

Prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk

Wrocław, 31.12.2013 r.

Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

Opinia o dysertacji doktorskiej mgr Justyny Koryckiej pt.

„Identyfikacja produktów genów ZDHHC w komórkach hematopoetycznych oraz w komórkach nowotworowych pochodzenia hematopoetycznego i nabłonkowego. Wpływ białek DHHC na cykl komórkowy komórek erytroidalnych”

Przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr Justyny Koryckiej posiada typowy układ, składając się z obszernego „Wstępu” (25 stron), „Założeń i celu pracy” (1,5 strony), „Materiałów i metod” (17 stron), bardzo obszernych „Wyników” (38 stron), „Dyskusji” (12 stron), „Podsumowania” (1,5 strony) i „Bibliografii”, zawierającej, oprócz 225 pozycji bardzo współczesnego piśmiennictwa cytowanego w dysertacji, także 3 własne publikacje Doktorantki w bardzo dobrych czasopismach, zgłoszenie patentowe dotyczące zestawu starterów użytych w pracy oraz doniesienie zjazdowe.

Autorka bardzo ambitnie podjęła nowatorski temat ekspresji genów ZDHHC kodujących cysteinowe S-palmitoilotransferazy zawierające motyw asparaginian-histydyna-histydyna-cysteina (DHHC) w komórkach hematopoetycznych i nabłonkowych. Aby wprowadzić czytelnika w temat pracy, napisała (jak już powiedziałem) obszerny „Wstęp”, którego część dotycząca palmitoilotransferaz została opublikowana po angielsku w zbiorowej pracy przeglądowej [Korycka J., Łach A., Heger E., Bogusławska D.M., Wolny M., Toporkiewicz M., Augoff K., Korzeniewski J., Sikorski A.F.: Human DHHC proteins: A spotlight on the hidden player of palmitoylation. Eur. J. Cell Biol., 2012, 91: 107-117]. Uzupełnieniem tej części „Wstępu” są dwie tabele charakteryzujące odpowiednio lepiej i mniej poznane palmitoilotransferazy z rodziny DHHC. Drugą część „Wstępu” stanowi omówienie hematopoezy, komórek macierzystych i różnicowania się komórek krwi. Ta część również mogłaby być opublikowana (tym razem po polsku) jako dobra praca przeglądowa.

W „Założeniach i celu pracy” Autorka krótko podsumowuje obecny stan wiedzy, podkreślając, czego jeszcze nie wiadomo, dlaczego w związku z tym podjęła badania nad ekspresją genów ZDHHC w komórkach hematopoetycznych (i innych) i jej znaczeniem biologicznym oraz – co zasługuje na szczególne podkreślenie – jakie narzędzia musiała sobie wytworzyć dla osiągnięcia tego celu.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka szczegółowo opisuje źródła komórek użytych do badań (krew i linie komórkowe), odczynniki, metody izolacji subpopulacji komórkowych, hodowle komórkowe, izolację mRNA i syntezę cDNA, amplifikację i sekwencjonowanie cDNA, metody analizy białek DHHC, projektowanie DNAzemu i transfekowanie nim linii komórek, badanie wpływu transfekcji na ekspresję genów ZDHHC... Zakres metod opanowanych i zastosowanych przez Autorkę jest imponujący, czuje się ona dobrze zarówno w biologii molekularnej, jak i w analizie białek, hodowlach komórkowych i cytometrii przepływowej, nieobce jej są również narzędzia informatyczne.

Konsekwencją tego bogactwa metod są bardzo obszerne „Wyniki”. Mgr Korycka najpierw sprawdziła *in silico* wiarygodność metody opublikowanej przez Ohno i współpr. [Ohno Y., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1761: 474-483]. Stwierdziła, że ich startery nie były zaprojektowane zgodnie z zasadami zapewniającymi swoistość i wydajność amplifikacji, wobec czego ich zastosowanie mogłoby ją doprowadzić do fałszywych wyników. Poza tym system Ohno i współpr. nie uwzględniał produktów alternatywnego składowania transkryptów. Dlatego Autorka musiała opracować nową metodę, wolną od tych błędów. Skonstruowała nowe zestawy starterów dla wszystkich 23 genów *ZDHHC* człowieka, tak aby spełniały wszystkie warunki swoistej i wydajnej amplifikacji, wykrywały wszystkie izoformy posiadające domenę DHHC, oraz aby miały te same lub zbliżone temperatury topnienia nie tylko dla danej pary, ale dla kilku par starterów.

Następnym problemem napotkanym przez mgr Korycką była czystość izolowanych (na kulkach magnetycznych z przeciwciałami) subpopulacji komórek hematopoetycznych, w których Autorka chciała badać ekspresję genów *ZDHHC*. W celu sprawdzenia tej czystości Autorka przygotowała zestawy starterów dla genów markerowych poszczególnych subpopulacji komórek hematopoetycznych. Posłużyła się też przeciwciałami monoklonalnymi przeciw markerom tych subpopulacji. Dzięki tym odczytnikom wykazała, że udało się jej uzyskać wysoce homogenne populacje komórek macierzystych (HSC), komórek tworzących kolonie rozsadzające erytroidalne (BFU-E), wczesne (CFU-E) i późne erytroblasty i retikulocyty. Uzyskała również czyste preparaty płytek krwi, monocytów/makrofagów i granulocytów. W tak oczyszczonych preparatach komórkowych zbadała występowanie transkryptów poszczególnych genów *ZDHHC*.

Jedynym transkrypcem *ZDHHC* występującym zarówno w HSC jak i we wszystkich komórkach linii erytroidalnej, poczynając od BFU-E, poprzez CFU-E, kończąc na wczesnych i dojrzałych retikulocytach, był *ZDHHC17*. Transkrypt tego genu był też jedynym *ZDHHC*, obecnym w dojrzałych retikulocytach. Wynik ten potwierdzono na poziomie białka swoistymi przeciwciałami. Transkrypcem *ZDHHC17* występował również w płytkach krwi, natomiast brak jego stwierdzono w innych dojrzałych komórkach mieloidalnych: monocytach/makrofagach i granulocytach. Obecność w komórkach erytroidalnych i płytkach krwi sugeruje, że enzym DHHC17 jest swoisty dla komórek mieloidalnych wywodzących się od wspólnego prekursora megakariocytarno-erytrocytarnego (MEP).

Mgr Korycka zbadała także ekspresję genów *ZDHHC* w jedenastu liniach komórek nabłonkowych wywodzących się ze wszystkich trzech listków zarodkowych: ekto-, mezo- i endodermy. Okazało się, że transkrypty większości genów *ZDHHC* były obecne w większości linii, przy czym transkrypt *ZDHHC19* występował najrzadziej, zaś transkrypt *ZDHHC17* był obecny we wszystkich liniach z wyjątkiem jednej. Nie zaobserwowano wzoru ekspresji *ZDHHC*, który by był swoisty dla danego listka zarodkowego.

Następnie Autorka zbadała występowanie transkryptów genów *ZDHHC* w komórkach linii nowotworowych pochodzenia hematopoetycznego: erytroidalnych komórkach linii HEL i K562, promielocytarnej linii HL60 i limfoidalnych liniach Jurkat (limfocyty T) i Daudi (limfocyty B). Transkrypty niektórych genów były obecne we wszystkich komórkach, inne tylko w niektórych, a kilka transkryptów w ogóle nie występowało w żadnej z badanych linii. Transkrypt genu *ZDHHC17* był obecny tylko w komórkach erytroidalnych linii HEL i K562, co potwierdza jego występowanie jedynie w komórkach wywodzących się od MEP.

Na koniec mgr Korycka zbadała efekt wyciszenia ekspresji genów palmitoilotransferaz DHHC na przebieg cyklu komórkowego. W tym celu zaprojektowała DNAzym, czyli jednoniciowy katalityczny oligodeoksynukleotyd, zdolny do swoistego cięcia jednoniciowego RNA w określonym miejscu. Aby wyciszyć jednocześnie wszystkie 23 palmitoilotransferazy, Doktorantka skonstruowała DNAzym w oparciu o zgodną sekwencję motywu DHHC wspólną dla wszystkich genów *ZDHHC*. Wykazała, że DNAzym ten rzeczywiście hamuje transkrypcję wszystkich badanych genów *ZDHHC*, jak również ilości białek DHHC, w tym także białka DHHC17.

Posługując się tym DNAzymem, Autorka pracy spowodowała obniżenie tempa proliferacji komórek HEL i K562 przy niewiele zmienionej ich żywotności. Zaobserwowała również zwiększenie się średnicy komórek pod wpływem DNAzymu. Cytometryczne badanie rozkładu faz cyklu komórkowego ujawniło zmniejszenie liczby komórek w fazie G1 i zwiększenie ich liczby w fazach S i G2/M.

W „Dyskusji” mgr Korycka najpierw powtarza wiadomości zawarte we „Wstępie”, po czym omawia dwóch pacjentów z anemią hemolityczną, u których w laboratorium promotora pracy, prof. Sikorskiego, stwierdzono brak enzymu DHHC17 w erytrocytach. Wprawdzie nie znaleziono defektu ani w genie *ZDHHC17*, ani w innych genach (nieopublikowane dane Autorki), lecz ponieważ, jak wykazano w dysertacji, DHHC17 jest jedyną S-palmitoilotransferazą komórek erytroidalnych, jej brak w erytrocytach wspomnianych pacjentów nie może być zrekompenzowany aktywnością innego enzymu, co powoduje u nich anemię.

Po kolejnej powtórcie części „Wstępu”, w dalszej części „Dyskusji” przechodzi Doktorantka do systematycznego omówienia swoich wyników: krytyki starterów Ohno i współpr. [2006], przedstawienia nowych starterów zaprojektowanych przez Autorkę, ekspresji genów *ZDHHC* w komórkach wywodzących się z wszystkich trzech listków zarodkowych, wykrywania zanieczyszczeń w izolatach poszczególnych subpopulacji komórek hematopoetycznych, ekspresji genów *ZDHHC* w komórkach z poszczególnych stadiów erytropoezy i w innych komórkach mieloidalnych, a także w komórkach limfoidalnych.

Wreszcie przechodzi Autorka do prawdziwej DYSKUSJI, t.j. do konfrontacji własnych wyników z danymi zamieszczonymi w bazie UniGene. Jest to najciekawsza część „Dyskusji”. Okazało się, że w większości typów komórek hematopoetycznych Autorka wykryła transkrypty większej liczby genów niż dotychczas opisano w tej bazie (wyjątkiem były komórki HSC, gdzie wyniki Autorki i dane bazy były zgodne). Wydaje mi się, że może to wynikać z o wiele bardziej optymalnego systemu detekcyjnego opracowanego przez mgr Korycką niż dotychczas opisany system Ohno i współpr. [2006]. Na uwagę zasługuje fakt, że żaden z podanych w bazie UniGene transkryptów nie został „przeoczony” przez mgr Korycką.

Na koniec Autorka powraca do omawiania reszty własnych wyników, tzn. do wpływu DNAzymu na tempo proliferacji i wielkość komórek oraz na rozkład faz cyklu komórkowego. Ostatnie zdania „Dyskusji” są podkreśleniem znaczenia wyników pracy.

Po „Dyskusji” następuje „Podsumowanie”, w którym w 7 punktach Doktorantka wymienia najważniejsze wyniki swojej pracy.

Ogólnie rzecz biorąc, dysertacja mgr Koryckiej przedstawia bardzo wartościowe, nowatorskie wyniki, warte szybkiego opublikowania w bardzo dobrym czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu (impact factor). Praca jest napisana klarowną i bardzo dobrą polszczyzną, co nie jest częste w obecnych pracach doktorskich. Jeszcze rzadziej trafia się dysertacja tak starannie opracowana pod względem edytorskim: brak błędów gramatycznych, a nawet literówek, co jest zupełnym ewenementem. Najśłabszą jej częścią może się wydawać „Dyskusja”, będąca w większej części swego tekstu raczej rekapitulacją „Wstępu” i „Wyników” niż prawdziwą dyskusją, co jest zresztą bardzo częste w polskich pracach doktorskich. Wynika to jednak w tym przypadku z nowatorstwa Autorki, która nie ma z czym dyskutować, bo nikt dotąd nie opublikował podobnych danych poza tymi, które zamieszczono w bazie UniGene, a które uzyskano posługując się bliżej nieokreślonymi warunkami doświadczenia i niepewnym systemem detekcyjnym. Wyniki Autorki doskonale uzupełniają dane tej bazy, a zgłoszona do opatentowania jej metoda będzie mogła być stosowana przez innych autorów z pożytkiem dla naszej wiedzy o roli palmitoilotransferaz z rodziny DHHC w biologii komórek, zwłaszcza hematopoetycznych.

Uwagi krytyczne oraz pytania do Autorki:

- 1) Do uwag o „Dyskusji” mogę jeszcze dodać, że szkoda, że Autorka nie położyła większego nacisku na przyczyny, dla których autorzy danych dostarczonych do bazy UniGene wykryli znacznie mniej transkryptów ZDHHC niż ona wykryła w tych samych komórkach (poza HSC, gdzie wyniki były identyczne). Powinna była podkreślić fakt, że dopiero ona opracowała pewny, wiarygodny system detekcji tych transkryptów. Pomijając w tym miejscu swoje osiągnięcie, Autorka wykazała się moim zdaniem nadmierną skromnością.
- 2) We „Wstępie” Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawia poszczególne palmitoilotransferazy z rodziny DHHC i klarownie omawia hematopoezę, natomiast brak wzmianki o DNAzymach, a przecież był to bardzo ważny element pracy.
- 3) A *propos* omówienia palmitoilotransferaz, co jak już wspominałem jest spolszczeniem tekstu z anglojęzycznej pracy zbiorowej: czy mgr Korycka uzyskała zgodę wszystkich ośmiorga współautorów tej pracy na jej użycie do „Wstępu”? Wprawdzie jest jej pierwszym autorem, ale przecież nie jedynym!
- 4) W streszczeniu angielskim znajdujemy następujące sformułowanie: „...**human** cancer cell lines derived from all primary cell layers of **animal** embryo...” (str.10). Wprawdzie biologicznie nasz gatunek jest zaliczony do naczelnych, czyli zwierząt, ale z nazwaniem ludzkiego zarodka zwierzęcym spotkałem się po raz pierwszy!
- 5) Przeciwciała królicze skierowane przeciw motywowi DHHC/DQHC, „zaprojektowane” w laboratorium promotora na potrzeby tego projektu, zostały według Autorki **zsyntetyzowane** przez firmę GL Biochem (str.44). Firma ta rzeczywiście zajmuje się m.in. syntezą peptydów, ale także ich użyciem do immunizacji zwierząt (np.. królików) w celu uzyskania poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał zamówionych przez klienta, ale nie syntezą samych przeciwciał!
- 6) Czy przy **pozytywnej** selekcji komórek za pomocą kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami nie zachodziło niebezpieczeństwo pobudzenia transkrypcji badanych genów przez samą procedurę izolacji?
- 7) Czy w cytometrii używano PBS bez wapnia i magnezu czy z tymi pierwiastkami?
- 8) Mgr Korycka podaje (str.58) powody, dla których, badając ekspresję genów *ZDHHC*, zrezygnowała z metody Ohno i współpr. [2006] i opracowała własną. Niestety w

„Dyskusji” porównuje własne wyniki jedynie z bazą UniGene, nie wspomina natomiast w ogóle o pracy Ohno i współpr., choć ciekawe byłoby porównać ich wyniki z wynikami Autorki, jeśli badali te same lub podobne komórki.

- 9) Dlaczego marker CD11a, stosowany w pracy do wykrywania zanieczyszczeń izolowanych subpopulacji komórkowych leukocytami (str.60), nie został uwidoczniiony na ryc.4, chociaż są tam obecne CD11b i CD11c, nieistotne dla tej pracy? Jako marker granulocytów i monocytów/makrofagów pojawia się dopiero w „Dyskusji” (str.100).
- 10) W legendzie do ryc.8 napisano: „CD42c (z powodu jego słabej **widoczności** oznaczono go białą strzałką)” – ja w moim egzemplarzu pracy żadnego produktu PCR przy tej strzałce nie widzę!
- 11) Na ryc.12 i 13 pokazano tylko reakcje dodatnie, podczas gdy na innych rycinach reakcje ujemne też są pokazane w żelu. Dlaczego?
- 12) Szkoda, że na ryc.16 nie pokazano braku zmian ekspresji genów ZDHC w czasie hodowli komórek kontrolnych.
- 13) W „Dyskusji” (str.96) czytamy: „... istotnym czynnikiem, który decyduje o tym, czy dana reszta cysteiny podlega temu procesowi [tj. palmitoilacji; przyp. mój] jest niewątpliwie jej występowanie w bliskim sąsiedztwie dwuwarstwy.” Czy nie jest właśnie odwrotnie? Czy cząsteczka białka nie zakotwicza się w dwuwarstwie za pomocą uprzednio przyłączonego palmitynianu i wówczas palmitoilowana reszta cysteiny siłą rzeczy znajduje się w bliskim sąsiedztwie tej dwuwarstwy? W cytowanej przez Autorkę pracy Greaves i Chamberlain [2] piszą: „Finally, in addition to specificity of protein interactions, the intracellular localisation of DHHC proteins probably also plays a major role in determination of DHHC–substrate interactions that occur in vivo. In this case, transmembrane proteins might have more restricted access to the total cellular pool of DHHC proteins than soluble proteins, which can access many membrane compartments, and hence many DHHC proteins, by cytosolic diffusion.”
- 14) Na str.98 Autorka pisze: „mutacja **którejkolwiek** z reszt aminokwasowych motywu DHHC **znosi aktywność** palmitoilotransferazową białek DHHC”. Jak to pogodzić z informacją ze „Wstępu”, że enzym DHHC13, posiadający zmieniony motyw DQHC (ryc.1A), „**posiada aktywność** palmitoilotransferazową” (str.26) i że „motywy aminokwasowe DHHC lub DQHC (w przypadku palmitoilotransferazy DHHC13) (są) charakterystyczne dla **aktywnych enzymatycznie** palmitoilotransferaz...” (str.105)?

Powyższe uwagi krytyczne i pytania nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej i wyników, i dysertacji mgr Koryckiej. Stwierdzam, że praca pt. „Identyfikacja produktów genów ZDHC w komórkach hematopoetycznych oraz w komórkach nowotworowych pochodzenia hematopoetycznego i nabłonkowego. Wpływ białek DHHC na cykl komórkowy komórek erytroidalnych” spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Koryckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoką wartość naukową wyników i sposób napisania dysertacji świadczący o dojrzałości naukowej Doktorantki wnoszę o wyróżnienie tej pracy.



Prof. dr hab. Piotr Kuśnierz

Kierownik
Laboratorium Immunogenetyki
i Immunologii Tkankowej ITD PAN
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 17