

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Barbary Lipert pt. *Rola MCP1 w różnicowaniu preadipocytów*

Temat przesłanej mi do oceny rozprawy doktorskiej jest bardzo aktualny i ważny zarówno ze względów poznawczych, jak i potencjalnie praktycznych. Dotyczy poszukiwania molekularnych podstaw zależności pomiędzy rozwojem otyłości i chorób związanych z otyłością a stanem zapalnym tkanki tłuszczowej. Koncepcja przewlekłego stanu zapalnego tkanki tłuszczowej u osób otyłych oraz związane z procesem zapalnym zaburzenia adipogenezy są powszechnie akceptowane. Z kolei MCP1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1-Induced Protein 1*) jest indukowaną przez czynniki prozapalne endorybonukleazą, odgrywającą ważną rolę w procesie różnicowania komórek oraz w regulacji procesów zapalnych. Te fakty stały się podstawą postawionej przez doktorantkę hipotezy, według której potencjalne zmiany poziomu MCP1 w tkance tłuszczowej mogą wpływać na proces adipogenezy. Zasadniczym celem rozprawy było sprawdzenie tej hipotezy.

Prezentowane w tej rozprawie wyniki badań są logiczną kontynuacją i rozwinięciem badań zespołu prof. Jolanty Jury, promotora rozprawy, których część została opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Biochimica Biophysica Acta* w 2014 roku, a Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy. Doktorantka stosując różne linie komórkowe, głównie komórki 3T3-L1 oraz wiele nowoczesnych technik i narzędzi biologii molekularnej i komórkowej (jak np.: tworzenie konstruktyw genetycznych, mutageneza ukierunkowana, wektory retrowirusowe, modyfikacje genetyczne linii komórkowych, izolacja RNA z komórek i fragmentów tkanki tłuszczowej, qPCR, western blot) wykazała hamujący wpływ MCP1 na proces adipogenezy. Ponadto stwierdziła, że poziom MCP1 mRNA jest wyższy w tkance tłuszczowej myszy i ludzi otyłych w porównaniu do odpowiedniej kontroli (nieotyłych ludzi i myszy). Wyniki te, według Doktorantki, z czym również się zgadzam, wskazują na ścisłą zależność pomiędzy rozwojem otyłości a poziomem ekspresji MCP1 w tkance tłuszczowej zwierząt laboratoryjnych i człowieka. Z powyższych względów rozprawa doktorska mgr Barbary Lipert jest interesująca, oryginalna i ważna pod względem poznawczym i ma potencjalne znaczenie praktyczne.

Rozprawę doktorską rozpoczyna, obok spisu treści i wykazu stosowanych skrótów, *Wstęp* obejmujący ponad 20 stron. Pierwsza część *Wstępu* zawiera podstawowe informacje o: a) tkance tłuszczowej, jej rozmieszczeniu w organizmie oraz funkcji, b) adipogenezie ze szczególnym uwzględnieniem podstaw molekularnych tego procesu, a przede wszystkim roli czynników transkrypcyjnych z rodziny C/EBP i PPAR γ , c) stanie zapalnym tkanki tłuszczowej związanym z otyłością oraz chorobami związanymi z otyłością, d) hamowaniu adipogenezy przez stan zapalny tkanki tłuszczowej. W drugiej części *Wstępu* Doktorantka szczegółowo opisuje: a) charakterystykę MCPIP1, b) regulację ekspresji genu kodującego MCPIP1, c) regulację postranskrypcyjną MCPIP1, d) regulację na poziomie translacji MCPIP1, e) regulację postranslacyjną poziomu MCPIP1, f) mechanizm działania MCPIP1, a w szczególności wpływ tego białka na różnicowanie komórek i apoptozę. Opisane we *Wstępie* zagadnienia wprowadzają czytelnika w istotne problemy związane z przedmiotem realizowanej rozprawy doktorskiej. Ze *Wstępu* również jasno wynika cel podjętych badań, który został w pełni zrealizowany przez Doktorantkę przy zastosowaniu odpowiednich i nowoczesnych metod badawczych.

Generalnie *Wstęp* jest dobrze napisany. Muszę jednak, taka jest rola recenzenta, zwrócić uwagę na parę drobnych nieścisłości, które znalazły się w tym fragmencie rozprawy doktorskiej. Doktorantka wyjaśniając stosowane skróty pisze, że: a) „GSK3 β to kinaza syntezy glikogenu” (str. 5), a powinno być kinaza syntazy glikogenu, b) „PPAR γ to steroidowy receptor jądrowy, czynnik transkrypcyjny” (str. 6). Zgadza się, że PPAR γ to czynnik transkrypcyjny, mam jednak wątpliwości czy jest to typowy steroidowy receptor jądrowy. Na str. 8 Doktorantka pisze „(...) Zmagazynowane w komórkach tłuszczowych triacyloglicerole „(...) są substratami energetycznymi uwalnianymi w stanie głodu, po zadziałaniu odpowiednich sygnałów hormonalnych (...)”. Mam pytanie czy tylko w stanie głodu uwalniane są z tkanki tłuszczowej kwasy tłuszczowe, a nie triacyloglicerole jak można sądzić czytając tekst? Jeśli tak, to jak Autorka definiuje stan głodu (ile czasu musi upłynąć od ostatniego posiłku, aby rozpoczęło się uwalnianie kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej?). Opisując funkcję termogeniny Doktorantka pisze: „(...) termogenina (...) umożliwia egzotermiczne rozprężnięcie gradientu protonów bez generowania ATP (...)” (str. 8). Czy nie prościej brzmiałoby: termogenina to białko rozprężające oksydacyjną fosforylację? Mało precyzyjne są również stwierdzenia: a) „(...) po znaczącej utracie wagi przez otyłych (str. 9) (...)” (lepiej brzmi: utracie masy ciała), b) pęcznienie adipocytów (str. 9) (przypuszczam, że Autorka ma na myśli hipertrofię adipocytów), c) „(...) tiazolidinediony, stosowane powszechnie w leczeniu insulinooporności (...)” (str. 14) - mam wątpliwości czy

tiazolidinediony są powszechnie stosowane np. w Polsce, d) miażdżycy serca (str. 15), lepiej miażdżycy naczyń wieńcowych. Czy właściwe jest określenie tkanki tłuszczowej występującej u człowieka jako biała tkanka tłuszczowa? Wiadomo, że jest ona żółta i z tego powodu morfologowie nazywają ją żółtą tkanką tłuszczową (w odróżnieniu od białej występującej u myszy czy szczurów). W piśmiennictwie polskim częściej używa się pojęcia brunatna niż brązowa tkanka tłuszczowa na określenie drugiego typu tkanki tłuszczowej występującej u zwierząt i człowieka. Doktorantka używa pojęcia brązowa.

Doktorantka zaimponowała mi ilością stosowanych metod i ich opisem. Jest on bardzo szczegółowy i uwzględnia wiele różnych aspektów laboratoryjnych stosowanych metod. Jednak i w tej części rozprawy Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych nieścisłości. Na stronie 33 Doktorantka pisze, że „(...) Wektor docelowy trawiono używając (...) 20 U enzymu (...)”, a nie podaje nazwy enzymu? Dalsza część tego zdania jest niejasna. Na stronach 43 i 44 Doktorantka pisze, że pobierała do badań tkankę tłuszczową podskórną od ludzi i trzewną od myszy *db/db*. W *Wynikach* (str.68) i w *Streszczeniu* (str.89) pisze o poziomie „(...) mRNA kodującego MCPIP1 w podskórnej tkance tłuszczowej myszy i człowieka (...)”. Pytam więc jaką tkankę tłuszczową pobierano od myszy, podskórną czy trzewną? Moim zdaniem zbyt mało informacji Doktorantka zamieściła o stanie klinicznym pacjentów, zarówno z grupy kontrolnej, jak i z grupy pacjentów otyłych. Zdanie zamieszczone w części *Wyniki* „(...) Wycinki z grupy kontrolnej pobrane były w czasie zabiegów ginekologicznych (resekcja macicy) lub gastrologicznych (operacja na jelicie cienkim (...)” (str.68) to zbyt mało informacji o stanie klinicznym grupy kontrolnej. Tym bardziej, że nazwane przez Doktorantkę „operacje na jelicie cienkim” wykonywane są bardzo rzadko. Przypuszczam, że Autorkę interesuje tylko problem pacjent - otyły i nieotyły. Wiadomo jednak, że stan kliniczny (rodzaj choroby i jej stopień zaawansowania) może wpływać (choć nie musi) na ekspresję różnych genów w tkance tłuszczowej, w tym również genu kodującego MCPIP1. W tabeli na str. 38 przedstawiającej skład mieszaniny reakcyjnej należało podać jednostki objętości poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej.

Generalnie wyniki badań, zarówno ryciny, ich opis i tekst, przedstawione są poprawnie i czytelnie. Wydaje mi się jednak, że Doktorantka w tej części rozprawy doktorskiej niepotrzebnie powtarza niektóre fragmenty szczegółowo opisane w podrozdziale IV (*Techniki i narzędzia zastosowane w badaniach*). Na str.51, opisując wyniki przedstawione na Ryc. 2, Doktorantka pisze „(...) że aktywacja transkrypcji genu *Mcpip1* następowała tylko pod wpływem pożywki różnicującej zawierającej wszystkie trzy składniki

adipogenne (...)” (insulinę, deksametazon, IBMX). Zdanie to sugeruje, że jakakolwiek kombinacja dwóch składników (np. insulina + deksametazon) nie wpływała na ekspresję genu *Mcip1*. Czy było to sprawdzone? Niektóre Ryciny przedstawiają średnią \pm SEM, a inne średnią \pm SD. To też wymagało wyjaśnienia. Na Ryc. 16 A Doktorantka przedstawia poziom MCPIP1 mRNA w tkance tłuszczowej 4 osób nieotyłych i 4 otyłych (dla każdej osoby oddzielnie). Wyniki te wskazują, że tylko u dwóch osób otyłych poziom MCPIP1 mRNA w tkance tłuszczowej jest znacznie wyższy niż u osób nieotyłych. Moim zdaniem tylko tyle i aż tyle można powiedzieć o wynikach przedstawionych na tej Rycinie. Podawanie „p” dla tych dwóch osób otyłych (oddzielnie dla każdej) względem średniej dla osób nieotyłych jest moim zdaniem nieuprawnione. Nieco myląca jest również skala osi x na Rycinach przedstawiających „czas od indukcji adipogenezy”.

Rozdział *Dyskusja* jest ciekawy i dobrze napisany. W pierwszej jego części Doktorantka przedstawia zalety i ograniczenia stosowanego modelu doświadczalnego do śledzenia adipogenezy, określając 4.5g/L glukozy w medium „(...) podwyższonym stężeniem (...)”. Ja bym nazwał takie stężenie glukozy bardzo wysokim, gdyż kilkakrotnie przekracza stężenie fizjologiczne. Zgadzam się jednak z Doktorantką, że model ten jest powszechnie stosowany w badaniach nad adipogenezą. Następnie Doktorantka omawia ekspresję genu *Mcip1* w czasie adipogenezy, sugerując na podstawie wyników własnych oraz opublikowanych przez innych autorów, że MCPIP1 może działać jako „włacznik” różnicowania komórek. Autorka proponuje również, że MCPIP1 hamując aktywność szlaku NF- κ B oraz ekspresję niektórych miRNA, może działać jako naturalny inhibitor procesu zapalnego. W dalszej części *Dyskusji* Doktorantka omawia hamujący wpływ MCPIP1 na poziom C/ebp β oraz Ppary w komórkach 3T3-L1 i dyskutuje te wyniki z wynikami publikowanymi przez innych autorów. Przedstawia również dane, które wskazują, że zmniejszenie poziomu C/ebp β nie wynika z zahamowania transkrypcji, a jest skutkiem degradacji transkryptu C/ebp β .

Związek pomiędzy otyłością a poziomem ekspresji *MCPIP1* sugerują również wyniki badań przeprowadzone przez Autorkę rozprawy na wycinkach tkanki tłuszczowej pobranej od osób otyłych. Wskazują one znacznie wyższą ekspresję *MCPIP1* w tkance tłuszczowej osób otyłych w porównaniu do nieotyłych (przy zastrzeżeniach podanych powyżej). Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia na zdecydowanie większej grupie osób otyłych i nieotyłych. *Dyskusję* kończy podrozdział *Perspektywy rozwoju badań nad rolą MCPIP1 w rozwoju otyłości*, w którym Autorka stwierdza, że „(...) zahamowanie indukcji MCPIP1, może stanowić jedno z teoretycznie efektywnych podejść terapeutycznych (...)” w leczeniu otyłości

oraz chorób z nią związanych. To stwierdzenie wydaje mi się przedwczesne, jakkolwiek mające pewne doświadczalne podstawy przedstawione w ocenianej rozprawie.

Oceniając *Dyskusję* mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez Doktorantkę dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w pracy problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań. Pragnę jednak nadmienić, że pewne zdania w dyskusji są zbyt odważne i zawarte w nich treści wymagają potwierdzenia dalszymi badaniami.

Całość rozprawy kończy: 11 wniosków, dwustronicowe streszczenie oraz 178 pozycji piśmiennictwa. Moim zdaniem podrozdział *Wnioski* jest zbyt rozbudowany i bardziej przypomina streszczenie niż wnioski. Streszczenie, zawiera podstawowe informacje o rozprawie doktorskiej takie jak: a) syntetyczne wprowadzenie w temat pracy, b) przedstawienie jej zasadniczego celu, c) krótkie omówienie modelu doświadczalnego, d) najważniejsze wyniki oraz e) wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Po przeczytaniu streszczenia miałem jasny pogląd na temat naukowej wartości całości ocenianej rozprawy doktorskiej.

Za najciekawsze i oryginalne osiągnięcie Doktorantki przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej uważam wykazanie: a) zależności pomiędzy ekspresją genu kodującego MCPIP1 a adipogenezą, b) hamującego wpływu MCPIP1 na adipogenezę oraz c) udziału domeny rybonukleazowej PIN MCPIP1 w regulacji poziomu transkryptu C/EBP β w tkance tłuszczowej. Nie mam wątpliwości, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki w istotny sposób wzbogacają wiedzę na temat roli MCPIP1 w procesie adipogeny, a dalsze badania nad rolą tego białka w rozwoju otyłości i chorób z nią związanych są w pełni uzasadnione. Osiągnięcie tych wartościowych wyników wymagało od Doktorantki: a) doskonałego przygotowania teoretycznego z zakresu biochemii i biologii molekularnej tkanki tłuszczowej oraz biologii komórkowej, b) ogromnego nakładu pracy oraz dużego doświadczenia laboratoryjnego, c) znajomości różnorodnych, nowoczesnych technik biologii molekularnej i biologii komórkowej. Należy również dodać, że realizacja badań w doświadczonym zespole naukowym, jakim jest zespół kierowany przez prof. Jolantę Jurę, umożliwiła osiągnięcie tych wartościowych wyników.

Krytyczne uwagi i wątpliwości, które zaznaczyłem powyżej, mają charakter czysto akademicki i dotyczą problemów związanych z przygotowaniem tego opracowania. Wspomniane nieścisłości czy drobne błędy wynikają prawdopodobnie z dużej ilości

wyników, które należało zebrać, opracować i opisać oraz z braku czasu na bezbłędne przygotowanie edytorskie rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Barbara Lipert jest pełni w ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami i narzędziami biologii molekularnej i komórkowej, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych. Jej rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Barbary Lipert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Julian Świerczyński