



poniedziałek, 7 stycznia 2019

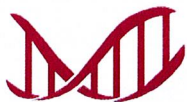
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Eweliny Dobosz „Rola białka MCP-1 w regulacji homeostazy komórek nabłonkowych poprzez kontrole ekspresji IL-8”.**

Jednym z istotnych elementów wrodzonych mechanizmów odpornościowych jest obecność bakterii komensalnych, zasiedlających skórę oraz błony śluzowe układu pokarmowego, oddechowego oraz moczowo-płciowego, które bezpośrednio lub pośrednio, poprzez syntetyzowane związki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, działają antagonistycznie w stosunku do patogennych mikroorganizmów. Masywna obecność mikroflory komensalnej determinuje stan tolerancji makroorganizmu na jej antygeny, chroniąc tym samym przed rozwojem niekontrolowanej reakcji zapalnej. Z drugiej strony makroorganizm musi być jednak przygotowany do sprawnego rozpoznawania i eliminacji drobnoustrojów chorobotwórczych poprzez indukowanie współdziałających ze sobą elementów nieswoistej i swoistej odpowiedzi odpornościowej. Jednym z zasadniczych mechanizmów wzbudzonej odpowiedzi odpornościowej jest reakcja zapalna, która jednak może przyczyniać się nie tylko do eradykacji drobnoustrojów, ale w przypadku zaburzeń funkcjonalnych ze strony mechanizmów przeciwzapalnych, odpowiedzialnych za kontrolowany jej przebieg, może prowadzić także do patologicznych zmian, związanych z uszkodzeniem tkanek, i być przyczyną wielu stanów chorobowych takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów czy przewlekłe choroby zapalne układu pokarmowego. Dlatego też niezbędnym warunkiem funkcjonalnie prawidłowej odpowiedzi odpornościowej jest ściśle kontrowany przebieg reakcji zapalnej prowadzący do jej ograniczenia po eliminacji czynnika infekcyjnego. Mechanizmy związane z kontrolą reakcji zapalnej, a szczególnie udział w tych procesach białka MCP-1 stanowiły przedmiot zainteresowań Doktorantki. Biorąc pod uwagę wciąż ograniczoną wiedzę o funkcji białka



MCPIP-1 w kontroli homeostazy, oraz odpowiedzi na infekcje, szczególnie w komórkach nabłonkowych, cele badawcze postawione przed Doktorantką należy uznać za w pełni uzasadnione i niezwykle ciekawe.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący struktury i funkcji nabłonka oraz jego roli podczas infekcji w tym rozpoznawania patogenów, produkcji cząsteczek efektorowych, rekrutacji neutrofilii oraz powrotu tkanki do homeostazy. Doktorantka opisuje także patogenezę chorób nabłonka oraz mechanizmy warunkujące utrzymanie jego homeostazy. Ze względu na postawiony cel pracy opisano także budowę i funkcję białka MCPIP-1 oraz jego rolę w procesie infekcji.

Wstęp pracy jest napisany bardzo ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również głęboko przemyślany i ściśle związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi Doktorantki.

**W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o dodatkowe informacje.**

- 1- Czy znane są polimorfizmy w genie (lub jego sekwencji promotorowej) kodującym białko MCPIP-1, czy obecność tych polimorfizmów udało się powiązać z jakimiś konkretnymi jednostkami chorobowymi ?
- 2- Jaką rolę pełni MCPIP-1 w biogenezie ludzkiego microRNA?

W rozdziale „Materiały i Metody” autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie całej gamy metod immunologicznych i genetycznych dla pełnej charakterystyki funkcjonalnej białka MCPIP-1 w komórkach nabłonkowych. Uważam, że po realizacji założeń pracy Doktorskiej pani Ewelina Dobosz jest badaczem świetnie przygotowanym w zakresie immunologii i genetyki do pracy w nowoczesnym laboratorium naukowym i/lub klinicznym.

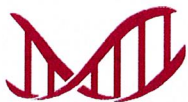
Część eksperymentalną autorka rozpoczęła od porównania konstytutywnej ekspresji MCPIP-1 w leukocytach i komórkach nabłonkowych. Badania na poziomie transkryptów oraz produktu białkowego jednoznacznie wykazały wysoki poziom MCPIP-1 w większości badanych



komórek nabłonkowych oraz niski w komórkach odpornościowych. Spośród komórek nabłonkowych najwyższą ekspresją MCPIP-1 charakteryzowała się linia raka szyjki macicy HeLa, która została wybrana jako model do dalszych badań. Na podstawie zamieszczonej w pracy Ryc. 1 (str. 75) nie mogę się do końca zgodzić z konkluzją Doktorantki, że „poziom białka w testowanych komórkach koreluje z poziomem mRNA”. Z panelu D (Ryc. 1) wynika, że poziom białka MCPIP-1 w linii HeLa jest kilkukrotnie wyższy niż w linii Caco, natomiast relatywna ekspresja genu (panel C) dla obu linii jest na tym samym poziomie. Trudno też na podstawie Ryc. 1D określić poziom białka MCPIP-1 w linii HEK293T. Charakteryzując wybraną do badań linię komórkową Doktorantka wykazała brak zmian w ekspresji badanego białka i ilości uwalnianych cytokin w kolejnych pasażach oraz brak znaczących zmian po działaniu agonistów receptorów TLR (z wyjątkiem TLR3).

Badanie roli MCPIP-1 w fizjologii komórek nabłonkowych autorka rozpoczęła od wyciszenia ekspresji genu z zastosowaniem zarówno siRNA jak i shRNA czego efektem było wzmożenie wydzielania chemokiny IL-8 a także IL-6 będącej znanym substratem dla MCPIP-1. Analiza innych chemokin (CCL-5 oraz CXCL-10) wykazała również ich podwyższony poziom w komórkach z wyciszoną ekspresją badanego białka. Wydaje mi się, że przedstawione wyniki na Ryc. 5 i 6 (str. 82-83, wyciszenie shRNA) nie do końca uzasadniają stwierdzenie Doktorantki, że „Komórki HeLa z wyciszoną ..... wykazywały **nieznacznie** podwyższony poziom zarówno CCL-5 jak i CXCL-10 ..... Obserwacja ta wskazuje, że IL-8 jest główną chemokina regulowaną przez MCPIP-1”. **Czy różnice w spadku w poziomie białek CCL-5 i CXCL-10 po wyciszeniu shRNA w porównaniu do spadku poziomu białka IL-8 (shRNA) wykazują znamienność statystyczną?** Doktorantka analizowała także poziom IL-8 oraz IL-6 w warunkach nadprodukcji MCPIP-1. Wzrost ilości MCPIP-1 jednoznacznie korelował ze spadkiem poziomu obu badanych cytokin. Dbalność o jakość eksperymentów i prawidłowe kontrole skłoniła Doktorantkę do weryfikacji uzyskanych wyników z zastosowaniem linii Caco-2. Również w tym przypadku wyciszenie ekspresji MCPIP-1 miało swoje odzwierciedlenie w poziomie IL-8. Ponadto Doktorantka wykazała, że białko MCPIP-1 kontroluje wydzielanie IL-8 przez komórki nabłonkowe nie tylko w stanie spoczynkowym, ale również po infekcji pałeczkami okrężnicy.

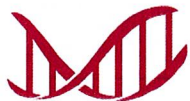
Za bardzo cenną część pracy uważam także przeprowadzone przez Panią Ewelinę Dobosz eksperymenty zmierzające do poznania mechanizmu regulacji poziomu IL-8 przez białko



MCPIP-1. Autorka wykazała obecność w regionie 3'UTR mRNA dla IL-8 charakterystycznej struktury II-rzędowej typu „spinki” o dużej stabilności, zdolność do wiązania transkryptu przez „dziką” i zmutowaną formę białka, oraz degradację mRNA-IL-8 tylko w obecności „dzikiej” formy białka wykazując jednoznacznie, że poziom IL-8 jest regulowany przez aktywność RNAzową MCPIP-1. **Ciekawy jestem czy próbowano na podstawie sekwencji 3'UTR tworzącej substrat dla MCPIP-1 identyfikować in silico obecność miejsc wiązania tej RNAzy również w 3'UTR mRNA innych cytokin, które nie były dotąd identyfikowane eksperymentalnie jako substraty dla MCPIP-1? Czy Doktorantka rozważała poszukiwania nieznanymi dotąd substratów dla MCPIP-1 z zastosowaniem immunoprecypitacji kompleksów białko/mRNA (RIP-Seq) w połączeniu z masowym sekwencjonowaniem?** Doktorantka wykazała również, że degradacja mRNA nie jest jedynym mechanizmem regulacji poziomu IL-8 przez białko MCPIP-1, a proces ten odbywa się również poprzez wpływ MCPIP-1 na zmiany aktywacji NF- $\kappa$ B, prawdopodobnie poprzez deubikwitynazową aktywność MCPIP-1.

W dalszej części pracy autorka badała wpływ infekcji bakteryjnej na MCPIP-1 komórek nabłonka. Doktorantka zaobserwowała, że infekcja bakteriami gramujemnymi (ale nie gramododatnimi) prowadzi do spadku poziomu białka MCPIP-1. Nie obserwowano natomiast spadku w tych samych warunkach poziomu mRNA dla badanego białka. Szybki spadek poziomu MCPIP-1 podczas infekcji *E.coli* miał konsekwencje we wzroście ilości IL-8 oraz IL-6. Badając podłoże molekularne obserwowanego zjawiska Doktorantka wykazała, że zablokowanie receptora TLR4 lub zastosowanie LPS nie wpływa na obniżenie poziomu białka MCPIP-1, natomiast użycie termicznie inaktywowanych bakterii przekłada się na spadek ilości badanego białka. **Jakie inne, specyficzne dla bakterii gramujemnych, termostabilne komponenty komórkowe autorka rozważa jako potencjalny czynnik indukujący spadek poziomu MCPIP-1 podczas infekcji? Czy podjęto próby zastosowania różnych LPS o znanej budowie części O-swoistej?** W dobrze zaplanowanych eksperymentach Doktorantka wykazała, że proces biosyntezy MCPIP-1 podczas infekcji nie jest zaburzony a obserwowany spadek poziomu białka jest efektem połączenia regulacji proteasomalnej oraz aktywności enzymatycznej negatywnego białka regulatorowego MALT-1.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.



Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę mają silne podstawy w prezentowanych wynikach i można uznać je jako w pełni uprawnione.

#### Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Eweliny Dobosz uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

