

Prof. dr hab. Małgorzata Kuliszkiwicz-Janus
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu
Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
50-370 Wrocław, Wyb. Pasteura 4
tel. (48)(71) 784 2604
e-mail: malgorzata.kuliszkiwicz-janus@umed.am.wroc.pl

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Justyny Koryckiej pt.
Identyfikacja produktów genów *ZDHHHC* w komórkach hematopoetycznych oraz w
komórkach nowotworowych pochodzenia hematopoetycznego i nabłonkowego. Wpływ
białek DHHC na cykl komórkowy komórek erytroidalnych**

Poszukiwanie, odkrywanie nowych dróg, prowadzących do głębszego, dokładniejszego wyjaśnienia mechanizmów chorób, stosowanie najnowszych metod to droga, która ma służyć choremu Człowiekowi. Wiadomo, że bez dyscyplin podstawowych, bez prac biologów, biochemików, genetyków nie ma on szans na lepsze przeżycie. Badanie podmiotowe i przedmiotowe choć niezmiernie nadal ważne i podstawowe by zwrócić uwagę na chorobę, nie potrafią rozwikłać już pytań: skąd powstała, jakie zaszły mechanizmy, że się rozwinęła. Zdobyta wiedza to w konsekwencji zdrowie pacjenta. Ta, kolejna praca dana mi do recenzji, prowadzona pod uważnym wzrokiem prof. Aleksandra Sikorskiego temu właśnie służy.

Enzymy palmitoilujące należące do rodziny DHHC odpowiadają za poprawną funkcję komórek. Natomiast mutacje powstałe w genach je kodujących, które znoszą ich aktywność enzymatyczną, są przyczyną wielu poważnych anomalii. Nie wykryto jednak, które z ludzkich genów *ZDHHHC* ulegają ekspresji w różnych komórkach hematopoetycznych.

Praca doktorska mgr Justyny Koryckiej liczy 128 strony maszynopisu, zawiera 20 rycin i 11 tabel. Bibliografia, to liczny zbiór obejmujący 225 pozycji, przede wszystkim, światowej, anglojęzycznej literatury, z której około 60% prac - to prace opublikowane po 2006 roku, w tym też prace z roku 2013. Część pozycji to internetowe bazy danych, głównie z grupy NCBI/Entrez. Autorka nie rezygnuje jednak z prac obejmujących doniesienia z lat wcześniejszych 80. i 90., a nawet 60.

We wstępie rozprawy składającym się z czterech podrozdziałów omawia stan wiedzy dotyczący palmitoilacji białek. Wyjaśnia podstawowe pojęcia i mechanizmy. Charakteryzuje miejsca palmitoilacji czyli reszty i motywy sekwencji białek podlegające temu procesowi. Omawia ludzkie palmitoilotransferazy białkowe i kodujące je geny. Przedstawia oddzielnie te, których funkcje są częściowo opisane, a także te mniej znane. Bardzo przejrzyste tabele 2. i 3. dokumentują przytoczone wiadomości. W ostatnim podrozdziale wstępu omawia mechanizmy hematopozy i hematopoetyczne komórki macierzyste

Założenia pracy i jej cel przedstawione są przejrzysto i bardzo zwięźle.

W części poświęconej metodologii przedstawia bardzo szczegółowo zarówno potrzebne do eksperymentu materiały jak i sposób przeprowadzenia doświadczeń, opisując kolejno wraz ze wszystkimi detalami poszczególne etapy badań. Wykorzystuje do nich zarówno konserwowaną krew ludzką, jak i linie komórkowe. Izoluje zarówno komórki mononuklearne z krwi pępowinowej, komórki HSC jak i komórki erytroidalne takie jak: BFU-E, CFU-E, wczesne i

późne erytroblasty oraz wczesne retikulocyty. Izoluje również komórki linii mieloidalnej: monocyty, makrofagii, płytki krwi i granulocyty. Analizuje ich żywotność. Hoduje hematopoetyczne komórki macierzyste oraz komórki nowotworowe. Izoluje cienie erytrocytów oraz erytrocyty wzbogacone w retikulocyty. Ponadto izoluje mRNA i syntetyzuje cDNA z komórek. Przeprowadza amplifikację cDNA konstruując zestawy starterów, a następnie wykorzystując do badania polimerazową reakcję łańcuchową, elektroforezę w żelu agarozowym, analizuje otrzymane sekwencje. Rozdział białek przeprowadza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i przy pomocy Western Blot. Prowadzi też obserwacje metodą immunofluorescencji. Projektuje DNAzym, transfekuje komórki HEL i K562 oraz analizuje ekspresję genów *ZDHHC* w tych komórkach. Końcowym etapem pracy jest analiza cytometryczna.

W wynikach badań, po przeanalizowaniu starterów opublikowanych przez Ohno i wsp. służących do identyfikacji produktów genów *ZDHHC* w różnych komórkach, opisuje konstrukcję nowego zestawu starterów, pozwalających na wykrywanie transkryptów poszczególnych genów *ZDHHC*. Zaprojektowane startery mają umożliwiać wykrycie wszystkich lub prawie wszystkich wariantów, będących rezultatem alternatywnego składania eksonów danego genu. Identyfikację transkryptów poszczególnych genów *ZDHHC* przeprowadza na wybranych ludzkich nabłonkowych liniach komórkowych pochodzenia zarówno ektodermalnego (skóry, piersi i szyjki macicy), jak i endodermalnego (płuc, prostaty, wątroby trzustki) oraz mezodermalnego (nerki, jajnika, prawidłowych ludzkich fibroblastów skóry). Następnym etapem badań jest identyfikacja transkryptów poszczególnych genów *ZDHHC* w komórkach hematopoetycznych (erytroidalnych, mieloidalnych) jak i komórkach nowotworowych pochodzenia hematopoetycznego (linie komórkowe HEL, K562, HL60, JURKAT T oraz DAUDI) Kolejne kroki poczynione przez Doktorantkę to próba identyfikacji białek DHHC w wybranych komórkach hematopoetycznych oraz w komórkach pochodzenia hematopoetycznego przy użyciu zaprojektowanych przeciwciał. Zadanie następane, bez wątpienia jedno z najciekawszych w pracy, to sprawdzenie jakie funkcje pełni w komórce ściśle określone białko. Uzyskuje to przez wyciszenie ekspresji genu kodującego. Wykorzystuje do tego DNAzym zaprojektowany w oparciu o sekwencję zgodną domeny DHHC. Badania potwierdza w analizie Western Blot.

Bardzo elastycznie przeprowadzoną dyskusję zaczyna od nakreślenia procesu palmitoilacji jego kluczowego znaczenia dla asocjacji białek z tratwami błonowymi, następnie omawia dotychczasowe osiągnięcia zespołu, w którym aktualnie pracuje, na temat badań dotyczących sferocytozy, który okazał się na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych "raftopatią". Omawia znaczenie enzymów należących do rodziny białek DHHC z sugestią zbadania, które z ludzkich genów palmitoilotransferaz ulegają ekspresji w komórkach z poszczególnych etapów erytropoezy i jak białka DHHC wpływają na cykl komórkowy komórek erytroidalnych.

W podsumowaniu pracy, w sposób uporządkowany i jasny przedstawia swe osiągnięcia: (1) skonstruowanie nowego zestawu oligonukleotydowych starterów pozwalających na wykrywanie transkryptów poszczególnych genów *ZDHHC* w komórkach ludzkich, (2) zaprojektowanie systemu do swoistej detekcji w określonej populacji komórek hematopoetycznych zanieczyszczeń komórkami innymi niż oczekiwane w efekcie danej izolacji. (3) nie obserwuje swoistości dotyczących występowania w różnych listkach zarodkowych palmitoilotransferaz DHHC, (4) przeprowadza analizę ekspresji genów *ZDHHC* w komórkach poszczególnych etapów erytropoezy (5) stawia hipotezę, że palmitoilotransferaza DHHC17 jest enzymem swoistym dla komórek MEP. (6) wykazuje, że obniżenie ekspresji *ZDHHC* wpływa na tempo proliferacji, zmienia morfologię oraz zaburza cykl komórek erytroidalnych.

Mrówcza, można rzec benedyktyńska praca, której się Doktorantka podjęła udokumentowana jest bardzo czytelnymi i dokładnymi rycinami i tabelami, które wraz z cennymi

podpisami podnoszą wartość pracy oraz znacznie ułatwiają zrozumienie zawiłych, mozolnych kroków badawczych autorki. Bardzo przejrzyste jest przedstawienie modelu hematopoezy, choć mam zastrzeżenia do nomenklatury stosowanych skrótów, w szczególności dotyczy to BFU-E, CFU-E.

Uwaga, którą chciałabym się podzielić to fakt, że jakościowy PCR nie jest optymalnym narzędziem do badania różnic ekspresji genów. Wprawdzie Autorka wnioski ilościowe uzyskane w wyniku jakościowego badania PCR potwierdziła analizą ekspresji białka (Western Blot), to jednak wydaje się, że zastosowanie a priori ilościowego PCR mogłoby mieć większą wartość metodologiczną

Biorąc pod uwagę bardzo szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów oraz uzyskane interesujące, konsekwentnie przeprowadzone wyniki badań należy uznać, że cel pracy doktorskiej mgr Justyny Koryckiej został w pełni osiągnięty.

Przeprowadzone badania oparte na nowoczesnych technikach odznaczają się nie tylko dużą rzetelnością, ale i nowatorskim podejściem do zagadnienia. Rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom. Wkład pracy doktorantki jest imponujący, w szczególności dotyczy użycia wielu mozolnych technik badawczych. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie nowego zestawu starterów do analizy ekspresji genów *ZDHC* metodą PCR. Podjęcie tak obszernych prób badawczych zaowocowało uzyskaniem interesujących wyników, które mogą mieć decydujące znaczenie w zrozumieniu mechanizmów powstawania chorób wywodzących się z linii erytro i mieloidalnej

Autorka nie omieszkała zaznaczyć, że aby powstała tak imponująca praca, były konieczne liczne konsultacje z wielu interdyscyplinarnych dziedzin, których autorka zasięgała i wykorzystywała w swej pracy, co z wdzięcznością wyraziła w swych podziękowaniach.

Wnioskuje wobec powyższego do Wysokiej Rady Wydziału Uniwersytetu Wrocławskiego nie tylko o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, ale także o wystąpienie z wnioskiem o jej nagrodzenie.



Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Kuliszewicz-Janus

Wrocław, dnia 29 listopada 2013 rok