



PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia ..06-03-2023....
L.dz.74.....

Lublin, 27.02.2023

dr hab. Magdalena Staniszewska prof. KUL
Instytut Nauk o Zdrowiu
Wydział Medyczny
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1 J, 20-708 Lublin
tel. 81-454-5621
email: magdalena.staniszewska@kul.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli

pt. **„Regulatorowa rola ligazy Pellino3 w szlakach sygnałowych RIG-I aktywowanych wirusem grypy typu B”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Anny Kuli została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Jakuba Siednienko w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Badania były realizowane w ramach grantu Sonata Bis z Narodowego Centrum Nauki (2015/18/E/NZ3/00695).

Podjęte przez doktorantkę badania dotyczą poznania mechanizmu obrony organizmu przed infekcjami wirusowymi, ze szczególnym uwzględnieniem powszechnych zakażeń wirusem grypy typu B. W rozprawie przedstawiono wyniki badań dotyczące regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej związanej z wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi, aktywowanymi przez receptory RLR (receptory RIG-I-podobne). Szczegółowe wyjaśnienie aktywacji ścieżki sygnałowej w komórkach nabłonkowych, uwalniania czynników transkrypcyjnych oraz udziału ligazy ubikwityny Pellino3 pod wpływem infekcji wirusem grypy typu B, prowadzących do indukcji cytokin prozapalnych i interferonów było głównym przedmiotem pracy.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kuli ma typowy dla prac eksperymentalnych układ. Zorganizowana jest na poszczególne rozdziały, które zawierają odpowiednio umieszczone treści. Całość pracy obejmuje 87 stron z czego obszerną część stanowi opis i dyskusja uzyskanych wyników badań. We wstępie opisano kontekst problemu badawczego, w klarowny sposób wyjaśniając znane dotąd elementy ścieżek sygnałowych, rolę receptorów zewnątrz i wewnątrzkomórkowych, cząsteczek adaptorowych i czynników transkrypcyjnych oraz mechanizmów regulacyjnych obejmujących ubikwitynację białek, związanych z odpowiedzią na infekcje wirusowe. We tym miejscu zasadne byłoby wyjaśnienie udziału nabłonka układu oddechowego w odpowiedzi przeciwwirusowej, podkreślającego kontekst prac badawczych oraz uzasadniającego wybór użytego do badań modelu komórkowego, czego we wstępie zabrakło.

W kolejnym rozdziale autorka wyjaśnia cel pracy, wskazując na potrzebę zbadania roli ligazy Pellino3 w szlaku sygnałowym aktywowanym przez receptor RIG-I podczas infekcji wirusem grypy typu B w komórkach nabłonkowych płuc. W rozdziale Materiały i metody uwzględniono szczegółowe wykazy odczynników, inhibitorów, gotowych zestawów, buforów i żeli, starterów reakcji PCR, przeciwciał, plazmidów, linii komórkowych, wirusów oraz akcesoriów i programów komputerowych wykorzystanych w pracy. Jest to dość interesujący układ, ułatwiający odnalezienie szczegółów użytych narzędzi badawczych, ale nieco niestandardowy. Metody opisane są w sposób wyczerpujący i umożliwiający powtórzenie eksperymentów, choć zabrakło kilku precyzujących informacji (wymienione na końcu recenzji). Wyniki ilustrowane są czytelnymi i dobrze opisanymi rysunkami, które ponumerowano zgodnie z numerem rozdziałów, zamiast w kolejności ich umieszczenia, co niepotrzebnie utrudnia ich odnalezienie, szczególnie jeśli numery nie odpowiadają numerom podrozdziałów, jak w przypadku Rysunku 7.2, 7.3, 7.4, itd., które dotyczą odpowiednio treści w podrozdziałach 7.1, 7.2, 7.3, itd. Dyskusja wyników poprowadzona jest w ciekawy sposób z uwzględnieniem aktualnej literatury i prowadzi do propozycji regulacji szlaku aktywowanego przez receptor RIG w odpowiedzi komórek nabłonkowych na zakażenie wirusem grypy. Zebrane wnioski w rozdziale 10 stanowią odpowiedzi na postawione cele.

Dopełnieniem pracy są streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis rysunków oraz 161 pozycji, głównie najbardziej aktualnego piśmiennictwa. Podsumowując, praca jest spójna tematycznie z wyraźnie przedstawionym celem i wyczerpującym opisem

przebiegu prac doświadczalnych oraz podsumowaniem wyników zilustrowanych na końcowym schemacie.

Ocena merytoryczna

Podjęta w pracy tematyka skupia się na wyjaśnieniu mechanizmu regulacji odpowiedzi komórek nabłonkowych na zakażenie wirusem grypy typu B. Wcześniejsze badania własne doktorantki (*Raniewicz et al., Oxid. Med. Cell Longev. 2021*) oraz innych, prowadzone na komórkach układu immunologicznego – makrofagach i monocytach, wykazały, że podczas zakażenia wirusem dochodzi do aktywacji kaskad sygnałowych z udziałem receptorów RIG-I oraz MDA5, co w konsekwencji prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych i interferonów. W tym procesie ligazy ubikwityny mogą promować (jak wykazano we wcześniejszej pracy doktorantki) lub hamować przeciwwirusową odpowiedź komórkową, dlatego celem pracy było ustalenie receptorów oraz roli ligazy ubikwityny Pellino3 w regulacji szlaku sygnałowego prowadzącego do wydzielania interferonów jako reakcji obronnej na zakażenie komórek nabłonkowych. W celu kompleksowego poznania regulacji szlaku sygnałowego doktorantka po potwierdzeniu udziału ligazy Pellino3 w regulacji wydzielania interferonów przez zainfekowane modelowe komórki nabłonkowe przeprowadziła konsekwentne badania wpływu tej ligazy na kolejne etapy kaskady sygnałowej receptora RIG-I. Badania obejmowały fosforylację wybranych kinaz MAPK, aktywację jądrowego czynnika transkrypcji genów NF- κ B, czynników regulujących interferon, czynników z rodziny AP-1 oraz czynników TRAF3 i TRAF6. Ostatnim elementem było ustalenie profilu ubikwitynacji TRAF3 przez ligazę Pellino3, wyjaśniającego kierowanie tego czynnika do proteasomalnej degradacji. Dane eksperymentalne wskazały, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest negatywnym regulatorem wydzielania interferonów przez komórki nabłonkowe infekowane wirusem grypy typu B. Ostatnim etapem pracy wyjaśniającym mechanizm regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej przez ligazę Pellino3, która wpływa na obniżenie poziomu interferonów typu I, było zbadanie jej roli podczas fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 kontrolujących wydzielanie cytokiny CXCL10.

Umieszczone w rozprawie wyniki badań, które przedstawione są w elegancki sposób na licznych rysunkach, potwierdzają wyciągnięte wnioski na temat roli ligazy ubikwityny Pellino3 w regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej komórek nabłonkowych. Należy podkreślić, że

część eksperymentalna została starannie zaplanowana, uwzględniała konieczne kontrole, a testy zostały wykonane w kilku powtórzeniach za pomocą komplementarnych testów, np. ekspresja na poziomie mRNA (QPCR) oraz białka (WB). Doktorantka podsumowała swoje obserwacje na ostatnim rysunku (Rysunek 9.1) ilustrującym proponowany mechanizmem regulacji szlaku sygnałowego receptora RIG-I po jego aktywacji w komórkach nabłonkowych płuc zainfekowanych wirusem grypy typu B, co w pełni zamyka realizację zaplanowanego celu.

Jedyne uwagi krytyczne dotyczące przedstawionej do oceny rozprawy dotyczą raczej uszczegółowienia dla celów lepszego zrozumienia przeprowadzonych badań lub wynikają z ciekawości naukowej, ale nie mają wpływu na końcową ocenę. Proszę o uwzględnienie wyjaśnienia następujących kwestii:

- 1) We wstępie nie wyjaśniono powodów wyboru modelu badawczego – użytych linii komórkowych. Wykorzystanie komercyjnej linii nabłonka płuc, która jest linią nowotworową wydaje się oczywiste, choć nasuwa się pytanie, czy obserwowane mechanizmy regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej są podobne w komórkach zdrowego nabłonka. Dodatkowo, proszę o skomentowanie wyboru linii kostniakomiesaka U-2 OS, którą wykorzystano do zbadania miejsca ubikwitynacji białka TRAF3 przez ligazę Pellino3.
- 2) W wykazie odczynników brakuje wyjaśnienia nazwy i składu buforu DPBS;
- 3) W rozdziale Materiały i metody:
 - podrozdział 6.2.3. brak jest odniesienia do źródłowego opisu metody oznaczania miana wirusa (CID50) oraz konieczności pracy w warunkach odpowiedniej klasy bezpieczeństwa, który może nie być oczywisty dla osób bez wcześniejszego doświadczenia;
 - podrozdział 6.2.6.5. brakuje składu kazeinowego buforu blokującego;
 - podrozdział 6.2.8 – zabrakło informacji nt substratu dla RIG (3p-hpRNA), który zdaje się, że był także dostarczony do transfekowanych komórek. Informacje na temat tego ligandu pojawiają się dopiero w dyskusji;
 - Analiza statystyczna – czy 3 niezależne powtórzenia można uznać za 3 niezależne eksperymenty, czy też za powtórzenia techniczne w ramach jednego eksperymentu?
- 4) Jaka jest interpretacja obserwowanego na Rysunku 7.6 utrzymującego się nawet do 6 godzin podniesionego poziomu phospho-p38 w komórkach PELI3^{-/-}, w porównaniu z przejściowym, podniesionym sygnałem w komórkach dzikich? Czy była to tylko

jednorazowa obserwacja? Pomocne byłoby przedstawienie wyników WB w formie wykresów słupkowych ilustrujących wartościami liczbowymi intensywność prążków białkowych uzyskanych dla 3 powtórzeń (z odchyleniami standardowymi), najlepiej normalizowanych do poziomu białka kontrolnego, np. aktywny.

Ta sama uwaga dotyczy rysunków 7.8, 7.10, 7.11, 7.13, 7.16, 7.17.

- 5) W podsumowaniu wkraść się błąd w pkt. 7 – wniosek raczej powinien mówić o tworzeniu rozgałęzienia w miejscu lizyny K48, zgodnie z wynikiem przedstawionym w podrozdziale 7.6.3 i rysunkiem 7.15.
- 6) Jakie są praktyczne aspekty uzyskanych wyników? Czy są już doniesienia na temat zmienności osobniczej ekspresji, polimorfizmu lub mutacji ligazy Pellino3? Czy planowane są badania na modelu zwierzęcym i jaki jest przewidywany wypadkowy efekt odpowiedzi przeciwwirusowej, w przypadku dzikiej formy ligazy Pellino3 wywołującej odwrotny efekt w komórkach nabłonkowych i komórkach odpornościowych?

Podsumowanie

W mojej ocenie, przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr inż. Anny Kuli stanowi ważny wkład w poznanie mechanizmu regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej w zakażeniach grypy typu B. Przeprowadzone badania pozwoliły na rozwiązanie skomplikowanego problemu badawczego jakim jest mechanizm regulacji komórkowych szlaków sygnałowych i stanowią znaczną wartość poznawczą, a potencjalnie także aplikacyjną. Właściwie wyciągane wnioski oraz prowadzona dyskusja pokazują znajomość przez doktorantkę tematyki oraz bieżącej literatury. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych i zaawansowanych metod badawczych z zakresu biologii komórki, immunochemii i biologii molekularnej, pozwalających na kompleksowe prowadzenie badań w obszarze komórkowych szlaków sygnałowych oraz odpowiedzi komórkowej na zakażenia. Wcześniej opublikowane prace w prestiżowych czasopismach (*Talanta* i *Oxid Med. Cell Longev.*) potwierdzają biegłość i skuteczność doktorantki w prowadzeniu badań w obszarze ostatnio szczególnie ważnym społecznie, jakim są zakażenia wirusowe.

Mając na uwadze rzetelność przeprowadzonych badań oraz ich prezentację, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Kuli bardzo wysoko. Praca spełnia wszystkie kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach



naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.), a opublikowane dotąd prace w prestiżowych czasopismach naukowych są podstawą mojego wniosku, jaki niniejszym składam, do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.

Magdalena Staniszevska

dr hab. Magdalena Staniszevska prof. KUL