



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 5892 207; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Anna Filipek
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: a.filipek@nencki.gov.pl
tel. (48-22) 5892 332

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Wawro pt. „Rola biologiczna białek z rodziny MCPIP”

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pana mgr. Mateusza Wawro jest określenie funkcji białek z rodziny MCPIP, a w szczególności MCPIP2-4. W pierwszej części Autor rozprawy skupił się na sprawdzeniu, czy białka te powodują destabilizację transkryptu mRNA interleukiny 6 (IL-6), substratu wcześniej już scharakteryzowanego białka MCPIP1. W drugiej części pracy mgr Wawro zajął się charakterystyką najmniej poznanego przedstawiciela omawianej rodziny białek, a konkretnie określeniem ekspresji i funkcji białka MCPIP2.

Stan zapalny ma na celu obronę organizmu przed różnego rodzaju czynnikami uszkadzającymi, a jego przebieg zarówno na poziomie komórki jak i całego organizmu jest ściśle kontrolowany. Kontrola ta dotyczy ekspresji wielu genów, a w konsekwencji syntezy białek zaangażowanych w odpowiedź zapalną. Jak wiadomo, badanie regulacji ekspresji to nie tylko analiza promotorów poszczególnych genów i wiążących się z nimi czynników transkrypcyjnych, ale także badanie regulacji stabilności transkryptów. W nurt tego drugiego zagadnienia wpisuje się praca doktorska mgr. Mateusza Wawro, która dotyczy badania funkcji białek MCPIP posiadających aktywność RNazową i wpływających na stabilność transkryptów różnych białek ważnych w przebiegu stanu zapalnego, w tym cytokin IL-6, IL-1 β czy IL-2.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa liczy 135 stron i ma klasyczny układ. Zawiera: Wykaz najważniejszych skrótów, Wstęp, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz rycin, Wykaz tabel oraz Spis literatury. Jeśli chodzi o Literaturę to składa się na nią 120 pozycji (zdarza się, że niektóre pozycje są niekompletne, np. pozycja 60 czy 76), z czego prawie połowa pochodzi z lat 2010-2015, co świadczy o bardzo aktualnej tematyce podjętych badań.

We Wstępie obejmującym 21 stron, w tym 2 ryciny, Doktorant przedstawia informacje dotyczące budowy transkryptów genów eukariotycznych, ścieżek degradacji mRNA oraz dane dotyczące kontroli jakości i stabilności mRNA. W końcowej części ostatniego podrozdziału, mgr Wawro przedstawiona jest dość szczegółowo charakterystyka rodziny białek MCPIP, które są przedmiotem badań Doktoranta. We Wstępie brakuje mi podania masy cząsteczkowej poszczególnych białek MCPIP, a inne uwagi do tej części pracy są następujące: 1) Białka czy też RNA wiążą się „z” a nie „do” (np. str. 19, 4 linia od dołu „wiążanie do mRNA.”). 2) Na tej samej stronie pojawił się w tekście termin „pełne białko”; domyślam się, że chodziło o „białko pełnej długości”. 3) Na str. 21, w paragrafie dotyczącym białka TTP Autor pisze o fosforylacji przez kinazy MK2 i ERK-1; tu mam pytanie, czy fosforylacja w opisywanym przypadku rzeczywiście zachodzi tylko z udziałem ERK-1, czy też może z udziałem ERK1/2? Wymienione uwagi są bardzo drobne i nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę tej części rozprawy. Reasumując, Wstęp napisany jest w przejrzysty i logiczny sposób, poprawną polszczyzną co sprawia, że jego czytanie jest dużą przyjemnością. Znakomicie wprowadza też czytelnika w zagadnienia przedstawione w kolejnych rozdziałach rozprawy.

Cele rozprawy są poprawnie i jasno określone. Rozdział Materiały, obejmujący 5 stron, zawiera spis i źródło pochodzenia stosowanych linii komórkowych jak też odczynników do hodowli, białek, plazmidów, bakterii, odczynników do klonowania, przeciwciał i innych materiałów niezbędnych do realizacji badań.

W kolejnej części rozprawy obejmującej 32 strony, w tym 10 tabel, Doktorant opisuje metody, którymi posługuje się w trakcie swoich badań. Są to m.in., metody 1) z zakresu biologii molekularnej i biochemii np.: otrzymywanie wektorów do transfekcji komórek eukariotycznych i bakterii, PCR w czasie rzeczywistym, przygotowanie lizatów białkowych, immunoprecypitacja, pomiary aktywności lucyferazy, oczyszczanie białek rekombinowanych, izolowanie RNA, rozdział elektroforetyczny białek i DNA, Western blot oraz 2) metody związane z biologią komórki, np.; hodowla, transfekcja i różnicowanie komórek, testy proliferacji, analizy mikroskopowe, w tym smRNA-FISH. Należy podkreślić, że wachlarz

stosowanych metod jest imponujący. Metody dobrane są adekwatnie do celów i zakresu zaplanowanych przez Doktoranta badań. Ich opis jest klarowny i bardzo wyczerpujący, z pewnością umożliwiając powtórzenie doświadczeń. Zastanawiałabym się czy przedstawione metody nie powinny być pogrupowane, np. na metody biologii molekularnej, biochemii czy metody biologii komórki. Drobne uwagi do tej części są następujące: 1) Na str. 53, pierwsze zdanie paragrafu dotyczącego porównania ekspresji, powinno brzmieć nieco inaczej, a mianowicie „W celu sprawdzenia, czy ekspresja białek typu dzikiego i ich wersji zmutowanych zachodzi na tym samym/porównywalnym poziomie komórki...”; jeśli uważamy, że ekspresja jest równa to nie ma potrzeby jej sprawdzania. 2) W ostatnim zdaniu wspomnianego paragrafu napisałabym, że analizowano poziom a nie ekspresję białek przy użyciu metody Western blot. 3) Na str. 53 nie do końca zrozumiałam jest dla mnie opis przygotowania lizatów i rozdziału białek w elektroforezie SDS-PAGE. Zwykle komórki poddaje się lizie, następnie oznacza stężenie białka, odmierza taką objętość, aby każda ścieżka w żelu zawierała jednakową ilość białka, dodaje bufor obciążający, denaturuje w 95°C i poddaje rozdziałowi w żelu. Moje pytanie brzmi, czy Doktorant robił to inaczej, czy też przedstawiony opis jest niepełny? 4) Nie znalazłam danych dotyczących gęstości komórek użytych do transfekcji oraz wydajności transfekcji (jest tylko wzmianka w Dyskusji o wydajności transfekcji komórek 293T). 5) Na str. 55 opis składu buforu do transferu nie zawiera SDS, czy to przeoczenie, czy rzeczywiście bufor nie zawierał SDS? Zwykle SDS ułatwia transfer białek z żelu na membranę; czy zatem membrany były barwione Ponceau S, a jeśli nie to czy żele SDS po transferze były barwione Coomassie w celu określenia efektywności transferu? Chciałabym też zwrócić uwagę, że określenie „przy pomocy” dotyczy raczej osoby a nie sprzętu. W odniesieniu do sprzętu (str., 61, paragraf „Obserwacje mikroskopowe”) napisałabym „przy użyciu”, czy też „z zastosowaniem” mikroskopu.

Kolejny rozdział Wyniki obejmuje 30 stron i poparty jest 20 rycinami. W Części 1 Doktorant analizuje sekwencje aminokwasowe oraz przedstawia schemat budowy białek MCPIP, następnie opisuje wybór linii komórkowej z wysoką wyjściową ekspresją IL-6 (stosowany termin „bazalna ekspresja” nie jest najwłaściwszy), wpływ białek rodziny MCPIP na poziom transkryptu *IL-6* oraz określa, czy wpływ ten zachodzi poprzez rejon 3'UTR mRNA *IL-6*. Następnie w rejonie 3'UTR mRNA *IL-6* Doktorant identyfikuje fragmenty odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami MCPIP2-4, określa w tych białkach rolę domeny NYN/PIN-podobnej w destabilizacji mRNA *IL-6* oraz wpływ białek MCPIP2-4 na stabilność transkryptu MCPIP1. Pod koniec Części 1 opisuje wyniki badań będących próbą określenia aktywności RNazowej białka MCPIP4 w teście *in vitro*. W Części 2 Doktorant

zajmuje się charakterystyką najmniej poznanego białka badanej rodziny, MCPIP2. W szczególności opisuje wyniki dotyczące ekspresji tego białka w tkankach ludzkich i kilku ludzkich liniach komórkowych oraz wpływ różnych czynników na poziom mRNA MCPIP2 w komórkach neuroblastoma SH-SY5Y. Uwagi/sugestie do rozdziału Wyniki są następujące: 1) W rozdziale pt. "Analiza sekwencji aminokwasowej białek rodziny MCPIP" można byłoby procentowo określić podobieństwo między daną domeną w różnych białkach rodziny MCPIP i podać taką informację w tekście lub na rycinie. 2) Jeśli chodzi o modyfikacje to w jęz. polskim stosuje się termin potranslacyjne, a nie post-translacyjne (str. 72). 3) Nie znalazłam rozwinięcia skrótu VEGFA (str. 75). 4) Zamiast „zmutowano” (str. 78) powinno być raczej „zastąpiono/zamieniono”. 5) Na str. 81, 3 linia od góry, napisano, że „komórki U373 poddano transfekcji”, a w opisie pod ryciną 12 przedstawiającą wyniki tych badań napisano, że transfekowano komórki Hela; tu prośba o wyjaśnienie. Również zwrot „jak widać na rycinie 10” chyba na skutek tworzenia kolejnych wersji pracy nie został usunięty (str. 81, 9 linia od góry). 6) Na str. 83 drobna nieścisłość dotyczy opisu oczyszczania białka. Zdanie „W pierwszym etapie wstępnie oczyszczono białka na złożu kobaltowym z użyciem metki 6xHis” jest nielogiczne i powinno brzmieć „W pierwszym etapie wykorzystując fakt, iż białko posiada metkę 6xHis, oczyszczono je na złożu kobaltowym”. 7) Na str. 85, na rycinie 13 brak oznaczeń A i B. 8) Str. 87, termin „tkanki immunologiczne” nie jest poprawny i powinien być zastąpiony terminem „układ odpornościowy”. 9) Str. 91, 3 linia od góry, Doktorant pisze, że sprawdza wzór ekspresji, a tak naprawdę metodą Western blot określa się poziom białka. Poważniejsza uwaga, jeśli chodzi o Wyniki, dotyczy analizy statystycznej. Bywa, że na rycinach nie zaznaczono odchylenia standardowego, istotności statystycznej bądź jej braku, a bywa też tak, że istotność ta określana jest na podstawie wyników z 2 doświadczeń. Wydaje mi się, że w celu opublikowania uzyskanych wyników, w przypadku niektórych doświadczeń, niezbędne będzie wykonanie kolejnych powtórzeń.

Rozdział Dyskusja napisany jest bardzo ciekawie. Faktycznie w sposób wyczerpujący przedyskutowane są wyniki, a nie przedstawione ich podsumowanie, jak to czasami ma miejsce w innych rozprawach. Z treści Dyskusji wynika, że Doktorant doskonale zna piśmiennictwo dotyczące szerokiego zagadnienia jakim są mechanizmy regulacji ekspresji genów. Warto też podkreślić, że omawiając wyniki własne i te opisane w literaturze Doktorant przedstawia propozycje badań, które pozwoliłyby lepiej poznać funkcję białek MCPIP jak też regulację ich ekspresji. Po rozdziale Dyskusja Autor rozprawy, w bardzo wyważony sposób, przedstawia Podsumowanie wyników i wnioski. Chociaż nie jest to

wymagane w rozprawach to trochę brakuje spisu publikacji Doktoranta, który uwzględniałby również manuskrypty wysłane bądź przygotowywane do druku.

Podsumowując, Pan mgr Mateusz Wawro podjął w swojej pracy ciekawy i ważny temat. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń Doktorant określił właściwości białek z rodziny MCPIP. Uzyskane wyniki mają charakter nowatorski i stanowią wartościowy materiał do kolejnych badań. Szczególnie istotne są wyniki dotyczące białka MCPIP2, gdyż jak dotąd praktycznie nie było danych na ten temat. Na zakończenie pragnę też podkreślić, że rozprawa zawiera wiele wątków tematycznych, co wymagało od Doktoranta zapoznania się i opanowania wielu technik badawczych. Jeśli chodzi o stronę edytorską i graficzną to rozprawa przygotowana jest bardzo starannie. Ryciny i tabele są czytelne; spotkać można jedynie nieliczne literówki i niepoprawne sformułowania. Bardziej daje się odczuć, w tekście całej rozprawy, częsty brak przecinków. Wszystkie te wymienione powyżej nieścisłości są jednak mało istotne i nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy.

Wniosek końcowy: Przedstawiona mi do oceny rozprawa całkowicie spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), i w związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. Mateusza Wawro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Filipek



Warszawa, 23 marca 2016