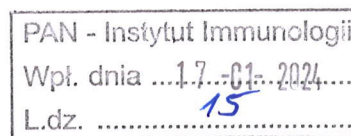


Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl



RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Skrzymowskiej pt.:

*Ocena biochemiczna i czynnościowa efektów mutacji punktowej
Arg1098Gln łańcucha alfa II spektryny w modelach in vitro i in
vivo*

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Laboratorium Immunologii Nowotworów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN. Praca została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej następujące sekcje: wykaz skrótów, streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski, podsumowanie, spis rycin i piśmiennictwo.

Wprowadzenie do pracy obejmuje 27 stron i zawiera bardzo dobry przegląd wiedzy na temat spektryn jako białek szkieletu komórkowego. W tej sekcji została wspomniana krótko filogeneza spektryn, natomiast znacznie szerzej omówiono budowę, skład domen białkowych i białka wiążące się do spektryn. Szczegółowo omówiono komórkowe ścieżki degradacji proteolitycznej spektryn przez kalpainy ich wielopoziomową regulację poprzez kalmodulinę oraz fosforylację spektryn i hamowanie kalpainowej degradacji spektryny przez kalpastatynę. We wstępie omówiono także znaczenie fizjologiczne spektryn i procesów ich degradacji w zdrowiu i chorobie. Końcowa część wstępu skupia się na możliwej patogenezie wywołanej przez nieprawidłową budowę i brak stabilności powtórzeń spektrynowych. Ostatnia sekcja omawia mysie modele ludzkiej spektrynopatii. Wprowadzenie zawiera szereg dobrze skomponowanych rycin, które pomagających zrozumieć wiedzę na temat struktury i funkcji spektryn i proteaz. Co bardzo ważne widać, że Doktorantka poważnie traktuje adaptację rycin z innych źródeł, przytaczając starannie ich oryginalne pochodzenie z odpowiednią referencją, co jest godne dużej pochwały. Podsumowując, wstęp jest mocno skupiony na budowie i funkcji

białek, co jest całkowicie zrozumiałe i prawidłowe. W czasie czytania miałem jednak niedosyt informacji, wynikający z pewnego braku uporządkowania i rozszerzenia wiedzy na temat patogenezы chorób wywołanych przez wadliwe geny spektryny i w jaki sposób uczestniczą w tym kalpainy. Ta wiedza jest co prawda dostępna w rozdziale 3.1.5. w podsekcji „Patologiczna aktywność kalpainy” oraz szerzej w rozdziale 3.2. jednakże osobny rozdział na ten temat mógłby bardziej rozjaśnić patogenezę tych rzadkich chorób. Brak tej wiedzy wiąże się też z pewnym niedostatkim opisu motywującego badanie tych chorób genetycznych jako potencjalnych wzorców patogenezы związanej z cytoszkieletem, które mogą pomóc wyjaśnić różne ważne aspekty patogenezы innych chorób neurodegeneracyjnych, które są znacznie częstsze i zostały wymienione w sekcji „Patologiczna aktywność kalpainy”. Uważam, że badania zrealizowane przez doktorantkę są ważne i dlatego kontekst powinien być wspomniany szerzej w sekcji „Cel pracy”.

Wykaz skrótów wpada w oko i zajmuje aż 5 stron gęstego tekstu. Pozwalam sobie zatem na nie merytoryczną, lecz małą techniczną krytykę, gdyż poszukiwanie skrótu jest trochę kłopotliwe. Pewne powszechne skróty nie wyjaśnia się (np. DNA, mRNA, SDS-PAGE, EDTA, Tris, wzory związków nieorganicznych i inne). Dla pojawiających się raz lub w oddalonych sekcjach praktyczniej stosować pełne nazwy i skróty wycofać z wykazu.

Celem pracy, który formułuje mgr Skrzymowska, jest „wytworzenie nowych modeli badawczych” do badania wpływu mutacji punktowej c.3293G>A w genie *Spna2* na jego produkt białkowy. Cel wytworzenie nowych modeli jest nieco enigmatyczny i niejako nie jest spójny z tytułem, który mówi, że celem jest po prostu badanie właściwości biochemicznych zmutowanego łańcucha białka alfa II spektryny i jego ocena czynnościowa.

Praca zawiera bogaty zasób bardzo zróżnicowanych metod, co w pełni spełnia standardy pracy doktorskiej. Metody obejmują modelowanie struktury fragmentów alfa II spektryny, produkcję białek w systemach bakteryjnych i ich oczyszczanie, klasyczne metody badań fizykochemicznych otrzymanych białek rekombinowanych, mierzenie oddziaływania białek z pomocą Biacore. Dalsza część metod to analizy białek metodą western blot i ocena proteolizy z pomocą ELISA. Następnie użyto technologii hodowli pierwotnych kultur komórkowych, choć trzeba przyznać, że nie scharakteryzowano komórek w tych hodowlach. Ostatnia część metod to praca z modelami zwierzęcymi in vivo. Nie jest jasne, kto wykonał krzyżowanie myszy obydwóch szczepów, jednakże domniemam, że standardowo jest to

domena zwierzętarni. Wykonane zostały testy rotarod, test siły mięśniowej i test footprint. Do metod zalicza się też analiza statystyczna. Prawidłowo zastosowano testy ANOVA z odpowiednią poprawką. Mimo że w opisie statystyki jest o tym mowa, jednak na rysunkach brak zaznaczenia, jaki test został użyty w przypadku danego rysunku (jednoczynnikowa lub wieloczynnikowa ANOVA); wartości p to najpewniej wartości posthoc Bonferroni, na rysunku brak p dla ANOVA. W metodach mogłaby się znaleźć podsumowująca tabela z całkowitą ilością zwierząt użytych do badań użytych do poszczególnych eksperymentów z wyszczególnieniem liczby N.

Już pobieżny przegląd sekcji wynikowej robi pozytywne wrażenie i potwierdza wstępny wniosek z metod, że w przygotowanie doświadczeń włożono ogromny nakład pracy. W odniesieniu do myszy i peptydu typu R1098Q doktorantka stawia sobie za cel pracy tworzenie 3 modeli i wyraźnie wyszczególnia model *in silico*, *in vitro*, i *in vivo*. Natomiast cała sekcja wyników nie jest w ten sposób uporządkowana, przez co trudno się zorientować jaki ostateczny kształt mają poszczególne modele *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. Być może, rozdział zawierający wyniki powinien zawierać rysunek-schemat pokazujący te modele i co się do tych modeli zalicza. Jednak mam wrażenie, że mimo tak sformułowanego celu, praca jest jednak spójna wynikowo w charakterystyce patogennych peptydów.

Pierwszy etap pracy to produkcja rekombinowanego białka, które przeprowadzono standardowymi metodami, otrzymując peptyd z powtórzeniami 9 i 10 alfa II spektryny. Te produkty wykorzystano później w badaniach biochemicznych. Następny rozdział wyników opisuje modelowanie *in silico* peptydów z mutacjami R1098Q, R1098K i R1098C. Rysunek 12 (produkcja) i 13 (modelowanie) są słabo opisane i nie korespondują ze sobą, trudno zorientować się np. gdzie jest pętla CCC i miejsce kalpainowe. Po analizie rysunku i tekstu widać pętlę CCC i miejsce kalpainowe, które może być rzeczywiście bardziej dostępne dla Kalpainy. Badania fizykochemiczne pokazują, że zmutowany peptyd traci pewne funkcje (stabilność struktury, wiązanie do kalmoduliny). Natomiast eksperymenty z trawieniem kalpainą peptydu R1098Q wskazują na zyskanie nowej właściwości przez to białko – zwiększonej podatności na trawienie Kalpainą, która nie potrzebuje już kalmoduliny do osiągnięcia poziomu WT.

W metodach opisano wyprowadzanie kultur komórek nerwowych z embrionów, natomiast nie przytoczono ich wieku embrionalnego. Nie jest też jasne, o jakie komórki

nerwowe chodzi. Z tekstu dowiadujemy się, że w procesie izolacji komórek odrzucono komórki nie adherentne, że komórki pasażowano, a więc można wstępnie wnioskować, że komórki, które pozostały mogą proliferować w kulturze. Jednymi z takich komórek w mózgu są astrocyty. Na pewno nie są to neuronalne komórki macierzyste, gdyż te pozyskuje się z embrionów E9-10. Również ich morfologia na rycinie 28 jest podobna do astrocytów. Cel pracy to wyprowadzenie modeli in vitro, czy więc te kultury komórkowe były modelami in vitro i czy scharakteryzowano typy komórek w tym modelu komórkowym? Zaintrygowało mnie, w jakich typach komórek nerwowych zmutowana Spektryna alfa II ujawnia swoją patogenną rolę i czy ta patogeneza jest do zaobserwowania w astrocytach, czy tylko w komórkach Purkiniego. Czy więc astrocyty mogą być modelem in vitro dla tej spektrynopatii? Dyskusja wspomina o problemach technicznych, które uniemożliwiły zastosowanie przeciwciał przeciwko markerom komórek i wykonanie barwień, co budzi pewne zdziwienie.

Dyskusja porusza aspekt agregatów. DLS nie wykazał skłonności peptydów typu R1098Q do agregacji. Jednak tworzenie się agregatów może być warunkowane również obecnością różnych innych białek i dodatkowo jest inne w środowisku komórkowym i w różnych komórkach. Doktorantka w dyskusji wspomina, że nie było agregatów w neuronach. Czy odnosi się to do eksperymentów na wspomnianych kulturach komórek nerwowych wyprowadzonych przez doktorantkę (astrocyty czy neurony?), czy do jakiś innych neuronów (skrawków mózdku)? Jeżeli odnosi się to do astrocytów, to zwykle dla dużej liczby chorób neurodegeneracyjnych nie obserwuje się agregatów w astrocytach. Doktorantka wspomina, że inne spektrynopatie charakteryzuje się występowaniem agregatów. Zatem stawiana w dyskusji teza, że to nie agregaty są przyczyną neurodegeneracji w tym modelu (nie uczestniczą w patogenezie), w mojej opinii może być zbyt przedwczesna i wymaga dalszych badań. Myślę, że temat jest wart komentarza w czasie obrony.

W dyskusji Doktorantka bardzo słusznie zauważa, że samo zwiększenie efektywności trawienie peptydu R1098Q przez kalpainę może być tylko drugorzędowym procesem zaangażowanym w patogenezę. Jest to prawda, natomiast w mojej opinii wyniki w pracy nie mogą na obecnym etapie badań być podstawą pozytywnej lub negatywnej odpowiedzi na to pytanie. Może światło na tę sprawę mogą rzucić pewne całkiem podstawowe eksperymenty takie jak choćby barwienia tkanek i ustalenie, czy w modelu R1098Q/hCAST następuje, chociaż częściowe odwrócenie degeneracja komórek Purkiniego, a także ustalenie w modelu R1098Q

co dzieje się z innymi neuronami w mózgu. Zwłaszcza tymi, które specyficznie ekspresują kalmodulinę np. neurony hipokampu. Można na przykład spekulować, że nawet niewielki brak równowagi w trawieniu miejsca kalpainowego w domenie 10 a trawieniem miejsca w domenie 11 jest wystarczający do wystąpienia patogenezy. Tym bardziej że mutacja R1098Q udostępniająca domenę CCC do trawienia dziedziczy się w sposób dominujący, jest więc silnie patogenna. Doktorantka wykazała, że białko zyskało nową funkcję: do uzyskania poziomu trawienia peptydu WT nie jest już potrzebna kalmodulina. Zwykła utarta jakiejś funkcji przez białko występuje w chorobach o dziedziczeniu recesywnym. Co więcej, badanie aktywności i poziomu produktów (potencjalnych markerów) trawienia spektryny przez kalpains (SNTF) może być obarczone bardzo dużym błędem ze względu na dynamikę tej reakcji. Test typu dot-blot na pewno nie spełni tutaj swojej funkcji ze względu na możliwy do uzyskania stopień czułości, specyficzności, rozrzut wyników, zastosowaną liczbę próbek itp. Od lat naukowcy borykają się z tym problemem, ostatnio stosując bardzo wyszukane metody badania poziomu markerów takie jak SIMOA.

Przyglądając się z kolei testom behawioralnym, dochodzi się do wniosku, że test rotarod skonstruowany w ten sposób ma zbyt małą czułość, aby wykazać różnice. Po przeczytaniu metod rodzi się wiele pytań dotyczących sposobu i procedury testów, co wydaje mi się, nie jest wyjaśnione dość dobrze. Np.: Czy 14 RPM to była końcowa prędkość obrotu; Czy drążek przyspieszał; Czy upadek jest miarą, czy też także, to gdy mysz zaczepi się i wykona jeden pełny obrót (jest to uważane za upadek); Czy były myszy, które przy tak niskiej prędkości po prostu nauczyły się spadać, i tego, że będą wtedy przeniesione do klatki (jest to duże wyzwanie dla eksperymentatora). Myszy uczące się spadać trzeba eliminować z pomiarów. Jeżeli chodzi o prędkość, aby specyficzność była większa i aby uniemożliwić spądanie na pierwszym etapie, dobrze jest stosować rotarod przyspieszający do 40 rpm przez ok. 6 do 10 min. W pomiarach zastosowano myszy w wieku 6-8 miesięcy. Dlaczego zastosowano akurat ten wiek? Ponieważ ataksja jest postępująca to, aby w pełni ocenić efekt, trzeba przeprowadzić eksperyment w różnych etapach postępu choroby. Co do metody rotarod to czasami zastąpienie jej testem prętów statycznych lub jego dodatkowe wykonanie jest znacznie lepszym i czulszym rozwiązaniem – szczególnie jeżeli myszy wykazują zmiany w teście footprint. Proszę o komentarz na temat dokładnych procedur wykonania testów.

Na koniec chciałbym wskazać, że analiza wyników z rysunków zawartych w pracy nie jest łatwym zadaniem, ponieważ rysunki zawierają tylko lakoniczne opisy i nie zawierają oznaczeń poszczególnych paneli wykresów w formie A, B, C itp. Z tego powodu Doktorantka

nie może odwołać się do poszczególnych paneli w tekście wyników. Dlatego szybkie nawigowanie po wynikach przez recenzenta jest też raczej trudne. Na końcu trzeba też zaznaczyć, że dłuższe formy pisarskie mogą zawierać więcej błędów językowych. Również i ta praca nie ustrzegła się tych błędów, zawiera znaczną liczbę skrótów myślowych w kontekstach zdań i niekonsekwencji w terminologii. Przytoczę tylko te językowo-merytoryczne: zamiast „ataksja mózdkowo rdzeniowa” lub „ataksja mózdkowa” powinno być „ataksja rdzeniowo-mózdkowa”; zamiast „Httt”, „Htt” (mysie białko) „HTT” (ludzkie białko); „transmisja GABA”. W pracy doktorskiej Doktorantka nie stosuje praktyki pisania genów kursywą – praktyka ta jest przyjęta i wygodna dla odróżnienia symboli genów (*HTT*) od symboli białek (HTT).

Wnioski końcowe

Pani mgr Joanna Skrzymowska podjęła ważny problem naukowy i wykonała wysokim nakładem pracy oryginalną pracę badawczą, którą jest charakterystyka peptydów z produktu białkowego genu *SPTAN1* zawierającego mutację c.3293G>A skutkującą powstawaniem białka *SPTAN1* ze zmianą aminokwasową R1098Q. Nieprawidłowe białka *SPTAN1* prowadzą do spektrynopatii u pacjentów, u których objawy i patogeneza są często zbieżne z innymi chorobami neurodegeneracyjnymi występującymi znacznie częściej. Również w przypadku badań doktorantki mysia zmiana aminokwasowa R1098Q, jest odzwierciedleniem ludzkiej spektrynopatii wynikającej ze zmiany aminokwasowej R1098C występującej u pacjentów. Dlatego przeprowadzone badania są ważne z punktu widzenia poznania patogenezy chorób neurodegeneracyjnych. Pani mgr Joanna Skrzymowska podczas badań wykorzystwała pokaźny zasób metod badawczych, co jest dodatkowym atutem pracy. Moje uwagi do pracy mają wyłącznie charakter pytań do dyskusji podczas obrony. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Skrzymowskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Joanna Skrzymowska powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Figiel



PODPIS ZAUFANY

MACIEJ
FIGIEL

12.01.2024 16:23:11 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym