

Poznań, 6.11.20120

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mariusza Walusia
prowadzonej przed Radą Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor: prof. dr hab. Janusz Błasiak (Łódź)

Promotor pomocniczy: dr hab. Adam Gołębek (Staten Island, USA)

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Walusia została przygotowana w Katedrze Genetyki Molekularnej UŁ i w Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, USA. Rozłożenie akcentów na stronie tytułowej i szereg innych punktów wskazują jednak na to, że punkt ciężkości prowadzenia badań leżał po stronie amerykańskiej.

Przed przystąpieniem do właściwej recenzji pracy doktorskiej sprawdziłem, czego można dowiedzieć się na temat Kandydata w bazie PubMed. Znalazłem listę 24 publikacji, z których 12 miało tytuły odpowiadające zakresowi badań opisanych w pracy doktorskiej. Wszystkie publikacje pojawiły się w poważnych czasopismach. Szczególne wrażenie wywarło we mnie parokrotne publikowanie w J.Biol.Chem (if 4,77). Dane uzyskane za pośrednictwem PubMed znaczą, po pierwsze, że przeprowadzone badania przekroczyły swoim zakresem zwyczajowe oczekiwania wobec prac doktorskich w Polsce. Po drugie, poszczególne wycinki badań zostały już pozytywnie zweryfikowane przez co najmniej 24 recenzentów. Oba spostrzeżenia wyprowadzone z informacji zawartych w PubMed nie mogą pozostać bez wpływu na charakter pracy recenzenta przesuając akcent na sprawy formalne i edytorskie.

Tematem przeprowadzonych badań było ocena znaczenia mutacji genu trójpeptydylowej transferazy I (TPPI) w zwyrodnieniowych chorobach spichrzeniowych układu nerwowego z nakierowaniem zainteresowania na wariant *CLN2*. Znaczy to, że przedmiotem badań było podłoże molekularne i genetyczne określonej choroby neurodegeneracyjnej, co pozostaje w szerokim zakresie moich własnych zainteresowań i pozwoliło na kompetentną ocenę rozprawy. Jednak już w tym miejscu należy wypomnieć autorowi, że naprowadza na trop w zawiły i chaotyczny sposób. By nie być gołosłownym

wypunktuję stosowanie skrótu CLN2 na oznaczenie genu, białka (tu pomocne jest na szczęście konsekwentne i prawidłowe stosowanie dużych liter w kursywie i piśmie prostym) oraz na oznaczenie symbolu wariantu choroby. Skróty-symboly pojawiają się już na stronie 8, gdzie objaśnione są jeszcze inaczej a mianowicie jako niebiałkowe składniki złogów. Nieco później pojawia się obszerna tabela, gdzie jako rozwinięcie skrótu pojawia się dla CLN2 też nazwa choroby Jansky'ego-Bielschowsky'ego, prawie nieobecna dalej w tekstowej części pracy. Oszaleć.

Literaturowy wstęp do rozprawy został napisany z wyraźnym postawieniem akcentu na biochemię i biologię komórki. Dopiero podrozdział „molekularne podstawy patogenezy” próbuje wiązać patologię molekularną z cechami klinicznymi i przebiegiem choroby. Znaczący to, że charakterystyka danego defektu strukturalnego w opisie doktoranta znajduje odniesienie do alteracji oddziaływań z innymi strukturami molekularnymi czy subkomórkowymi a dalej do modulacji określonych szlaków metabolicznych. Fizjologia czy patologia gdzieś umykają uwadze. Oczekuję, że podczas obrony doktorant ustosunkuje się do kwestii i powie, czy spośród wspomnianych 72 mutacji chorobotwórczych genu *CLN2* tylko dla trzech zmian mutacyjnych opisano efekt fenotypowy. Jeżeli tak jest rzeczywiście, to w tym punkcie znajduje się mocne uzasadnienie celowości podjęcia badań nad mutacjami genu kodującego TPPI.

Lektura części doświadczalnej pracy pokazuje, że wykonano rzetelny i rozległy zakres badań na podstawie dobrze zazębiających się i logicznie uzupełniających się technik laboratoryjnych. Jeżeli weźmiemy pod uwagę korzystanie z takiego zestawu technik jak ukierunkowana mutageneza, przygotowanie plazmidów, hodowle komórkowe (transferowane bakterie i linie komórek ssaczych), analizę struktur subkomórkowych za pomocą immunohistochemii i obserwacji pod mikroskopem konfokalnym, rozdział i oznaczenia ilościowe białek (Western blot i oznaczanie aktywności enzymatycznej), PCR i sekwencjonowanie DNA (wygląda na to, że sekwencjonowanie wykonywano na miejscu, rzadkość !/, bez wysyłania do zewnętrznego usługodawcy), finezyjne doświadczenia nad interakcją z cha peronami itd. Rozległość i biegłość w posługiwaniu się takim spectrum technik laboratoryjnych budzi pełne uznanie dla doktoranta.

Opis wyników doświadczeń został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie. Materiał ilustracyjny właściwie podpira warstwę słowną i numeryczną. Po mnogości szeregu szaro-czarnych ilustracji wyników badań białkowych sympatyczne interludium stanowi kolorowe obrazowanie lokalizacji TPPI i mutein za pomocą mikroskopii konfokalnej. Poza wrażeniami estetycznymi obrazy są merytorycznie przekonywujące. Wysoko oceniam sięgnięcie po podejście z pogranicza biofizyki do oceny stabilności struktury białkowej TPPI i fałdowania powierzchni, co z kolei wpływa na aktywność biologiczną.

Ponieważ z założenia recenzent tropi niedociągnięcia, błędy etc. dlatego poniższy fragment recenzji skupia się na tych właśnie sprawach. Oto one:

- Badania nad wpływem mutacji na zmianę stabilności TPP1 oparte są o obliczenia energii swobodnej na podstawie stosownych baz danych. Autor określa to jako „teoretyczne określenie...” wyraźnie traktując słowo teoretyczne jako przeciwstawienie pojęciu eksperymentalne. Nie, chemia organiczna już od dawna stosuje pojęcie „molecular modeling” na tego typu obliczenia strukturalne bez nazywania tego podejścia teoretycznym. Co prawda rozmawiałem z ludźmi stojącymi analizę struktury genu *in silico* (również wykorzystywaną w rozprawie) i też określili to podejście podobnie jak doktorant. Oczekuję podjęcia tej sprawy podczas obrony.
- Drugą niekonsekwencją jest częste wprowadzanie elementów dyskusji do omawiania wyników. Zauważam jednak, że na ogół dobrze to służy uzasadnieniu podejmowania kolejnych doświadczeń, nowych technik a więc ten zarzut pomijamy.
- Terminy aktywność, stężenie i poziom białka stosowane są błędnie jako zamienniki. Wiem, że czasami oznaczamy stężenie produktu reakcji jako wyznacznik aktywności. Jednak wymienne stosowanie terminologii w jednym akapicie nie sprzyja jednoznaczności wyrażania myśli.
- Brakuje uzasadnienia doboru linii komórkowych dla przeprowadzonych doświadczeń.
- Na str. 16 omówiono badania przeprowadzone na mózgach pacjentów chorych na CLN2 i mózgach kontrolnych (!). Nie wolno zdania skracać tak bardzo, bo wydzwięk jest straszny. Na szczęście krytykowany fragment nie dotyczy badań własnych ale sformułowanie musi być pozbawione niewłaściwych konotacji.

Dyskusja odnosi wyniki własne do ustaleń literaturowych, stwarzając możliwość weryfikacji ustaleń opisanych w rozprawie. Niemniej - w zgodzie z koncepcją pracy – dyskusja dotyczy w ogromnej większości poziomu molekularnego i komórkowego i tym samym wnioskowanie na temat powstania przebiegu i leczenia badanej choroby w znacznym stopniu pozostawia zdolności czytelnika do dedukcji. Z pewnością wyników nie można przenosić wprost na fizjopatologię i patologię człowieka z racji zastosowania zwierzęcych linii komórkowych jako modelu doświadczalnego. Zwierzę to nie człowiek a linie nawet najlepiej dobrane nie oddają rzeczywistości, w której komórki żyją pozostając w otoczeniu innych komórek i są przez nie kontrolowane. Nie zmienia to faktu, że przeprowadzone badania stanowią kolejny krok do zrozumienia mechanizmu patogenezы w następstwie zmian strukturalnych i następowej dysfunkcji TPPI.

Z zupełnie niejasnych powodów dyskusja zawiera jeszcze niezły pakiet wyników, które powinny znaleźć się w innym miejscu.

Wnioski z przeprowadzonych badań zostały spisane w ośmiu punktach i właściwie stanowią nieco uogólnione wyniki doświadczeń. Taka właśnie generalizacja i jeden krok poza bezpośredni wynik jest dla mnie wnioskiem z badań. Jak już wspominałem wyżej nie jestem przekonany do koncepcji pracy, której motywem nośnym jest analiza molekularnego podłoża choroby a przeprowadzone badania nie dochodzą do samej choroby.

Układ rozprawy jest niemal typowy dla rozpraw promocyjnych z wyjątkiem umieszczenia sekcji „Uzasadnienie podjęcia tematu i cel pracy” po materiałach i metodach a przed wynikami. Przywykłem do umieszczania celu pracy przed materiałami i metodami, bo najpierw wykładamy dlaczego podejmujemy temat i dopiero wtedy prezentujemy jak i czy i na czym zamierzamy prowadzić badania.

Forma rozprawy pozostaje znacznie w tyle poza meritum. Język jest trudny a szyk zdań bywa tak zawiły, że autor też tracił nad nim kontrolę i fragmenty końcowe nie pasują składniowo do początku. Interpunkcja też nie doczekała się pełnej poprawności. Domyślałem się, że rozprawę krytycznie czytał nie tylko doktorant. Dowodem jest pozostawienie na str. 12 dwóch fatalnych błędów ortograficznych. Znaczy to dla mnie, że gdzie indziej zostały dostrzeżone a tutaj uwaga uciekła i błędy w dublecie zostały. Tekst rozprawy poprzedza objaśnienie skrótów niestety zbyt wąskie. Już na pierwszej stronie tekstu trafiłem na nieobjaśniony skrót. Wiele z nich jest rozwiniętych po pierwszym wprowadzenie ale przy mnogości skrótów zachodzi konieczność cofania się do miejsca, gdzie objaśnienie użyto po raz pierwszy,

Długa liczba zarzutów, które postawiłem rozprawie nie jest jednak w stanie zmienić obrazu całości, który powstał w wyniku szerokich i rzetelnych analiz molekularnych oraz komórkowych. Zaimponował mi rozmach instrumentarium. Wyniki zdecydowanie poszerzają stan wiedzy podstawowej a przejście na poziom kliniczny wydaje się być w zasięgu ręki. Ogólnie więc praca dostarcza bogactwo informacji w dziedzinie niedostatecznie zbadanej i stanowi dobry punkt wyjścia do przejścia na poziom kliniczny. Tym samym jestem zdania, że recenzowana rozprawa całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i rekomenduję Radzie Wydziału dopuszczenie Kandydata do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. med. dr hab. Krzysztof Szyfter