Prof. dr hab. Ewa Bartnik
UNIWERSYTET WARSZAWSKI
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII
ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. (22) 5922247
fax. (22)658-47-54
email: ebartnik@igib.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Małgorzaty Kawalec pt. „Badanie komórkowych skutków mutacji w genie mitofuzyny 2. Próba zaproponowania testu patogenności mutacji"
Promotor – Prof. dr hab. Barbara Zabłocka
promotor pomocniczy – dr n. med. Małgorzata Beręsewicz

Jest zadziwiające jak nadal nie do końca rozumiane są patomechanizmy dla wielu chorób. Co więcej, nawet jeśli znany jest „winowajca" – gen, w którym mutacje powodują daną chorobę, często to czy dana mutacja jest patogenna czy nie ustala się przez badanie wielu chorych z daną mutacją i poprzez stwierdzenie, że nie występuje ona w zdrowej odpowiednio dobranej populacji kontrolnej. Czasem próbuje się modelować efekty danej mutacji o ile znana jest struktura niezmutowanego białka, czasem próbuje się stosować modele komórkowe, w których dane białko jest zmieniane/nieobecne.

Rozprawa doktorska pani mgr Kawalec dotyczy jednego genu –kodującego mitofuzynę 2, mutacje w tym genie, na ogół dominujące, powodują chorobę Charcot-Marie-Tooth 2A. Celem pracy było właśnie stworzenie modelu komórkowego pozwalającego na odróżnienie efektów normalnego i zmutowanego genu kodującego mitofuzynę w odpowiednio dobranym modelu komórkowym.

Jako model wybrano mysie fibroblasty (MEF) – 3 linie – „dzika" i pozbawione genów bądź kodujących mitofuzynę 1 bądź mitofuzynę 1 i mitofuzynę 2. Nie do końca jest dla mnie jasne dlaczego nie badano jeszcze jednej linii – pozbawionej genów dla mitofuzyny 1. W każdym razie jasno widać, że podwójny deletant rośnie dużo wolniej od komórek kontrolnych, choć deletant bez mitofuzyny 2 rośnie jeszcze szybciej (dlatego brakuje mi deletanta tylko genu mitofuzyny 1). Zdaję sobie sprawę z tego, że dodanie jeszcze jednej linii

komórkowej by bardzo rozszerzyło ilość prowadzonych badań i hodowli, a także (co wynika z badań przeprowadzonych w ramach doktoratu) niska ekspresja lub jej brak w tkankach nerwowych – które są dotknięte chorobą u pacjentów – jest lepiej przybliżana przez linie z podwójną delecją.

Trzy badane linie komórkowe scharakteryzowano także bardzo szeroko pod kątem oddychania, potencjału błonowego mitochondriów, wytwarzania reaktywnych form tlenu, produkcji ATP, produkcji mleczanu (ocena metabolizmu energetycznego komórek), ilości mitochondriów i mitochondrialnego DNA. Nie będę wyliczała wszystkich badań doktorantki, mam przekonanie, że przeprowadziła szeroko zakrojone i dobrze zaprojektowane badania dotyczące parametrów funkcjonowania w komórce mitochondriów w komórkach pozbawionych mitofuzyny 2 lub obu mitotofuzyn.

Inne badania przeprowadzono nie na liniach komórkowych ale na myszach z nokautem odpowiednich genów, użyto wielu tkanek, szereg z nich pochodziło z układu nerwowego ale uwzględniono też inne narządy takie jak serce, wątrobę itp. Ciekawym wynikiem jest, że w zwojach czuciowych ekspresja Mfn2 jest kilkukrotnie wyższa niż Mfn1, co by tłumaczyło dlaczego ekspresja Mfn1 nie wystarcza by zrekompensować obecność nieaktywnej czy niewłaściwie aktywnej formy Mfn2.

Ostatecznym elementem pracy było zaproponowanie modelu do badania patogennych efektów mutacji w genie mitofuzyny 2 – wybrano jako parametr stosunek ilości mitochondrialnego DNA do jądrowego DNA i jako model wybrano komórki z podwójnym nokautem genów mitofuzyny. Wprowadzenie genu Mfn2 typu dzikiego podwyższało stosunek mtDNA/nDNA w sposób znaczący, natomiast dla trzech zbadanych mutacji uzyskano efekty rozbieżne – po transfekcji genami z 2 różnymi mutacjami stosunek ten też rósł, natomiast dla kolejnej badanej mutacji się nie zmieniał.

Praca jest dobrze napisana, i co niestety zdarza się ostatnio rzadko, jest zwięzła a zarazem podaje wszystkie niezbędne informacje o samej chorobie i stosowanych metodach badań. Mam jednak uwagę merytoryczną dotyczącą wstępu – na str. 26 wygląda jakby się coś zgubiło lub przekręciło – dla chorób mitochondrialnych, powodowanych przez mutacje w mitochondrialnym DNA – po to by wykluczyć ich przekazywanie przez chorą matkę jej dzieciom prowadzi się badania prenatalne lub preimplantacyjne. Ale nie jest to tak jak pisze Autorka „w myśl tej strategii jądro komórkowe osoby chorej lub obarczonej ryzykiem choroby mitochondrialnej wprowadzane jest do oocytu zdrowego dawcy. ...Strategia okazała się skuteczna w leczeniu wielu chorób wynikających z mutacji w genomie mitochondrialnym m. in. w neuropatii Lebera". Odnośnik literaturowy dotyczy faktycznie diagnostyki

preimplantacyjnej/prenatalnej, ale to co pisze Autorka dotyczy dopuszczonej ponad rok temu w Wielkiej Brytanii ale jeszcze według mojej najlepszej wiedzy nie zastosowanej w praktyce strategii przenoszenia jądra komórki jajowej kobiety z chorobą mitochondrialną i przenoszenia go do oocytu zdrowej dawczyni, a następnie przeprowadzenia zapłodnienia in vitro. Ale nikt nikogo z niczego tym nie uleczył, a metoda diagnostyki prenatalnej/preimplantacyjnej nie leczy tylko z mniejszą lub większą skutecznością pozwala na wybranie zarodków obciążonych jak najniższym poziomem zmutowanego DNA. Co więcej, nie jest i nie może być w 100% skuteczna w eliminacji zmutowanych mitochondrialnych DNA, co więcej o ile przenoszenie jądra komórkowego by mogło zapobiec neuropatii nerwu wzrokowego Lebera, to na pewno nie diagnostyka preimplantacyjna/prenatalna, bo większość chorych ma około 100% zmutowanego mitochondrialnego DNA.

Kolejny błąd znajduje się przy podpisie dla Rys. 15, na pewno nie oznaczano względnej ilości mitochondrialnego DNA mierząc ilość DNA jądrowego „na podstawie ekspresji genu kinazy tymidylanowej", szczególnie, że to co mierzono miało być jądrowym DNA.

Wracając do samej pracy a nie jej drobnych błędów, mam uznanie dla jej autorki dla szerokiej gamy technik badania tego, co się dzieje w komórkach. Brakowało mi komórek z brakiem samej mitofuzyny 1, przynajmniej w paru badaniach. I nie do końca jestem przekonana co do modelu badania efektów patogennych mutacji – po pierwsze nie jest on – przynajmniej dla 3 zbadanych mutacji – konkluzywny, dane są ilościowe i obarczone błędami, różnica pomiędzy $0,74 \pm 0,04$ a $0,65 \pm 0,24$ nie napełnia mnie głębokim przekonaniem, że da się łatwo na podstawie proponowanego testu ustalić co jest a co nie jest patogenne. Co gorsza, większość mutacji w genie mitofuzyny 2 jest dominujących, co w jakimś sensie nasuwa myśl – czy „dobra" kopia nie wpływa na działanie „złej"? To aż się prosi by to sprawdzić, mając nie podwójny nokaut ale pojedynczy – z jednym dobrym genem Mfn2. Czy to już zadziała?

Pani mgr Kawalec zastosowała wiele technik badania komórek by ustalić najlepszy parametr do próby ustalenia zmian powodowanych przez mutacje w genie mitofuzyny 2. Starannie też przeanalizowała i dobrze dobrała literaturę. Ma też ostrożne podejście do proponowanej metody ustalania patogenności mutacji i zdaje sobie bardzo dobrze sprawę z ograniczeń proponowanego modelu.

Mam jednak jeszcze jedną uwagę dotyczącą literatury – zabrakło mi bardzo pracy ze znakomitej grupy N-G Larssona, „Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels", ukazała się w lutym 2015 i wiele wnosi do zrozumienia mechanizmów działania mutacji w genie mitofuzyny 2.

Powyższe krytyczne uwagi nie wpływają jednak na moją zdecydowanie pozytywną ocenę pracy, doktorantka zaproponowała układ mogący pomóc w diagnozowaniu choroby i bardzo dobrze scharakteryzowała komórki nieprodukujące żadnego rodzaju mitofuzyny lub tylko nie produkujące mitofuzyny 2. Bardzo ciekawe są dla mnie wyniki o tkankowej specyficzności ekspresji mitofuzyny 2. Warto też zauważyć, że uzyskane wyniki już stanowiły podstawę do dwóch publikacji, w których doktorantka jest 1. autorem – w 2014 r. w Folia Neuropathol. (IF = 1,6) i w 2015 w PLOS One (IF 3,23).

Zwracam się więc do Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego o dopuszczenie pani mgr Marii Kawalec do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Warszawa, 4.03.2016

UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII
prof. dr hab. Ewa Bartnik