



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

Poznań, 9.07.2018

Prof. dr hab. Dorota Cieślak

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ul. Wołyńska 33

60-631 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Damiana Janeckiego

pt. " Potranskrypcyjna regulacja SPINDLIN, potencjalnych modulatorów cyklu komórkowego i apoptozy, w modelu nasieniaka człowieka" przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej oraz dr. Barbary Ginter-Manuszewskiej

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska mgr **Damiana Janeckiego** poświęcona jest analizie wybranych genów z rodziny SPINDLIN: *SPIN1*, *SPIN 3* oraz *SPIN 4* w zakresie dwóch aspektów: 1) ich funkcji jako modulatorów apoptozy, proliferacji komórek oraz regulatorów cyklu komórkowego oraz 2) ich potranskrypcyjnej regulacji przez regulatorowe białka z rodziny PUF (*PUM1*, *PUM2*) i ich białkowe kofaktory z rodziny NANOS (*NANOS1*, *NANOS2*, *NANOS3*). Modelem biologicznym wykorzystanym w doświadczeniach są komórki Tcam-2 wyprowadzone z nasieniaka pierwotnego człowieka odpowiadające męskim komórkom gametogenicznym (między stadiami PGC i gonocytów). W badaniach wykorzystano także opisaną wcześniej przez zespół mutację genu *NANOS1* p.P34T;S78del zidentyfikowaną u niepłodnego mężczyzny z całkowitym brakiem komórek gametogenicznych. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że oceniana praca doktorska mieści się w nurcie wieloletnich badań promotora rozprawy, Pani prof. Jadwigi Jaruzelskiej poświęconych m.in. białkowym kofaktorom z rodziny NANOS. Pani Promotor posiada w tym zakresie cenny dorobek publikacyjny.

Zarówno zakres wykonanych doświadczeń jak i wykorzystanych procedur laboratoryjnych jest bardzo bogaty. Komórki Tcam-2 poddano modyfikacjom genetycznym (nadekspresja, wyciszona ekspresja - siRNA) w celu analizy szerokiego spektrum parametrów (np. proliferacja komórek, apoptoza, ekspresja na poziomie mRNA i białka) pozwalających na wykazanie potencjalnej roli kompleksów białek PUM+NANOS w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji trzech genów rodziny SPIN. Wykorzystano szerokie spektrum procedur np. modyfikacje genetyczne (nadekspresja i wyciszona ekspresja; transfekcja komórek z użyciem przygotowanych konstruktów np. siRNA dla mRNA genu SPIN), analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym (*fluorescence live cell movie analyser*), test lucyferazy (poziom transkryptów genu reporterowego), detekcja komórek apoptotycznych (barwienie Aneksyna V+FITC, cytometr



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

przełykowy), ekspresja mRNA (real time PCR), ekspresja białek (Western blot), analiza dynamiki cyklu komórkowego (cytometr przepływowy), analiza oddziaływań badanych odcinków mRNA (test retardacji żelowej, test kompetycji).

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy dokumentują funkcje białek SPIN 3 oraz SPIN4 w modelu komórek nasieniaka człowieka. Wykazano odmienne oddziaływanie białek z rodziny SPIN na komórki nasieniaka Tcam-2. W warunkach nadekspresji, białka SPIN3 i SPIN4 powodowały spadek proliferacji i wzrost apoptozy (działanie supresorowe), podczas gdy białko SPIN1 stymulowało proliferację i hamowało apoptozę (działanie onkogenne). Opisano także odmienną funkcję białka NANOS1 przy wykorzystaniu modelu mutacji p.P34T;S78del.

Pragnę zwrócić szczególną uwagę na następujące osiągnięcia niniejszej pracy:

1. Wykazanie po raz pierwszy supresorowego oddziaływania białek SPIN3 oraz SPIN4 na komórki nasieniaka człowieka Tcam-2.
2. Wykazanie istotnego wpływu mutacji genu *NANOS1* p.P34T;S78del na zmianę funkcji białka NANOS1 z anty-apoptotycznej na pro-apoptotyczną m.in. poprzez derepresję ekspresji pro-apoptotycznego białka SPIN3 oraz wskazanie, że opisany mechanizm może być podłożem obserwowanego zaburzenia u nosiciela mutacji.
3. Opisanie szczegółów mechanizmu regulacji ekspresji genów *SPIN* poprzez udokumentowanie różnego oddziaływania białek z rodziny PUM (PUM1, PUM2) z końcem 3'UTR transkryptów *SPIN1*, *SPIN 3*, *SPIN 4*.
4. Należy także podkreślić duże znaczenie wyników niniejszej pracy dla zrozumienia przyczyn zaburzeń płodności męskiej, a w przyszłości ich potencjał aplikacyjny.

Uwagi edytorskie

Rozprawa doktorska mgr **Damiana Janeckiego** napisana jest w języku polskim i ma typowy układ dla monografii naukowych. Liczy 125 stron z podziałem na: streszczenie w j. polskim i angielskim (str 9-10), wykaz skrótów (7-8), wstęp (11-34), cel pracy (35), materiał i metody (36-62), wyniki (63-109), dyskusję (110-114), wnioski (115-116) 118-125, 143 pozycje). Praca jest ilustrowana licznymi rycinami (35), w tym jednym zdjęciem mikroskopowym (Ryc.8).

Zdaję sobie sprawę, że wyniki niniejszej pracy doktorskiej będą publikowane w uznanych czasopiśmie, jednak jako Recenzent mam obowiązek ocenić przedstawioną do recenzji monografię.



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

Uwagi szczegółowe do monografii:

1. Rozdział *Streszczenie* powinien w sposób zwięzły prezentować najważniejsze aspekty pracy i przekonać czytelnika o zasadności zapoznania się z pracą. Przedstawione streszczenie nie prezentuje rodzaju i zakresu wykonanych analiz. Brakuje także sekwencyjnego podsumowania najważniejszych osiągnięć.
2. W rozdziale *Wstęp* brakuje w mojej opinii krótkiego podsumowania aktualnej wiedzy na temat skali zaburzeń płodności męskiej i głównych przyczyn tego zjawiska.
3. W ocenianej rozprawie nie wyodrębniono hipotezy badawczej.
4. Pomimo, że rozdział *Materiał i Metody* (M&M) jest bardzo szczegółowy, brakuje ogólnego schematu wykonanego doświadczenia, które jest bardzo wielowątkowe. Taki schemat pokazywałby sekwencję procedur, najważniejsze parametry analiz, liczebności prób i powtórzeń. Przykładowo, nie jestem przekonana czy w każdej procedurze liczba powtórzeń biologicznych była równa 3?
5. Liczba komórek poddawanych transfekcji różniła się między procedurami (np. ok 150 tys / dołek przy badaniu proliferacji komórek i teście lucyferazy, ok 300tys /dołek przy badaniu apoptozy). Czy wyjściowa liczba komórek nie powinna być utrzymana na zbliżonym poziomie?
6. Rozdział *Wyniki* jest wyjątkowo długi (str 63-109). Sposób prezentacji wyników niniejszej pracy generalnie uważam za ciekawy. Autor rozpoczyna poszczególne podrozdziały od głównego osiągnięcia, co znacznie ułatwia lekturę. Muszę jednak podkreślić, że wielowątkowość doświadczenia i brak schematu w rozdziale M&M spowodowały, że lektura tego rozdziału była utrudniona.
7. Rozdział *Dyskusja* jest natomiast bardzo krótki (str 110-114). Dziwi mnie stwierdzenie Autora, że „przedyskutowano jedynie wyniki, które wydawały się najbardziej interesujące”. Generalnie stwierdzenie jest prawidłowe, poza słowem „wydawały się”. Stwierdzam jednak, że Autor prawidłowo ustosunkował się do najciekawszych osiągnięć własnej pracy. Ponieważ główne osiągnięcia dotyczą mechanizmów regulacji ekspresji genów *SPIN*, to bardzo przydatna byłaby rycina prezentująca proponowane mechanizmy bazujące na odkryciach Autora. Ponadto, łatwiej byłoby podkreślić cenne odkrycia wynikające z wykorzystania mutacji genu *NANOS1* p.P34T;S78del. Ten fragment ginie w opisie. Ponadto, odwoływanie się w dyskusji do rycin omówionych w szczegółach w wynikach uważam za bezzasadne.
8. Nie wszystkie stwierdzenia przedstawione w rozdziale *Wnioski* określiłabym tym mianem. W mojej opinii stwierdzenia nr 1, 2, 3, 4, 6, 8 i 9 stanowią posumowanie wyników.



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona praca doktorska **mgr inż. Damiana Janeckiego** zawiera nowatorskie elementy w istotny sposób poszerzające dotychczasowy stan wiedzy na temat funkcji i potranskrypcyjnej regulacji ekspresji trzech genów z rodziny SPINDLIN. Szerokie spektrum badanych parametrów, wyjątkowo zaawansowane procedury badawcze oraz uzyskane wyniki sprawiają, że bez wątpliwości będą one opublikowane w indeksowanym czasopiśmie o wysokim IF. Moje krytyczne uwagi dotyczą przedstawionej monografii, sposobu jej zredagowania. Pomimo tych uwag, uważam, że przedstawiona do recenzji praca prezentuje cenne wyniki i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, a niedociągnięcia redakcyjne na pewno będą zweryfikowane w procesie publikacji.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym (z późniejszymi zmianami) tekst jednolity z dnia 15.09.2017 (Dz. U. poz. 1789) i wnioskuję do **Rady Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu** o dopuszczenie Pana **mgr inż. Damiana Janeckiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Dorota Cieślak