

Kraków, 28 maja 2013 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

RECENZJA

Rozprawy Doktorskiej mgr Łukasza Skalniaka
pt. „MCPIP1 contributes to MB-132 toxicity by the inhibition of
constitutive NF- κ B”

W przedstawionej do oceny Rozprawie Doktorskiej podjęto się trudnego zadania scharakteryzowania mechanizmów molekularnych, poprzez które IL-1 β aktywuje gen kodujący MCPIP1. Białko to, indukowane przez czynnik MCP-1, jest jednym z białek zaangażowanych w negatywną regulację stanu zapalnego, jego ekspresja jest silnie wzmacniana przez mediatory pozapalne. Z uwagi na wyniki wstępne wskazujące na kluczową rolę w tych procesach czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, skupiono się na określeniu mechanizmów molekularnych tej regulacji. Ponadto, biorąc pod uwagę rolę proteasomu w regulacji stabilności MCPIP1, przeprowadzono pogłębioną analizę tych mechanizmów w regulacji ekspresji MCPIP1. W trakcie badań okazało się, że zahamowanie proteasomu przez inhibitor MG-132 prowadzi do wzrostu ekspresji MCPIP1 oraz że MCPIP1 może hamować aktywację NF- κ B – dlatego też rozszerzono cele badawcze o sprawdzenie jakie molekularne mechanizmy leżą u podstaw tych zjawisk.

Wstęp Rozprawy, napisanej w języku angielskim w sposób bardzo staranny i klarowny, szczegółowo przedstawia ścieżki sygnałowe, w których kluczową rolę pełni NF- κ B – poprzez przedstawienie podstawowych informacji o tym czynniku transkrypcyjnym, o dotychczas znanych mechanizmach jego aktywacji a także o zaangażowaniu tego czynnika w regulację przeżywalności komórek, m.in. poprzez ochronę komórek przed indukowaną apoptozą. Szeroko została przedstawiona rola NF- κ B w procesach nowotworzenia. Następnie omówiono podstawy funkcjonowania kompleksu

Wydział
Biochemii, Biofizyki
i Biotechnologii

Zakład Biochemii Fizycznej
Prof. dr hab. Marta
Dziedzicka-Wasylewska

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 61 22
fax +48(12) 664 69 02
email: marta.dziedzicka-
wasylewska@uj.edu.pl

proteasomowego oraz strategię hamowania proteasomu w terapii przeciwnowotworowej.

Dalszą część Wstępu poświęcono szczegółowej charakterystyce białka MCPIP1, jego odkryciu, aspektom strukturalnym, regulacji transkrypcji oraz molekularnym mechanizmom funkcjonowania tego białka – szczególnie jego roli jako czynnika transkrypcyjnego oraz bardzo ważnej aktywności RNazowej skierowanej zwłaszcza wobec transkryptów kodujących cytokiny a także interferencję MCPIP1 w ścieżkach przekazu sygnału od receptorów błonowych do NF- κ B, co skutkuje hamowaniem ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne. Fascynująca historia tych odkryć jest świetnie opisana, poprzez krytyczne ukazanie różnych poglądów dostępnych w literaturze naukowej, opisywanych w oparciu o wyniki uzyskane w różnych modelach badawczych.

Metodyka zastosowana w Rozprawie jest bardzo zaawansowana. Należy podkreślić ogrom technik z zakresu biologii molekularnej (szczególnie stworzenie wielu skomplikowanych konstruktów i mutantów delecyjnych), którymi Doktorant swobodnie się posługuje. W badaniach zastosowano dwie linie komórkowe, HepG2 oraz HeLa, które transfekowano odpowiednimi konstruktami oraz wiele technik, takich jak m.in. test opóźnienia migracji w żelu, EMSA, wyciszanie genów techniką siRNA, PCR w czasie rzeczywistym, Western blotting, zastosowanie pomiaru aktywności lucyferazy do pomiaru aktywności transkrypcyjnej, pomiary aktywności kaspaz, zróżnicowane testy żywotności komórek rozszerzone o pomiary mikroskopowe, badanie zaangażowania kaskady kinaz MAP z zastosowaniem rozlicznych inhibitorów poszczególnych ścieżek tej kaskady.

Wyniki przedstawiono na 21 złożonych rycinach – ogrom pracy włożonej w ich uzyskanie robi wielkie wrażenie.

Wykazano na podstawie licznych danych eksperymentalnych, że ekspresja białka MCPIP1 ulega nasileniu w obecności inhibitora

proteasomu, związku MG-132. Stosując m.in. cykloheksimid wykazano, że nie jest to efekt zwiększenia stabilności w warunkach zahamowania aktywności proteasomu a raczej wynika ze zwiększenia syntezy białka *de novo* a z kolei blokada transkrypcji z wykorzystaniem aktynomycyny D wykazała znaczenie wzrostu poziomu mRNA dla zwiększonej ekspresji MCPIP1.

Dalsze badania wykazały, że zmniejszenie poziomu MCPIP1 wywołało wzrost oporności badanych komórek na toksyczne działanie związku MG-132, co zinterpretowano jako wynik hamującego wpływu tego białka na aktywność czynnika NF- κ B. Określono molekularny mechanizm tego działania z zastosowaniem wektora zawierającego gen reporterowy pod kontrolą miejsc wiązania dla NF- κ B oraz poprzez test opóźnienia migracji w żelu, EMSA – wykazując, że MCPIP1 zmniejsza zdolność wiązania podjednostek p65 NF- κ B do sond bez obecności czynników aktywujących NF- κ B. Ponadto, wykazano zaangażowanie MCPIP1 w toksyczność związku MG-132 poprzez hamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co – wspólnie z danymi uzyskanymi przez innych autorów – może prowadzić do wniosku, iż opisane własności białka MCPIP1 mogą być wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej.

Dyskusja uzyskanych wyników jest bardzo dojrzała, podzielona na podrozdziały, w których w sposób bardzo staranny przedstawiono uzyskane wyniki w kontekście danych literaturowych. Tak więc omówiono wykazane zaangażowanie czynnika NF- κ B oraz systemu Elk-1/SRF w indukcję genu kodującego MCPIP1, molekularne mechanizmy działania inhibitora proteasomu, związku MG-132, zaangażowanie MCPIP1 w regulację czynnika NF- κ B przez IL-1 β oraz w regulację konstytutywnej aktywności tego czynnika a także dogłębnie scharakteryzowano udział proteasomu w regulacji aktywności NF- κ B na różnych poziomach i rolę białka MCPIP1 w tych procesach, także biorąc pod uwagę różnice wynikające z linii komórkowych użytych do

badania. Bardzo ciekawy jest konkludujący rozdział Dyskusji, w sposób dojrzały i krytyczny przedstawia ewentualną rolę białka MCPIP1 jako celu terapii przeciwnowotworowej.

Całość jest zakończona rozdziałem pt. „Wnioski i perspektywy”, jeszcze raz podsumowującym główne dane uzyskane w niniejszej Rozprawie Doktorskiej.

Drobiazgi, na które chciałabym zwrócić uwagę to:

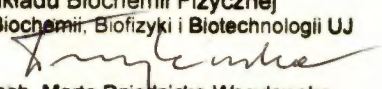
- Nie ma danych na temat liczby pasaży komórek, które były stosowane jako obiekt badań;
- Nie znalazłam danych, jak namnażano rozliczne plazmidy stosowane później do transfekcji komórek eukariotycznych;
- Na jakiej podstawie wybrano gen eEF2 jako gen referencyjny w technice qPCR – czy jest on stabilny w komórkach nowotworowych? (bo np. w nowotworach układu pokarmowego jego ekspresja wzrasta i bierze nawet udział w regulacji TNF);
- Jak interpretować jednak prawie 5-krotny wzrost MCPIP1 w obecności IL-1 β w komórkach pozbawionych NF- κ B (Ryc. 3) – czy inne ścieżki są zaangażowane w indukcję MCPIP1 czy też eliminacja NF- κ B była niekompletna?
- Z czego wynika duże niespecyficzne wiązanie w kontroli pozytywnej w teście EMSA?
- Zastosowanie technologii siRNA do wyciszenia ekspresji MCPIP1 wykazało stosunkowo niską wydajność – IL-1 β nadal powoduje wzrost poziomu mRNA kodującego MCPIP1 (Ryc. 7) – proszę o skomentowanie tego wyniku;
- Z podpisów pod rycinami wynika, że IL-1 β była obecna w medium hodowlanym przez bardzo różny okres, od 5 min

do 24 godzin (poprzez 1, 3, 4 godziny...) – jakie jest tego uzasadnienie?

- Czy nie przydałoby się pokazać dawko-zależności w działaniu związku MG-132?
- Ryc. 22 – czy da się wiarygodnie wyznaczyć błąd standardowy z dwóch eksperymentów?
- Str. 66 – czy słowo „sensitivity” jest adekwatne do eksperymentów biochemicznych...? Czy nie oznacza ono wrażliwości ale raczej emocjonalnej...?

Zważywszy na bardzo zaawansowany warsztat z zakresu biologii molekularnej i swobodę, z jaką Doktorant posługuje się tymi nowoczesnymi technikami oraz na tytaniczną pracę, którą wykonał a także na ogrom wartościowych wyników będących nowością naukową stwierdzam, że przedstawiona do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami.

Stawiam więc wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Skalniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie tej Rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Fizycznej
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska