Uniwersytet Wrocławski
Profesor Jacek Otlewski

Wydział Biotechnologii
Zakład Inżynierii Białka

Tamka 2
50-137 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
fax +48 71 375 26 08
www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 23 lutego 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Banaś zatytułowanej:

„Ochronna rola chemeryny w fizjologii naskórka"

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Banaś dotyczy badań nad chemeryną, badanym od 12 lat, ale jeszcze stosunkowo słabo poznanym, białku, będącym przedmiotem blisko 400 publikacji wymienionych w bazie PubMed. W badania nad chemeryną niemal od początku włączona jest promotor niniejszej pracy doktorskiej, tematyka badań jest więc dobrze osadzona w Zakładzie Immunologii kierowanym przez prof. Joannę Cichy, tym bardziej, że dotychczasowe badania opisane są w 12 publikacjach, które ukazały się w bardzo dobrych czasopismach.

Oceniany doktorat jest kontynuacją wspomnianych badań. Dotychczasowe prace wskazują, że białko to jest chemoatraktantem produkowanym głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej a regulującym migrację komórek układu immunologicznego. Występuje ono także w naskórku osób zdrowych, a jego poziom znacznie maleje u chorych na łuszczycę, schorzeniu, które ma podłoże autoimmunizacyjne. Ten wątek naukowy postanowiła dokładnie zbadać doktorantka, stawiając sobie za cele: określenie poziomu chemeryny w naskórku, ustalenie czynników, które ten poziom regulują, zbadanie modyfikacji potranslacyjnych białka, a wreszcie ustalenie roli chemeryny w naskórku. Cele te i plan doktoratu wydają się logicznie dobrane, tym bardziej, że przed podjęciem badań wiadomo było tylko, że białko to ulega ekspresji w różnego rodzaju nabłonkach.

Rozprawa doktorska mgr Banaś to 30-stronicowy manuskrypt napisany po polsku, do którego dołączone są kopie trzech publikacji, których współautorem jest doktorantka. Prace te ukazały się w bardzo dobrych anglojęzycznych czasopismach (dwie w *PLoS One* i jedna w *J. Immunology*). W pracy pierwszej (*PLoS One* 2015) doktorantka jest pierwszym z dziewięciu autorów, którzy pracują w czterech jednostkach badawczych. Publikacja ta

opisuje ekspresję i regulację chemeryny w naskórku. Jest bardzo obszerną (19 stron), oryginalną pracą eksperymentalną. W drugiej pracy, która ukazała się w prestiżowym *J. Immunology* (2011), doktorantka jest czwartym z 13 autorów, pochodzących z ośmiu różnych jednostek badawczych. W publikacji opisana jest antybakteryjna aktywność fragmentów chemeryny generowanych proteolizą przez katepsyny B i L. W ostatniej pracy, opublikowanej także w *PLoS One* (2013), doktorantka jest pierwszym autorem z łącznej liczby 12 badaczy, a praca powstała przy współpracy ośmiu laboratoriów. Piszę o tym wszystkim dosyć szczegółowo, gdyż we wspomnianym 30-stronnicowym manuskrypcie napisanym po polsku w stronie biernej nie jest sformułowane jednoznacznie, które eksperymenty przeprowadziła osobiście doktorantka. Zakładając, że cytowane w tym tekście w nawiasach odnośniki do rysunków i tabel zawartych w tych trzech publikacjach odnoszą się do wyników bezpośrednio uzyskanych przez doktorantkę, można stwierdzić, że wykonała ona wszystkie, lub niemal wszystkie, eksperymenty przedstawione w pracy pierwszej, odpowiada za wyniki przedstawione na rysunkach 3, 4 i 5 w pracy drugiej oraz za rys. 3 i 4 oraz Tab. 3 pochodzące z pracy trzeciej. W zakres doktoratu wchodzą także wartościowe badania modyfikacji potranslacyjnych chemeryny w naskórku (rozdział 5 manuskryptu), których wyniki nie zostały jeszcze opublikowane.

Do najbardziej wartościowych oryginalnych wyników uzyskanych przez doktorantkę zaliczam:

1. Określenie stężenia chemeryny w zdrowym mysim naskórku i pokazanie, że to właśnie naskórek odpowiada za produkcję tego białka w skórze. Doktorantka ustaliła także, że poziom chemeryny jest regulowany w naskórku mysim i ludzkim przez trzy receptory: CMLR1, CCLR2 i GPR1.
2. Ustalenie, że w łuszczycy sytuacja jest odwrotna niż w skórze zdrowej: poziom chemeryny jest obniżony w naskórku, a jest ona produkowana przez komórki skóry właściwej. Stosując tzw. hodowle 3D, doktorantka pokazała także, iż interleukiny 17 i 22 mogą być odpowiedzialne za obniżoną ekspresję chemeryny w naskórku chorych na łuszczycę. Odmienny natomiast efekt, zwiększenia ekspresji chemeryny w naskórku łuszczycowym, zaobserwowano w przypadku zastosowania onkostatyny M i interleukiny 1β.
3. Pokazanie, że bakterie związane z infekcjami skórnymi: *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, zarówno żywe, jak i zabite, stymulowały produkcję chemeryny

w naskórku. Efekt silniejszy był w przypadku bakterii żywych, co sugeruje udział czynników obecnych tylko u żywych bakterii lub wydzielanych przez nie do podłoża.

4. Przeprowadzenie badań nad aktywnością chemotaktyczną i bakteriobójczą skróconych na końcu C form chemeryny oraz na fragmentach peptydowych zbudowanych z 20 reszt aminokwasów, obejmujących całą sekwencję chemeryny. Badania te pokazały, że peptyd Val66-Pro85 zawiera region zasadniczo odpowiedzialny za aktywność bakteriobójczą wobec szeregu szczepów bakterii. Aktywność bakteriobójczą obserwowano zarówno dla chemeryny rekombinowanej, jak i tej obecnej w medium hodowlanym ludzkich keratynocytów.
5. Ustalenie, że chemeryna produkowana jest przez ludzkie keratynocyty w postaci wysokocząsteczkowej formy o masie cząsteczkowej ponad 70 kDa. Doktorantka pokazała, że ta forma chemeryny powstaje w wyniku działania transglutaminaz naskórka, które są podobnie zlokalizowane, co chemeryna. Tworzenie takich kowalentnych połączeń może być mechanizmem chroniącym chemerynę przed proteolizą i generowaniem jej chemotaktycznie aktywnych form. Wyniki opisane w tym punkcie są niepublikowane, a wartościowe i oryginalne.

Moje uwagi do doktorantki:

1. Szkoda, że nie przedstawiono modelu struktury chemeryny, opartego o znane struktury przestrzenne podobnych białek. Pomogłoby to zrozumieć, w jakim fragmencie struktury zlokalizowany jest peptyd Val66-Pro85. Myślę, że model struktury byłby także pomocny w projektowaniu peptydów opisanych w punkcie 4.

2. Prosiłbym o ustosunkowanie się w czasie publicznej obrony do moich uwag zawartych w górnej części strony 2 i o wskazanie w trakcie prezentacji wyników, które eksperymenty zostały wykonane samodzielnie przez doktorantkę. Uważam, że należało napisać komentarz do pracy doktorskiej w pierwszej osobie liczby pojedynczej.

Drobne uwagi:

1. Str. 12 (trzecia linijka od dołu): powinno być cytokiny, a nie cytokininy.
2. Str. 23 (piąta linijka od góry): forma Chem125R jest krótsza o 32 reszty aminokwasowe, a nie 22.

3. Str 24 (ostatnia linijka na dole strony): w pracy opublikowanej w *J. Immunol*. nie znalazłem rys. 1c.
4. W tekście polskim jest znaczna liczba błędów interpunkcyjnych.

Ogólnie należy stwierdzić, że doktorantka zrealizowała postawione cele badawcze. Szereg wyników jest bardzo wartościowych, uzyskanych z użyciem zaawansowanych technik biologii molekularnej oraz komórkowej. Doktorat przybliża nas do poznania roli chemeryny w naskórku i skórze związanej z aktywnością przeciwbakteryjną i chemotaktyczną i jest wartościowych wkładem w naukę.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Magdaleny Banaś zatytułowanej: „Ochronna rola chemeryny w fizjologii naskórka" jest wysoce pozytywna a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Magdaleny Banaś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Otlewski

