdział „Wstęp” został bardzo dobrze przygotowany, napisany jest ładnym językiem i jest bogato ilustrowany, co ułatwia zrozumienie tekstu. Liczy 25 stron, zawiera 7 rycin i 2 tabele.

Po wprowadzeniu teoretycznym Doktorantka jasno określa CEL PRACY, którym było poznanie molekularnych podstaw mechanizmu powstawania ciężkiej niedokrwistości wywołanej dominującą mutacją w obrębie genu *KLF1* u ludzi. W świetle przedstawionego stanu wiedzy cel ten jest w pełni uzasadniony. Aby zrealizować cel pracy doktorskiej, jej Autorka wyznaczyła trzy etapy pracy: (1) zidentyfikowanie sekwencji DNA rozpoznawanej i wiązanej przez mutantą CDA-KLF1, (2) charakterystykę nowo zidentyfikowanego motywu DNA, (3) powiązanie uzyskanych danych z występującym u pacjentów z CDA typu IV fenotypem. Każdy z tych etapów obejmuje dwa szczegółowe zadania badawcze.

W kolejnym rozdziale Doktorantka opisuje wykorzystane w pracy MATERIAŁY a następnie METODY. Zaplanowane badania zostały wykonane przy użyciu różnorodnych metod eksperymentalnych, w tym szeregu badań *in vitro*, eksperymentów na liniach komórkowych oraz bardzo zaawansowanych analiz bioinformatycznych. Warto podkreślić, że eksperyment *in vitro* selekcji wykonano stosując metodę CASTing (ang. *Cyclic Amplification and Selection of Targets*), którą połączono z sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS) z użyciem platformy Ion Torrent. Doktorantka dokładnie opisuje wszystkie zastosowane procedury eksperymentalne, przy czym opis ten jest klarowny i wyczerpujący, co świadczy o jej dużej wiedzy w zakresie wykonywanych eksperymentów.

W zasadniczym rozdziale pracy (liczącym 42 strony) Doktorantka przedstawia WYNIKI swoich badań. W pierwszym etapie pracy, pani Klaudia Kulczyńska badała preferencje dominujących mutantów białka KLF1 (Nan-KLF1 i CDA-KLF1) do rozpoznawania 9-nt sekwencji DNA. Przeprowadziła kilka eksperymentów opóźnionej migracji kompleksów białko:DNA w natywnym żelu poliakrylamidowym (EMSA). Wykorzystała całkowite ekstrakty białkowe z komórek COS-7, uprzednio transfekowanych wektorami ekspresyjnymi zawierającymi sekwencję wariantów KLF1 (WT, Nan lub CDA). Jako miejsca wiązania wykorzystała znane sekwencje pochodzące z genów docelowych białka WT-KLF1, różniące się 5. nukleotydem, bezpośrednio wiązany przez podstawioną w wyniku mutacji CDA lizynę. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazują, że sekwencja z guaniną w 5. pozycji jest rozpoznawana i wiązana jedynie przez mutantą CDA-KLF1, zaś pozostałe warianty czynnika transkrypcyjnego KLF1 nie rozpoznają i nie wiążą

takiej sekwencji. Kolejnym etapem pracy było wyznaczenie optymalnej sekwencji konsensusowej DNA wiązanej przez mutant CDA-KLF1. W tym celu Doktorantka wykorzystała metodę *in vitro* selekcji w połączeniu z sekwencjonowaniem nowej generacji (CASTing-seq), tak aby uzyskać wysoce istotny statystycznie motyw DNA. Proces identyfikacji sekwencji konsensusowej dla CDA-KLF1 rozpoczęła od otrzymania oczyszczonych, rekombinowanych wariantów białka KLF1 (WT, Nan i CDA). Po sprawdzeniu, że rekombinowane domeny placów cynkowych białek WT i CDA-KLF1 są funkcjonalne i prawidłowo sfałdowane, wykorzystała je w eksperymencie CASTing-seq (mutant Nan-KLF1 został na tym etapie wykluczony z dalszych analiz, ponieważ jego sekwencja konsensusowa została w międzyczasie opublikowana). Doświadczenie CASTing-seq Doktorantka wykonała dwukrotnie z różnymi bibliotekami losowych oligonukleotydów - z biblioteką zawierającą 12 losowych nukleotydów oraz po skróceniu obszaru losowych oligonukleotydów do 9 nukleotydów. Wykorzystanie technologii Ion Torrent do sekwencjonowania oligonukleotydów bogatych w powtórzenia tego samego nukleotydu niesie pewne ograniczenia. Dzięki zastosowaniu nowej biblioteki losowych oligonukleotydów Doktorantka uzyskała poprawę jakości otrzymywanych wyników i po odpowiedniej analizie bioinformatycznej wyznaczyła motyw DNA optymalny dla mutantu CDA-KLF1: 5'-NGG-GGG/T-G/TG/TG/T-3'. Następnym etapem pracy była eksperymentalna weryfikacja i szczegółowa charakterystyka wyznaczonego motywu DNA. W tym celu Doktorantka wykorzystała zarówno samą domenę wiążącą DNA, trzy palce cynkowe, jak i pełnej długości białko. W obu przypadkach potwierdziła oddziaływanie z sekwencjami tworzącymi motyw uzyskany w CASTing-seq. Ponadto, badała specyficzność rozpoznawania tych sekwencji przez warianty białka KLF1 różniące się aminokwasową pozycją 339. Wykazała, że CDA-KLF1 preferuje guaninę w środkowej pozycji (jest to nukleotyd bezpośrednio wiązany przez lizynę w pozycji 339 sekwencji aminokwasowej CDA-KLF1). Następnie w kolejnych eksperymentach pokazała, że pozycje 7, 8 i 9 rozpoznawane przez pierwszy palec cynkowy KLF1 są zdegenerowane w motywie wiązania DNA dla CDA-KLF1, a także że degeneracja dotyczy również pozycji 6. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że pozycja piąta motywu DNA dla CDA-KLF1 musi zawierać guaninę, pozycja szósta może zawierać guaninę lub tyminę, natomiast pozycje siódma, ósma i dziewiąta motywu DNA, wiązane przez pierwszy palec cynkowy CDA-KLF1, muszą zawierać przynajmniej jedną guaninę lub tyminę.

Kolejnym etapem weryfikacji miejsca konsensusowego dla CDA-KLF1 była analiza funkcjonalna w komórkach K562, w których endogenne KLF1 nie ulega ekspresji. Aby badać aktywność transkrypcyjną wariantów białka KLF1 względem miejsc wiązania uzyskanych podczas CASTing-seq tworzących konsensus dla CDA-KLF1, Doktorantka przygotowała system oparty o geny reporterowe lucyferazy, złożony z trzech elementów: (1) sześciokrotnie powtórnego motywu wiązania dla KLF1, (2) minimalnego fragmentu z promotora kinazy tymidynowej (TK Mini) oraz (3) genu kodującego lucyferazę. Testy lucyferazowe są wygodnym narzędziem rutynowo stosowanym w biologii molekularnej do badań funkcjonalnych, a linie komórkowe są dobrym modelem eksperymentalnym. W przypadku badania aktywności transkrypcyjnej KLF1 niezmiernie ważny był wybór promotora oraz odpowiednio dobrane kontrole, co zostało uwzględnione i właściwie zaplanowane. Analizie funkcjonalnej w systemie reporterowym poddano sekwencje oligonukleotydowe, które wcześniej zostały zwalidowane za pomocą analiz *in vitro*. Komórki K562 transfekowano rosnącą ilością wektora kodującego warianty KLF1. Uzyskane wyniki pokazują, że badane sekwencje DNA, wyselekcjonowane w eksperymencie CASTing-seq dla białka CDA-KLF1, mogą funkcjonować jako miejsca promotorowe dla tego zmutowanego czynnika transkrypcyjnego. Miejsca te muszą zawierać w środkowej pozycji guaninę, a na 3' końcu motywu (pozycja 7, 8, 9) muszą zawierać

przynajmniej jedną guaninę lub tyminę. Pozostałe dwa warianty białka KLF1 nie wykazują aktywności transkrypcyjnej względem badanych miejsc.

Ostatnim etapem pracy doktorskiej było poznanie genów docelowych aktywowanych przez mutant CDA-KLF1. Na podstawie analizy bioinformatycznej Doktorantka wykazała, że nowy motyw wiązania dla CDA-KLF1 znajduje się w ponad 20 tysiącach miejsc regulatorowych genów, prawdopodobnie ze względu na znaczny stopień degeneracji. Wśród genów zawierających badany motyw DNA znalazły się geny docelowe dla białka WT-KLF1. Kilka z nich zostało wybranych do dalszych analiz. Do badania endogennego poziomu ekspresji wybranych genów techniką RT-qPCR, Doktorantka wykorzystała stabilne linie komórkowe K562 z indukowaną ekspresją WT lub CDA. Wykazała, że mutant CDA-KLF1 ma zdolność do aktywowania transkrypcji genów poprzez nowo wyznaczony motyw wiązania DNA, a także po raz pierwszy pokazała, że CDA-KLF1 aktywuje geny z puli genów docelowych dla białka WT-KLF1.

Oceniając tę część pracy chciałabym podkreślić, że wszystkie wyniki przeprowadzonych badań są spójne, zostały szczegółowo przeanalizowane i klarownie przedstawione z wykorzystaniem ciekawych rycin, schematów i wykresów, co znacznie ułatwia ich interpretację oraz podążanie za tokiem myślenia Autorki. Należy również zauważyć, że w każdym eksperymencie Doktorantka pamiętała o odpowiednich kontrolach, które zapewniają poprawność wykonania eksperymentu i jego wiarygodność.

Rozdział DYKUSJA jest napisany dojrzałe i rzeczowo. Jest to zdecydowanie najlepsza część rozprawy doktorskiej. Autorka analizuje wyniki i wszystkie etapy pracy, dzięki którym wyznaczyła konsensusowy motyw DNA rozpoznawany i wiązany przez mutant CDA-KLF1, a także omawia znaczenie swoich badań. Uzyskane wyniki krytycznie zestawia z danymi literaturowymi i właściwie przedyskutowuje, co świadczy o jej doskonałej orientacji w badanej dziedzinie. Zadania badawcze, jakie wyznaczyła sobie mgr Klaudia Kulczyńska były trudne do zrealizowania. Doktorantka nie dysponowała materiałem badawczym od pacjentów, jednakże umiejętnie wykorzystała stabilne linie komórkowe z indukowaną ekspresją badanych białek. Podobnie, z powodzeniem wykorzystała metodę CASTing-seq optymalizując bibliotekę losowych oligonukleotydów. W trakcie realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane wyniki podobnych badań tego samego motywu DNA. Zostały one uzyskane metodą ChIP-seq w modelu komórkowym wygenerowanym z mysiej linii erytroidalnej pozbawionej genu KLF1. Opublikowany przez innych autorów konsensus jest tylko częściowo zgodny z motywem jaki uzyskała Doktorantka; różni się piątą pozycją 9-nt motywu i nie jest zdegenerowany na 3' końcu DNA. Doktorantka krytycznie porównuje swoje wyniki z wynikami otrzymanymi po zastosowaniu innych metod. Wskazuje różnice i umiejętnie wyjaśnia przyczyny rozbieżności wyników. Zwraca uwagę na problem z analizą bioinformatyczną oraz na to jak ważne są dodatkowe etapy walidacji uzyskanych wyników innymi metodami. Tę część rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Podobnie wysoko oceniam krótki, ostatni rozdział WNIOSEK, w którym Doktorantka w syntetycznej formie przedstawia najważniejsze wyniki swojej pracy oraz ich znaczenie dla poznania mechanizmu powstawania anemii dyserytrocytowej typu IV u ludzi.

Pytania i uwagi krytyczne

1. Badania z wykorzystaniem genów reporterowych lucyferazy Doktorantka nazywa testami *in vivo*. Użycie terminu *in vivo* sugeruje badania w żywym organizmie, przy czym najczęściej tak określa się badania na zwierzętach. Badania wykorzystujące linie komórkowe są nadal badaniami wykonywanymi

w naczyniach laboratoryjnych, czyli raczej *in vitro*. Wiem, że użycie właściwego określenia budzi wiele kontrowersji, dlatego sugerowałabym takie analizy przedstawiać bardziej opisowo.

2. Chciałabym zapytać o stosowane linie komórkowe, czym był podyktowany wybór linii COS-7 i czy endogenny KLF1 ulega w tych komórkach ekspresji. Czy przy wyborze kierowano się tylko wydajnością transfekcji i/lub łatwością pozyskania ekstraktów białkowych?
3. W rozdziale „Wyniki” opis badań wykorzystujących ekstrakty białkowe nie jest do końca jasny. Czasami trzeba się domyślać czy opisane wyniki zostały uzyskane dla pełnej długości białka czy rekombinowanej domeny wiążącej DNA.
4. W opisie przygotowania wektorów plazmidowych zabrakło mi prostego schematu, który ułatwiłby zrozumienie dość zawiłego sposobu klonowania, zwłaszcza w przypadku plazmidów reporterowych.
5. Z ciekawości chciałabym zapytać o specyficzność i powtarzalność wyników uzyskanych metodą EMSA. Czy intensywność sygnału można rozpatrywać w kategoriach ilościowych i porównywać siłę wiązania białek (o tym samym stężeniu) z różnymi dsDNA? Jaka jest powtarzalność uzyskiwanych tą metodą wyników? Czy np. żel na Rycinie 20 (str. 90, po lewej) i żel na Rycinie 10A (str. 74, trzeci) to ten sam wynik czy taki sam? Proszę również o skomentowanie „słabszego” oddziaływania pomiędzy CDA-KLF1 a sekwencjami zdegenerowanymi na końcu 3’ (GCG, CAT i TCC) na Rycinie 24A (str. 98).
6. Analiza bioinformatyczna miejsc regulatorowych genomu człowieka wykazała około 20 tysięcy potencjalnych miejsc wiązania dla CDA-KLF1. Z tego względu, do dalszych analiz zostały wybrane takie, które zawierają miejsca wiązania zarówno dla czynnika transkrypcyjnego typu dzikiego jak i dla mutantu CDA. Chciałabym prosić o komentarz na temat potencjalnych genów neomorficznych. Czy zostały wykonane albo są planowane dalsze badania genów docelowych, unikalnych dla mutantu CDA-KLF1?
7. W opracowaniu rozprawy doktorskiej brakuje mi wyraźnego określenia perspektyw dalszych badań. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o rozwinięcie tego wątku i stosowny komentarz.
8. Proszę również o komentarz na temat możliwości wykorzystania linii komórkowych z indukowaną ekspresją białka KLF1 do dalszych badań nad mechanizmem anemii CDA typu IV, a także na temat możliwości jakie daje użycie iPSCs wyprowadzonych od pacjentów (oprócz analiz transkryptomu).
9. Autorce zdarzają się błędy stylistyczne, przejęzyczenia i drobne pomyłki, które nie mają istotnego znaczenia. Muszę jednak zwrócić uwagę na liczne błędy interpunkcyjne, zwłaszcza na nadmierne i błędne używanie przecinka i dwukropka, co trochę razi i czasem przeszkadza w płynnym czytaniu.
10. Błędne odniesienia do rycin i tabel: str. 48 - punkt 6.2.2 nie 4.2.2, str. 50 - Tabela 3 nie tabela 5, str. 50 - Metody 6.2.3 nie 4.2.3, str. 52 – Tabela 12 nie Tabela 11, str. 62 - Tabela 26 nie Tabela 20 (bufor ESB i bufor wiążący), str. 79 – Metody punkt 6.5.1 nie 4.5.1, str. 110 – Metody punkt 6.11 nie 4.11. Przykłady innych pomyłek i niejasności: RPMI 1470, hodowla baterii, place cynkowe, heksametry, „...3’ końcowa degeneracja 9 [...] Dotyczy ona trójki nukleotydów” (str. 92), Rycina 278A (str. 103), odniesienie do Ryciny 29 C (str. 106) a jest tylko Rycina 29 A i B (str. 106). W Metodach na str. 43 napisano, że komórki COS-7 hodowano w podłożu płynnym, podczas gdy są to komórki adherentne.

Podsumowanie

Głównym osiągnięciem mgr Klaudii Kulczyńskiej jest wyznaczenie i charakterystyka motywu DNA, rozpoznawanego i wiążanego przez zmutowaną formę czynnika transkrypcyjnego CDA-KLF1, który wykazuje zdolność do aktywowania transkrypcji genów. Zdefiniowany motyw zawiera guaninę w piątej pozycji i jest zdegenerowany na końcu 3'. Uzyskane wyniki są spójne i logiczne, zostały również rzetelnie opracowane i wnikliwie przedyskutowane. Mają dużą wartość poznawczą i niewątpliwie stanowią solidną podstawę do dalszych badań dotyczących molekularnego mechanizmu dziedzicznej anemii dyserytropoetycznej typu IV u ludzi. W związku z powyższym, recenzowaną rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie, a przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze w niczym nie umniejszają tej oceny.

Do rozprawy doktorskiej została dołączona publikacja (*Mol Cell Biol.*, 2020), która obejmuje wyniki badań opisanych w ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej. Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji, co świadczy o tym, że pełniła rolę wiodącą w przeprowadzonych badaniach. Publikacja była poddana wnikliwej analizie przez niezależnych recenzentów, a fakt opublikowania w dobrym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym wskazuje na jej wysoką wartość naukową. Moja rola jako recenzenta sprowadza się do oceny manuskryptu polskojęzycznego będącego autorskim opracowaniem Doktorantki, pokazującym jej zasób wiedzy, umiejętności formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym. Recenzowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko. Ponadto, chciałabym podkreślić, że mgr Klaudia Kulczyńska jest także współautorką dwóch innych publikacji oraz kierownikiem Grantu Dziekana Wydziału Biologii UAM. Taki dorobek świadczy o tym, że pani mgr Klaudia Kulczyńska osiągnęła dużą sprawność eksperymentalną, a także posiada rozległą wiedzę i umiejętności krytycznej analizy danych, potrzebne do prowadzenia samodzielnych badań.

Wniosek końcowy

Oświadczam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Klaudii Kulczyńskiej w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Wysockiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pani mgr Klaudii Kulczyńskiej do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim. Jednocześnie składam wniosek do Wysockiej Rady o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą za jej istotną wartość poznawczą, rzetelne przeprowadzenie badań i opublikowanie wyników w renomowanym czasopiśmie naukowym.

Edyta Kościńska

Poznań, 8 kwietnia 2020 r.

Edyta Kościńska