

Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska

ul. Strzeszyńska 32

60-479 Poznań

e-mail:

jadwiga.jaruzelska@igcz

.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. " Molekularne podstawy mechanizmu niedokrwistości wynikające z dominującej mutacji CDA
w genie czynnika transkrypcyjnego Krüppel-like factor 1"

Dla: Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza

Doktorantka: Pani mgr Klaudia Kulczyńska

Badania molekularnych mechanizmów chorób stanowią kluczowy kierunek poszukiwań w genetyce człowieka ponieważ dostarczają danych o potencjalnym wykorzystaniu do opracowania przyszłych terapii. Dlatego wartość rozprawy Pani mgr Klaudii Kulczyńskiej zmierzającej do wyjaśnienia, w jaki sposób wybrana mutacja genu kodującego czynnik transkrypcyjny KLF1, zaburza homeostazę komórek krwi i prowadzi do ciężkiej postaci niedokrwistości (CDA), trudno przecenić. Zastosowanie bardzo profesjonalnego warsztatu badawczego pozwoliło udowodnić że badana mutacja powoduje zmianę specyficzności w rozpoznaniu motywu DNA przez czynnik transkrypcyjny KLF1. W efekcie, domena palców cynkowych tego czynnika traci powinowactwo do dzikiego motywu wiązania DNA a jednocześnie zyskuje powinowactwo do motywów o odmiennej sekwencji i w ten sposób aktywuje inne geny.

Rozprawa została przygotowana w oparciu o bogaty warsztat badawczy. Każdy etap badań został wykonany bardzo profesjonalnie i opatrzony właściwymi kontrolami. Rozprawa jest pod tym względem modelowa. Dzięki staranności w wykonywaniu doświadczeń, wyprowadzone wnioski są przekonujące a jednocześnie ważne. Jestem pod wrażeniem spójności wyników zawartych w rozprawie. Nic dziwnego, że badania te zostały opublikowane w wysokiej klasy

czasopiśmie *Molecular and Cellular Biology* i wyróżnione mianem *Spotlight MCB*, jako artykuł o dużym znaczeniu w publikowanym numerze. Wartość tej pracy polega również na tym, że otwiera niezwykle interesujące perspektywy dalszych badań. Na pewno ważną rolę w osiągnięciu zaplanowanych celów odegrała Pani Promotor, prof. Mirosławy Siateckiej, z uwagi jej wysokie kompetencje oraz międzynarodową pozycję naukową w dziedzinie której dotyczy rozprawa.

Rozprawa tłumaczy między innymi, dlaczego w danej chorobie uwarunkowanej genetycznie, zespołowi nieprawidłowości danego układu mogą towarzyszyć nieprawidłowości innych. Zgodnie z niniejszą rozprawą może to dotyczyć przynajmniej genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Jako poszukiwacza genów ważnych dla rozwoju płciowego człowieka, szczególnie zainteresowały mnie nieprawidłowości rozwoju płciowego współwystępujące u trzech, spośród 7 pacjentów z cierpiących na CDA. Autorka słusznie sugeruje, że mogą być spowodowane zmianą specyficzności w rozpoznawaniu motywów DNA w genomie.

Interesujące dla mnie jako osoby nie zajmującej się transkrypcją jest współwystępowanie motywu dzikiego oraz motywu rozpoznawanego przez zmutowany KLF1, w sąsiedztwie tego samego genu, co potencjalnie umożliwia wpływ na ten gen zarówno dzikiego jak zmutowanego KLF1. Udowodnienie takiego wpływu może być utrudnione jeśli wziąć pod uwagę odmienne stany chromatyny na każdym etapie erytropoezy.

Na pewno pozytywny wpływ na zdrowie pacjentów obarczonych CDA ma obecność prawidłowego allelu, stanowiącego matrycę do syntezy prawidłowego KLF1, podczas gdy KLF1 zmutowany nie konkuruje z prawidłowym o wiązanie z motywem DNA typu dzikiego.

Omówienie poszczególnych części rozprawy:

Streszczenie

W pierwszym akapicie (str. 5) zdanie „Opisano wiele mutacji w obrębie ludzkiego genu *KLF1*, które powodują szerokie spektrum fenotypów od łagodnych do patologicznych” winno brzmieć: „Opisano wiele mutacji w obrębie ludzkiego genu *KLF1*, które powodują szerokie spektrum fenotypów patologicznych od łagodnych do ciężkich”. W streszczeniu angielskim nieprawidłowe jest sformułowanie „*My research was found that...*”

Wstęp

Wstęp został bardzo ciekawie napisany. Doceniłam szczególnie akapity opisujące rodzinę czynników transkrypcyjnych KLF. Ta część zawiera klarowne schematy, np. Rycina 2, które ułatwiły mi podążanie za tekstem. Bardzo pomocna jest ostatnia część opisująca główne metodologie zastosowane w rozprawie i tłumacząca ich zasady. Niestety opis pierwotnej oraz definitywnej fali erytropoezy (str 9/10) nie jest jasny.

Zwróciłam uwagę na kilka nieprecyzyjnych sformułowań:

1. Autorka kilkakrotnie użyła pojęcia „brak allelu” podczas gdy z kontekstu wynika, że ma na myśli brak ekspresji. Dla genetyka „brak allelu” oznacza delecję genu ponieważ allel to odmiana genu a nie jego produktu. Np. na stronie 15 Wstępu znajduje się zdanie: „W 2015 roku opisano pierwszy, i jak do tej pory jedyny, przypadek żyjącego człowieka bez obu alleli genu *KLF1*, jednak z rozwiniętą ciężką anemią hemolityczną bez sferocytozy, z obecnością erytroblastów w krwi obwodowej i żółtaczką (Magor *i in.* 2015).” Sprawdziłam w cytowanej pracy, że ten pacjent posiadał oba allele choć oba nieczynne na skutek mutacji (*compound heterozygosity for null mutations in KLF1*).
2. Wielokrotnie nieprawidłowo zostało użyte pojęcie „konserwatywne palce cynkowe” lub „konserwatywna pozycja”. Ten błąd jest niestety bardzo powszechny. Konserwatywność odnosi się wyłącznie do typu substytucji aminokwasowej. Jeśli dany aminokwas zostaje zastąpiony innym ale o podobnych właściwościach (np. mutacja E339D Nan-KLF1 myszy), nazywa się ją substytucją „konserwatywną” / „*conservative*”. Jeśli natomiast dany aminokwas zostaje zastąpiony aminokwasem o właściwościach odmiennych (mutacja E325K CDA-KLF1) taka substytucja „konserwatywną” nie jest. Ponadto, jeśli mamy na myśli zachowawczość ewolucyjną genu, białka, domeny białka a nawet pozycji aminokwasowej należy stosować pojęcie „zakonserwowana” / „*conserved*”. Warto podkreślić, że w załączonym artykule opublikowanym w MCB którego Pani Kulczyńska jest pierwszym autorem, pojęcie to zostało użyte prawidłowo.
3. Wielokrotnie nieprawidłowo zostało użyte pojęcie „wariant”. Dla genetyka wariant to odmiana genu lub białka która różni się od genu/białka typu dzikiego. W rozprawie wariantami są jedynie geny/białka CDA-KLF1 oraz NaN-Klf1, natomiast nie jest nim białko WT-KLF1.

Materiały i Metody

Moją uwagę przykuwa mnogość podejść metodologicznych zastosowanych w rozprawie, w tym analizy bioinformatyczne. O ile wiem, większość doświadczeń Pani Kulczyńska wykonała sama. Zwraca również uwagę fakt, że tylko trzy osoby figurują w liście autorów artykułu opublikowanego w MCB, co dodatkowo dowodzi ogromnego wkładu Autorki w powstanie publikacji.

Moje krytyczne uwagi są następujące:

1. Opis znakowania dwuniciowych oligonukleotydów z zastosowaniem fragmentu Klenowa polimerazy DNA I nie jest niejasny. Brak wzmianki jaki był primer w tej reakcji.
2. W Tabelach przedstawiających skład różnych roztworów należałoby podawać stężenia końcowe a nie objętość roztworu macierzystego który dodawano: Tabela 9, 21, 23, 24, 28. (Ponadto ul oznacza objętość, podczas gdy „ilość” jest pojęciem nieprecyzyjnym).

3. Czy w zdaniu na str. 61 jest zdanie „Z uzyskanych danych z trzech powtórzeń w tryplikatach wyliczano średnią i odchylenie standardowe”. Czy chodzi tutaj o trzy powtórzenia z których każde zawierało 3 powtórzenia tzw., techniczne”?

Wyniki

Bardzo doceniłam, że każda część wyników została poprzedzona krótkim wprowadzeniem wyjaśniającym dlaczego dane podejście badawcze było ważne. Wyniki są niezwykle ciekawe i bardzo spójne. Są przekonujące również dlatego, że bardzo starannie dobierano kontrole i na każdym etapie badań sprawdzano funkcjonalność przygotowanych narzędzi molekularnych.

Moje uwagi krytyczne są następujące:

1. W Rycinie 12 nie wiadomo dokładnie co oznaczają kolejne frakcje po cieciu TEV, odmienne warunki cięcia, kolejne płukania? Brak wyjaśnienia w opisie tej ryciny.
2. Pojęcie „zimny oligonukleotyd” jest żargonowe, należy użyć słowa „nieznakowany radioaktywnie”.
3. W opisie Ryciny 22 zamiast „pomiedzy wzrastająca ilością” należy użyć „pomiedzy wzrastającym stężeniem”.
4. W opisie Ryciny 23 Autorka miała na myśli prawdopodobnie „guaninę” a nie „guanidynę”.
5. Na str. 101 u dołu: Czy nie lepiej zamiast „negatywnie pozytywne wyniki” użyć „fałszywie pozytywne wyniki”?
6. Na str. 103 Rycina 28A a nie 278A.
7. Zamiast „eksprymowany” lepiej zastosować pojęcie „ulegający ekspresji”.
8. Na str. 73 „Rycina 10C”. Nie powinno się opisywać ryciny począwszy od C, zawsze od A.

Dyskusja

Wiele fragmentów dyskusji jest bardzo ciekawych i wartościowych, świadczących o dobrej znajomości tematu, np. dyskusja wyników grupy australijskiej które zostały opublikowane w trakcie wykonywania rozprawy.

Autorka dyskutuje kwestie w takiej kolejności w jakiej pojawiały się wynikach. Alternatywnie dyskusja mogłaby zaczynać się od wyniku najważniejszego. Sprawy warsztatowe mogłyby stanowić uzupełnienie dyskusji nad kluczowym wynikiem.

1. Na str. 117 tytuł podrozdziału Dyskusji „*Motywy DNA dla mutantu CDA-KLF1 różni się nie tylko w pozycji 5. ale w obrębie całej sekwencji od motywów dla WT-KLF1 i Nan-KLF1 go motywu DNA*” jest niezręczny.

2. Na str. 123 zostało użyte sformułowanie „jąder męskich” podczas gdy jądra są męskie z natury rzeczy. Należy napisać po prostu „jąder” albo „gonad męskich”.

3. Życzyłabym sobie by Pani Kulczyńska w czasie obrony wyjaśniła pojęcie „haploniewystarczalność”. Ponadto, sugerowałabym używania w to miejsce pojęcia haploinsuficjencja.

Drobne uwagi:

1. Tytuły nigdy nie są zakończone kropką.

2. Wykaz skrótów byłby łatwiejszy do wykorzystania, gdyby był alfabetyczny. Brak w nim wyjaśnienia skrótu TCEP.

3. Bardzo często zamiast pojęcia „liczba” Autorka stosuje pojęcie „ilość”.

4. Pewne wyrażenia w wielu zdaniach mają składnię angielską, np. „*in vitro* selekcja”, „*in vitro* ewolucja”, „motywy GC-bogate” zamiast „selekcja *in vitro*”, „ewolucja *in vitro*”, „motywy bogate w GC”.

5. Natrafiłam na dużą liczbę tzw. „literówek”.

Wniosek końcowy

Rozprawę przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Uważam ją za bardzo wartościową i wnoszącą ważne dane do dziedziny której dotyczy. Ponadto otwiera ciekawe perspektywy dalszych badań. Została opublikowana w wysoce cenionym czasopiśmie *Molecular and Cellular Biology*. Ponadto Pani Kulczyńska prezentowała wyniki rozprawy na konferencjach międzynarodowych. Chciałabym podkreślić jej wysokie kompetencje w wielu technikach biologii molekularnej. Stanowi to świetne przygotowanie by kontynuować pracę naukową. Rozprawa bez wątpienia spełnia formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim. Z powyższych powodów z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Kulczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.