



PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 03.03.2023
L.dz. 70

WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII
im. gen. Karola Kaczkowskiego
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4
tel. 261 853 101 fax 261 853 133
e-mail: kancelaria.jawna@wihe.pl

dr hab. n. med. Małgorzata Krzyżowska, prof. WIHiE
Kierownik Zakładu Medycyny Regeneracyjnej
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
w Warszawie

Warszawa, 20.02.2023

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli

**pt. "Regulatorowa rola ligazy Pellino 3 w szlakach sygnałowych RIG-I
aktywowanych wirusem grypy typu B"**

Rozprawa doktorska wykonana w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Promotor: dr hab. inż. Jakub Siednienko

Wrodzona, nieswoista odpowiedź immunologiczna stanowi najstarszy ewolucyjnie mechanizm odporności na czynniki zakaźne o etiologii wirusowej, bakteryjnej ale również mechanizm obronny w kontakcie z grzybami czy pasożytami. Wirusy grypy należą do powszechnie występujących wirusów atakujących drogi oddechowe, które pomimo istniejących szczepień mogą powodować ciężki przebieg infekcji, powiązany z dużym ryzykiem powikłań, hospitalizacji czy zgonów. Podczas infekcji wirusem grypy silne pobudzenie nieswoistych mechanizmów odpornościowych może prowadzić do uszkodzenia tkanki płucnej, a tym samym zaburzać wytworzenie prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Pierwszą linią obrony organizmu podczas infekcji wirusem grypy są interferony (IFN), będące cytokinami wytwarzanymi i uwalnianymi przez komórki po rozpoznaniu przez receptory komórkowe struktur molekularnych zwanych wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMP), które nie występują w komórkach niezakażonych. Wydzielone interferony stymulują następnie ekspresję wielu genów, wspólnie

nazywanych genami stymulowanymi interferonem, których ekspresja indukuje dalsze etapy odpowiedzi przeciwwirusowej. Ubikwitynacja jest procesem modyfikacji posttranslacyjnej białek, który odgrywa istotną rolę w regulacji wielu funkcji biologicznych, w tym nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 87 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie Doktorantka opisuje wyczerpująco rodzaje receptorów rozpoznających wzorce (PPR), które wiążą wzorce molekularne powiązane z patogenami (PAMP) i odgrywają istotną rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej: receptory Toll-podobne (TLR), receptory NOD-podobne oraz receptory RIG-podobne (RLR). Następnie, Autorka szczegółowo charakteryzuje szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory RLR, rolę interferonu oraz ubikwitynacji w odpowiedzi przeciwwirusowej. Wstęp rozprawy kończy wyczerpującym opisem ligaz ubikwityny E3 z rodziny Pellino z dokładną charakterystyką pełnionej przez nie roli w nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej na podstawie dostępnych danych literaturowych.

W mojej opinii wstęp do rozprawy stanowi bardzo dobre i wyczerpujące wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, a omawiane zagadnienia są zilustrowane przejrzystymi rycinami. Zważywszy na istotny problem zagrożenia pandemicznego wirusami grypy typu A i B oraz konieczność poszukiwania nowych leków przeciwwirusowych, stosowanych w leczeniu ciężkiego przebiegu infekcji, poznanie mechanizmów regulacyjnych odpowiedzi interferono-zależnej może stanowić punkt wyjścia do pozyskania nowych inhibitorów przeciwwirusowych.

W swojej rozprawie doktorskiej Doktorantka postawiła sobie cel badawczy polegający na ustaleniu funkcji jaką pełni ligaza Pellino3 w szlaku sygnałowym receptora RIG-I aktywowanym przez zakażenie wirusem grypy typu B w komórkach nabłonka płuc. W tym celu Doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji i produkcji interferonów typu I, oraz analizę aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT i produkcji CXCL10. Ponadto, Doktorantka podjęła się również próby określenia roli ubikwitynacji przez ligazę Pellino 3 czynników transkrypcyjnych w szlaku sygnałowym receptora RIG-I podczas zakażenia wirusem grypy typu B.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka przedstawiła szczegółową listę technik oraz odczynników stosowanych przez nią w pracach badawczych. Opis technik biologii molekularnej jest bardzo wyczerpujący i sporządzony w sposób umożliwiający ich

odtworzenie. Wyjątek stanowi brak opisu sposobu prowadzenia stymulacji ligandem receptora RIG-I (3p-hpRNA), chociaż wyniki przedstawiono w podrozdziale 7.3.1.

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie 19 rycin, uzupełnionych klarownym opisem. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka posłużyła się w badaniach więcej niż jedną techniką, a w każdej z nich wykazała się dużą biegłością. Konsekwentny dobór technik badawczych, pozwalający na logiczną odpowiedź na kolejne pytania badawcze powiązane z rolą ligazy Pellino 3 w zakażeniu wirusowym komórek nabłonka, w tym dobór kontroli zasługuje na uznanie oraz świadczy o dużej dojrzałości zawodowej Badaczki.

Ważną częścią rozprawy doktorskiej jest przeprowadzona na 8 stronach Dyskusja, w której omówione zostały uzyskane wyniki w oparciu o 161 pozycji literaturowych oraz Rycinę przedstawiającą schemat regulacji szlaku sygnałowego receptora RIG-I aktywowanego infekcją wirusem grypy typu B w ludzkich komórkach nabłonka płuc. Autorka dokonuje klarownego podsumowania wyników oraz ich omówienia w świetle badań nad rolą ligazy Pellino 3 w innych zakażeniach wirusowych oraz na innych modelach badawczych, dostępnych w literaturze. Dyskusja pozwala na poznanie znaczenia pozyskanych wyników w świetle istniejącej wiedzy o roli ligazy Pellino 3, co świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności krytycznego spojrzenia na pozyskane wyniki. Autorka formułuje wnioski w ścisłym powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań.

W moim poczuciu szczególną wartością naukową rozprawy doktorskiej są nie tylko konsekwentnie i dokładnie przeprowadzone badania, ale również wykazanie, że działanie ligazy Pellino 3 może być zależne od rodzaju tkanki oraz wykazanie istnienia alternatywnie uruchamianych szlaków w odpowiedzi na zakażenie wirusowe komórek nabłonka, takich jak aktywacja STAT2 na drodze niezależnej od interferonów typu I czy aktywność szlaku kinaz p38.

W obowiązku recenzenta pozostaje mi jednak zadać pytania dotyczące związane bezpośrednio ze sposobem wykonywania badań, który mógł wpływać na wyniki i ich interpretację.

- Na ryc. 7.4 (str. 53) Autorka pokazuje poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na stymulację ligandem receptora RIG-I. Nie znalazłam w rozdziale materiały i metody sposobu zastosowania liganda 3p-hpRNA, jak również uzasadnienia zastosowania takiego a nie innego stymulatora RIG-I.

- Na ryc. 7.5 (str. 54) oraz 7.12 (str. 60) posłużono się techniką PCR celem oceny różnic w ekspresji genów kodujących, odpowiednio, DDX58 i MAVS oraz TRAF3 i TRAF6. Zakładam, że wybór tej techniki był w jakiś sposób uzasadniony technicznie/naukowo, dzięki czemu nie było konieczności potwierdzania poziomów ekspresji na poziomie białka?

- Interesujące z punktu widzenia odpowiedzi przeciwwirusowej byłoby zbadanie innych cytokin czy chemokin indukowanych w komórkach A549 w odpowiedzi na zakażenie wirusem grypy typu A czy B, takich jak CCL2, CCL5 i CXCL8. Zakładam, że wybór CXCL10 był w jakiś sposób uzasadniony – bądź to wcześniejszymi badaniami w zespole, lub pomiarami pilotażowymi. Zbadanie zahamowania innych cytokin/chemokin przez aktywność ligazy Pellino 3 w odpowiedzi na zakażenie wirusem grypy typu B umożliwiłoby zrozumienie czy aktywność tej ligazy może się przyczyniać do nadmiernej aktywacji procesów zapalnych w komórkach nabłonka płuc.

- Na ryc. 7.16 przedstawiono fosforylację czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Reprezentatywny blot wskazuje na wzrost fosforylacji STAT1 w 6h zarówno dla komórek dzikich, jak i pozbawionych ligazy Pellino 3 oraz dużo słabszy w 4h. Z kolei na ryc. 7.17 przedstawiono wyniki fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 po zablokowaniu receptora interferonów typu I w 4h. Z jakiego powodu doświadczenia przedstawione na ryc. 7.17 przeprowadzono w 4, a nie w 6h?

- Na ryc. 7.19 przedstawiono poziom produkcji CXCL10 w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową po zablokowaniu receptora interferonów typu I. W opisie zaznaczono, że różnice w zahamowaniu produkcji CXCL10 wykazywały istotność statystyczną rzędu $p < 0,00$, jednak z wykresu wynika, że w szczególności dla komórek dzikich odchylenie statystyczne było duże. W ilu powtórzeniach wykonano to doświadczenie i skąd mogły wynikać takie różnice?

- Na ryc. 7.14 przedstawiono dwa panele, jednak zabrakło opisu czym różnią się oba panele. Oczywiście można się tego domyśleć z opisu wyników i jest to drobna usterka techniczna.

Powyższe pytania czy uwagi nie umniejszają w moim poczuciu dużej wartości przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli. Rozprawa doktorska, jest napisana niezwykle starannie, logicznie a poziom merytoryczny świadczy o dużej wiedzy Autorki i umiejętności jej wykorzystania przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem mgr inż. Anny Kuli wniesionym do wiedzy o roli ligazy ubikwityny Pellino3 jako negatywnego regulatora produkcji interferonów typu I w szlaku zależnym od receptora RIG-I uruchamianym w zakażeniu wirusem grypy typu B.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.) i tym samym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o dopuszczenie magister inżynier Anny Kuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.