



nencki institute
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK
**INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. M. NENCKIEGO**

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Tel. (0 22) 589 22 61; Fax. (0 22) 822 53 42

E-mail: adobrzyn@nencki.gov.pl; <http://www.team.nencki.gov.pl>

dr hab. Agnieszka Dobrzyń, Prof. IBD
Pracownia Sygnałów Komórkowych
i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Warszawa 23.12.2015

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Barbary Lipert
pt. „Rola MCPIP1 w różnicowaniu preadipocytów”

Biała tkanka tłuszczowa jest bardzo istotna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Poza magazynowaniem triacylogliceroli, które służą jako substraty energetyczne w okresie głodu, pełni ona także funkcję wydzielniczą. Syntetyzowane przez tkankę tłuszczową adipokiny uczestniczą m.in. w regulacji łaknienia, utrzymywaniu homeostazy energetycznej, metabolizmie węglowodanów i tłuszczów, regulacji hemostazy naczyniowej, ciśnienia tętniczego, procesów zapalnych i immunologicznych. Rozwój tkanki tłuszczowej rozpoczyna się już w czternastym tygodniu życia płodowego i gwałtownie przyspiesza po urodzeniu pod wpływem zwiększenia podaży pożywienia. Bardzo istotne jest poznanie mechanizmów regulujących adipogenezę, ponieważ nadmiar tkanki tłuszczowej prowadzi do otyłości i nadwagi, co zwiększa ryzyko zapadalności na choroby układu krążenia, cukrzycę typu 2, niektóre typy nowotworów i powstawanie stanów zapalnych. Proces różnicowania preadipocytów do w pełni wykształconych adipocytów jest regulowany przez wiele czynników. Wśród nich bardzo istotne są czynniki transkrypcyjne, przede wszystkim PPAR i C/EBP. Natomiast rola białka indukowanego przez białko chemotaktyczne monocytów (MCPIP1), czynnika biorącego udział w różnicowaniu m.in. komórek neurogleju oraz śródbłonna, w adipogenezie nie była poznana. Dlatego też, główny cel recenzowanej rozprawy tj. zbadanie czy zmiany ekspresji MCPIP1 wpływają na proces różnicowania adipocytów oraz jakie są molekularne mechanizmy stojące za ewentualnymi zmianami wydaje się być trafny i bardzo interesujący.

Praca doktorska mgr Barbary Lipert przedstawia wyniki badań przeprowadzonych w Zakładzie Biochemii Ogólnej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Jury. Maszynopis zawiera 102 strony a całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Rozwinięcia skrótów i nazwy linii komórkowych (3 strony), 2) Wstęp (23 strony), 3) Cel prowadzonych badań (1 strona), 4) Techniki i narzędzia zastosowane w badaniach (18 stron), 5) Wyniki (20 stron), 6) Dyskusja (15 stron), 7) Dane uzupełniające (2 strony zawierające 4 dodatkowe ryciny), 8) Wnioski (1 strona), 9) Streszczenie w języku polskim i angielskim (po 2 strony), 10) Bibliografia (11 stron). Pod względem redakcyjnym praca ma klasyczny układ dla dysertacji doktorskich. Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edycyjnym. Tym niemniej nie uniknięto w niej pewnych niedociągnięć:

1. Część skrótów jest rozwinięta nieoprawnie, np. ER to siateczka śródplazmatyczna a nie retikulum endoplazmatyczne; PPAR γ to receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów γ a nie steroidowy receptor jądrowy, AKT to kinaza białkowa B (lub kinaza białkowa Akt) a nie serynowo/treoninowa kinaza białkowa; skróty nazw całego szeregu czynników transkrypcyjnych (np. AP-1, KLF-4, STAT3) nie zostały rozwinięte, natomiast skróty RXR, LIP, RIPA, MEM są rozwinięte nieprawidłowo, itd. Zaskakujący jest fakt, że w całej pracy (łącznie z tytułem) nie rozwinięto skrótu MCPIP1, które to białko/gen jest głównym obiektem badań. Ta część rozprawy wymaga gruntownego przeredagowania w postaci erraty.
2. Nie uniknięto żargonu laboratoryjnego, np. stwierdzenia: worteksowano, preadipocyty ekspresjonują więcej inhibitora ..., na wykresie 'pokazano średnią \pm SEM' itp.
3. Tytuły czasopism w zestawieniu bibliografii są przedstawione w sposób niejednorodny, tj. czasami nazwa jest skrótowa (np. J Biol Chem) a w innych przypadkach podawane są całe tytuły (np. Journal of Biological Chemistry).

Te drobne uchybienia nie mają oczywiście wpływu na wartość naukową rozprawy.

Wstęp

W tej części rozprawy Autorka przedstawia istotne informacje, które są pomocne w zrozumieniu zagadnień poruszanych w następnych częściach pracy oraz w analizie zaprezentowanych wyników badań. Znajdziemy tutaj informacje dotyczące: 1) typów oraz metabolizmu tkanki tłuszczowej, 2) procesu adipogenezy i jego regulacji, 3) stanu zapalnego tkanki tłuszczowej, 4) szczegółowej charakterystyki białka MCPIP1. Szczególnie wartościowa

wydaje się ta ostatnia część Wstępu, która powinna zostać opublikowana w formie artykułu poglądowego. Wskazane jednak jest zilustrowanie podanych informacji rycinami i schematami, co ułatwi czytelnikowi przyswojenie zaprezentowanej treści.

Część doświadczalna

Modelem doświadczalnym były komórki 3T3-L1, które różnicowano do adipocytów zgodnie z przyjętym powszechnie protokołem. W komórkach tych dokonano nadekspresji MCPIP1 za pomocą wektorów retrowirusowych lub wyciszenia za pomocą shRNA. Jest to wzorcowe podejście eksperymentalne pozwalające na szczegółową analizę roli MCPIP1 w metabolizmie adipocytów. Poza tym, do badań użyto wycinki podskórnej tkanki tłuszczowej pochodzenia ludzkiego oraz próby trzewnej tkanki tłuszczowej pochodzące od myszy db/db oraz myszy typu dzikiego. Rozdział „Techniki i narzędzia zastosowane w badaniach” przynosi dokładne opisy przeprowadzonych procedur eksperymentalnych. Ten szczegółowy opis metod z pewnością stanowić będzie kompendium metodyczne dla następnych doktorantów. Pokazuje on, że doktorantka opanowała szereg bardzo trudnych i czasochłonnych metod badawczych, takich jak: tworzenie konstruktyw genetycznych, analiza białek metodą Western blot, hodowle różnych linii komórkowych, PCR w czasie rzeczywistym czy też pomiar aktywności lucyferazy. Do tego dochodzi sumienna analiza statystyczna otrzymanych wyników za pomocą testu wariancji. Wszystko to potwierdza duży potencjał naukowy Doktorantki.

Jedynie z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na wykazanie kilku drobnych uchybień. W podrozdziale „Tworzenie konstruktyw genetycznych” nie podano procentowości żelu, który używano do rozdzielania produktu reakcji PCR. Nie wiadomo także jakie enzymy używano do trawienia otrzymanego DNA. W tabeli nr 4 brak jest informacji o numerze katalogowym dla przeciwciał MCPIP1 wyprodukowanych przez firmę Santa Cruz. Błędnie podano także informacje że „Badania dotyczące tkanek pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego były prowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej UJ”, ponieważ badania z użyciem zwierząt wykonuje się za zgodą Komisji Etycznej.

Wyniki

Jest to oczywiście najważniejsza i najciekawsza część rozprawy. Dane uzyskane w czasie realizacji pracy doktorskiej zostały przedstawione w postaci 16 złożonych rycin zaprezentowanych w rozdziale Wyniki oraz 4 rycin w części Dane uzupełniające. Rysunki są dosyć małe, dlatego też zaprezentowanie rezultatów w formie większych rycin ułatwiłoby czytelnikom analizę uzyskanych wyników. Do najciekawszych rezultatów otrzymanych przez

Doktorantkę z pewnością należy wykazanie, że: 1) poziom białka MCPIP1 wzrasta w komórkach 3T3-L1 w czasie ich różnicowania, co sugeruje, że białko to może być wykorzystywane także jako marker adipogenezy, 2) ekspresja genu MCPIP1 jest skorelowana z ekspresją C/ebp β oraz PPAR γ , 3) IL-1 β reguluje ekspresję MCPIP1 w preadipocytach, 4) w tkance tłuszczowej otyłych ludzi oraz myszy *db/db* poziom mRNA MCPIP1 jest podwyższony. Drobnym mankamentem jest brak informacji o jednostkach w jakich są wyrażane dane prezentowane na wykresach (choć oczywiście jest że są to jednostki umowne uzyskane po analizie PCR w czasie rzeczywistym lub densytometrycznej). Nie jest też jasne dlaczego część wyników przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe a inne jako średnią \pm błąd standardowy. Sposób prezentacji danych powinien być ujednoczony. Inna sprawa wymagająca wyjaśnienia to dlaczego w części eksperymentów komórki były różnicowane przez 6 dni a w innych 8 lub też 12? Czy nie miało to wpływu na uzyskiwane wyniki? Podsumowując, poza wyżej wymienionymi drobnymi uwagami, rozdział ten przynosi bardzo dużo interesujących danych. Część spostrzeżeń Doktorantka będzie mogła rozwinąć w przyszłych badaniach. Poza tym, tak jak i cała praca, rozdział ten jest napisany bardzo klarownym językiem.

Dyskusja

Uzyskane przez siebie wyniki Autorka omówiła w oparciu o najnowsze obserwacje opublikowane w piśmiennictwie światowym. Podkreślić chciałabym fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 178 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Barbara Lipert bardzo łatwo porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z metabolizmem adipocytów. Zastanawia mnie jednak, w jaki sposób można wyjaśnić fakt, że nadekspresja genu *Mcpip1* prowadzi do obniżenia ekspresji czynników transkrypcyjnych PPAR γ i C/ebp β , t.j. genów odpowiedzialnych za różnicowanie, (wyciszenie ekspresji *Mcpip1* daje odwrotny efekt) a jednocześnie wysoka zawartość białka MCPIP1 jest charakterystyczna, w wręcz wydaje się kluczowa, dla różnicowania adipocytów? Poza tym, na str. 70, doktorantka podzieliła czynniki stymulujące adipogenezę na: insulinę, która zwiększa wychwyt glukozy oraz na: deksametazon i IBMX, które indukują syntezę i gromadzenie lipidów. Taki podział wydaje się do końca prawidłowy, ponieważ deksametazon wpływa na dokomórkowy transport glukozy, zaś insulina jest bardzo aktywnym czynnikiem lipogennym. Chciałabym, aby doktorantka ustosunkowała się do tych 2 kwestii podczas obrony pracy.

Zwięzłe podsumowanie wyników badań i ich naukowego komentarza zawartego w Dyskusji Autorka zawarła w 11 wnioskach, które dobrze podsumowują prezentowane badania i są odpowiedzią na stawiane w pracy cele.

Podsumowanie

Przedstawioną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Autorka postawiła przed sobą interesujące cele, które osiągnęła przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Wnioski płynące z jej badań są bardzo istotne dla poznania mechanizmów regulujących różnicowanie preadipocytów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że znaczna część wyników zaprezentowanych w dysertacji została już opublikowana w pracy Lipert B, Wegrzyn P, Sell H, Eckel J, Winiarski M, Budzynski A, Matlok M, Kotlinowski J, Ramage L, Malecki M, Wilk W, Mitus J, Jura J (2014) Monocyte chemoattractant protein-induced protein 1 impairs adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res* 1843:780-8 (IF=5,019).

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Barbary Lipert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Dolnyś