



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ LEKARSKI
Katedra Biochemii i Immunochemii
Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Wrocław, 25-03-2023

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli pt. „Regulatorowa rola ligazy Pellino3 w szlakach sygnałowych RIG-I aktywowanych wirusem grypy typu B”

promotor rozprawy: dr hab. inż. Jakub Siednienko

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Kuli zrealizowana została w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN.

Praca dotyczy badania mechanizmów sygnalizacji regulujących odpowiedź komórek ludzkiego nabłonka płucnego aktywowanych wirusem grypy typu B (IBV). Zasadniczym celem pracy była identyfikacja w tych komórkach wybranych elementów kaskad sygnalizacyjnych zależnych od cytosolowych receptorów typu RLR oraz określenie roli tych czynników w pobudzeniu produkcji interferonów typu I i wybranych cytokin prozapalnych w wyniku odpowiedzi komórek na stymulację przez ligandy pochodzenia wirusowego. Podjęty problem jest bardzo istotny ze względu na znaczenie kliniczne. Szczegółowe poznanie mechanizmów obrony przeciwwirusowej w komórkach nabłonkowych ustroju człowieka może mieć przełożenie na terapię, a także na wytyczanie kierunków dla profilaktyki.

Badania objęte zakresem rozprawy były realizowane w ramach projektu SONATA BIS nr UMO-2015/18/E/N23/00695 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. Doktorantka jest autorką lub współautorką trzech prac naukowych opublikowanych w czasopismach anglojęzycznych o wysokich współczynnikach wpływu 6.1, 7.31 i 6.208. W dorobku posiada też jedno wystąpienie konferencyjne na sympozjum międzynarodowym.

Opis formalny

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Kuli została przygotowana w formie monografii o układzie typowym dla prac tego rodzaju. Zawiera 87 stron maszynopisu, 29 rysunków, kilka tabel.

Wstęp teoretyczny został poprzedzony wykazem publikacji Doktorantki, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim.

Zawarty na 24 stronach tekst części wstępnej podzielony przejrzysto na 6 podrozdziałów to zwięzłe wprowadzenie teoretyczne do podjętych badań. W osobnej części rozprawy umieszczono założenia pracy i cel podjętych badań. Kolejny fragment dysertacji zajmujący osiem podrozdziałów to opis wykorzystanych materiałów. Omówienie metod przedstawiono w następnych sześciu podrozdziałach.

W dalszej partii tekstu zawartej na 17 stronach przedstawione są wyniki wykonanych badań. Dla lepszej czytelności część ta została podzielona na 9 podrozdziałów. Zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników zawiera kolejny rozdział dysertacji. Po nim, na ośmiu stronach rozwinięta jest dyskusja, gdzie omawiane są najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Wnioski końcowe podane są w kolejnej części tekstu pracy. Rozprawę kończą opisy rysunków i wykaz cytowanego piśmiennictwa (161 pozycji).

Charakterystyka i ocena merytoryczna

Obecność w ustroju antygenów wirusowych pobudza nie tylko makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne jako komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Aktywacji ulegają również komórki nie-immunologiczne takie jak fibroblasty i komórki nabłonka. Te ostatnie to ważna bariera obronna m.in. dróg oddechowych.

Podjęte przez Doktorantkę badania zmierzały do wyjaśnienia mechanizmów przeciwwirusowych w komórkach nabłonka zainfekowanych wirusem grypy typu B (IBV). Dotyczyły one oceny w tych komórkach działania głównej ścieżki przekazywania - kaskady sygnalizacyjnej aktywowanej za pośrednictwem receptorów RIG typu I, odpowiedzialnej w stanie infekcji za transdukcję sygnału w kierunku jądra komórkowego i wywołanie odpowiedzi zapalnej. Zjawiska te badane są od wielu lat, ale wciąż wymagają intensywnych badań i poszukiwania odpowiedzi na nowe pytania.

Kluczowym problemem było wyjaśnienie udziału ligazy ubikwityny E3 - białka Pellino3 w kontroli szlaku zależnego od receptora RIG-I podczas odpowiedzi komórek nabłonka na atakujący wirus IBV. Doktorantka wybrała kilka wariantów komórek A549 (ludzka linia niedrobnokomórkowego nowotworu płuc) do szerokiego udokumentowania obserwowanych zjawisk i prawidłowej ich interpretacji.

Tytuł rozprawy doktorskiej „Regulatorowa rola ligazy Pellino3 w szlakach sygnałowych RIG-I aktywowanych wirusem grypy typu B” prawidłowo odzwierciedla jej zawartość.

We **Wstępie** teoretycznym Autorka najpierw przedstawia w krótkim zarysie kluczowe elementy mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej ustroju w stanach infekcji wirusowej. Następnie w przystępnej formie charakteryzuje obszerną grupę błonowych białek receptorowych z rodziny receptorów Toll-podobnych. W tej części Doktorantka opisuje różne elementy aktywowanych tą drogą kaskad sygnałowych, w tym wskazuje na białka adaptorowe uczestniczące w mechanizmach przenoszenia sygnału w cytosolu, opisuje typy kinaz niezbędnych w tych procesach, omawia znaczenie modyfikacji białek sygnałowych przez ubikwitynę w kontroli przenoszenia sygnału. Na uwagę zasługuje własne opracowanie wszystkich ilustracji zamieszczonych w tej części rozprawy, co świadczy o dobrym

zapoznaniu się Autorki z tematyką badań i dobrym przyswojeniu wiedzy pochodzącej z aktualnych doniesień literaturowych.

Opisane w tekście i przedstawione na rysunkach kaskady sygnałowe dobrze wyjaśniają efekty końcowe odpowiedzi komórkowej, wywołanej infekcją wirusową, czyli pobudzenie produkcji interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych.

Doktorantka przedstawia również drugą rodzinę receptorów, ważną w rozpoznawaniu antygenów wirusowych i generowaniu odpowiedzi przeciwwirusowej. Są to cytosolowe receptory z grupy RLR (rodzina receptorów RIG-I podobnych), w tym receptory RIG-I. Autorka rzeczowo opisuje elementy szlaków sygnałowych aktywowanych przez te receptory, a dodane do tej części ilustracje dobrze uzupełniają i wzbogacają ten rozdział rozprawy, zwłaszcza czytelny schemat aktywacji kaskad sygnałowych za pośrednictwem receptorów RIG-I i MDA5.

W kolejnym fragmencie Wstępu Autorka charakteryzuje krótko interferony jako cytokiny przeciwwirusowe i omawia ich rolę m.in. w pobudzeniu odpowiedzi nieswoistej w komórkach nieimmunologicznych. Czytelna ilustracja wyjaśnia udział interferonów typu I w pobudzaniu głównego szlaku sygnałowego w tych komórkach, zależnego od receptorów IFNAR, z zaangażowaniem białek STAT jako przenośników sygnału i czynników transkrypcyjnych. W końcowym efekcie wytwarzane są białka przeciwwirusowe (m.in. enzymy degradujące wirusowe RNA).

W dalszej części Wstępu Doktorantka wyjaśnia znaczenie procesu ubikwitynacji białek sygnałowych w kaskadach aktywowanych przez receptory RLR i obszernie charakteryzuje grupę białek Pellino jako ligazy ubikwityny E3. Zamyka tą część rozprawy omówienie przez Autorkę dotychczasowych doniesień na temat roli Pellino3 w kontrolowaniu szlaków przekazywania komórkowego w odpowiedzi na infekcję wirusową. W tym zakresie ważny jest udział Autorki we wcześniejszych badaniach funkcji ligazy Pellino3 w komórkach makrofagów i monocytów w stanie infekcji wirusowej, realizowanych przez zespół kierowany przez promotora pracy.

Wstęp teoretyczny napisany jest rzeczowo, przystępnie i stanowi właściwie wyselekcjonowany kompleks wiedzy na temat przebiegu i kontroli szlaków sygnalizacyjnych istotnych w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej ustroju zaatakowanego przez wirusy. Warto podkreślić, że Doktorantka wykazała się dużą umiejętnością trafnego wyboru cytowanej literatury. W tej części pracy Autorka przedstawiła kluczowe zagadnienia istotne później w ocenie i interpretacji uzyskanych wyników badań. Ponadto podane we Wstępie informacje pozwalają czytelnikowi dobrze zrozumieć założenia i cel pracy.

Założenia i cel pracy zostały określone prawidłowo, w sposób jasny i jednoznaczny.

Sformułowanie celu głównego akcentuje zasadność badania funkcji ligazy Pellino3 w kaskadzie sygnalizacyjnej zależnej od receptora RIG-I w komórkach nabłonka płuc zainfekowanych IBV. Ponadto, zostały wskazane przez Doktorantkę cele szczegółowe dotyczące badania ekspresji i poziomu wytwarzania interferonów typu I oraz określenia udziału różnych elementów szlaku sygnałowego istotnych w generowaniu odpowiedzi przeciwwirusowej.

Materiały i metody. Do realizacji zadań Doktorantka użyła bogatego zestawu metod, szczegółowo opisanych. W pierwszej części tego rozdziału Autorka opracowała czytelny wykaz używanych odczynników z bardzo pomocnymi tabelami przedstawiającymi zestawy firmowe reagentów i ich źródła. Podała również wykaz inhibitorów swoistych dla badanych kinaz sygnałowych, czytelną charakterystykę komercyjnych zestawów do przeprowadzenia

reakcji PCR i PCR w czasie rzeczywistym, wykaz komercyjnych zestawów do odwrotnej transkrypcji i do transfekcji. Klarownie w formie tabelaryzowanej przedstawiła Doktorantka składy buforów zastosowanych w różnych technikach badań molekularnych. Wyszczególniła użyte startery do PCR, plazmidy wykorzystane do koimmunoprecypitacji oraz w badaniach ubikwitynacji. W obszernej tabeli Autorka opisała przeciwciała potrzebne w immunodetekcjach jakościowej i ilościowej badanych białek. Ponadto przedstawiła klarowny wykaz 8 typów linii komórkowych.

Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie do realizacji zadań bogatego zestawu nowoczesnych metod i najnowszych technik użytecznych w biologii molekularnej, analizach biochemicznych i immunochemicznych. Godna uznania jest różnorodność metod badawczych i zastosowanych technik laboratoryjnych. Warto też podkreślić, że realizacja tak złożonych zadań jest czasochłonna, wymaga dużych nakładów pracy na przygotowanie i wykonanie procedur. Sądzę, że było to dla Doktorantki duże wyzwaniem, ale uzyskane rezultaty wskazują na jej wielką pracowitość i bardzo dobre przygotowanie warsztatowe.

Wyniki. Doktorantka podzieliła konsekwentnie tą część dysertacji na podrozdziały, w których rzetelnie omówiła rezultaty badań. Dokumentacja wyników jest starannie opracowana i nie budzi moich zastrzeżeń. Autorka opisała rzeczowo rezultaty doświadczeń oraz przedstawiła je graficznie na 19 ilustracjach bardzo czytelnie skonstruowanych i jasno opisanych. Warto podkreślić że jednorodny styl graficzny znacząco ułatwia porównywanie danych parametrów określanych w różnych typach linii komórkowych nabłonka płucnego człowieka.

Godne uwagi jest to, że Doktorantka określiła ważne cechy ligazy Pellino3 w komórkach nabłonka płuc infekowanych wirusem IBV. Białko to nie ma udziału w kontroli translokacji czynnika NFkB z cytosolu do jądra komórkowego. Nie wywiera wpływu na szlak sygnałowy MAP kinaz, czyli stymulacja tą drogą stanu zapalnego w odpowiedzi na infekcję wirusową jest niezależna od ligazy Pellino3.

Oryginalnym i najbardziej istotnym odkryciem Autorki jest wykazanie że w komórkach nabłonkowych płucnych infekowanych wirusem grypy typu B ligaza ubikwityny E3 - białko Pellino3 funkcjonuje jako negatywny regulator odpowiedzi przeciwwirusowej. Ujawnił się ten efekt poprzez wpływ Pellino3 na ścieżkę sygnałową zależną od receptora cytosolowego - receptora RIG-I. Doktorantka dowiodła, że ligaza Pellino3 bezpośrednio uczestniczy w poliubikwitynacji czynnika TRAF3 w tej kaskadzie sygnałowej.

Ponieważ ubikwitynacja TRAF3 zachodzi specyficznie i proces ten kieruje TRAF3 do degradacji w proteasomach, wskutek tego traci aktywność kolejny element kaskady sygnałowej - białko IRF3, nie zdolne wtedy do translokacji do jądra komórkowego. Spada produkcja interferonów typu I, a dalszą konsekwencją tego jest zmniejszenie stanu zapalnego w wyniku braku stymulacji błonowych receptorów tego liganda – receptorów IFNAR i w efekcie końcowym zmniejszenia produkcji chemokin CXCL10 odpowiedzialnych za migrację komórek obronnych do miejsca zapalnego.

Warte podkreślenia jest, że Doktorantka wyjaśniła kolejne efekty wywołane w infekowanych IBV komórkach nabłonka płuc po ich pobudzeniu przez interferony typu I wiązane specyficznie przez błonowe receptory IFNAR. Autorka wykazała pobudzenie fosforylacji czynników STAT1 i ich udział w aktywacji genów ISG – genów stymulowanych interferonem, odpowiedzialnych m.in. za wzrost produkcji hemokiny CXCL10 w odpowiedzi na infekcję wirusową.

Na podstawie zebranych danych Autorka zaproponowała oryginalny model działania Pellino3 w regulacji transkrypcji genów kodujących ekspresję interferonu typu I oraz hemokiny CXCL10 w komórkach nabłonka płuc w stanie infekcji wirusem grypy typu B, co jest ukoronowaniem jej pracy.

W **Dyskusji** Autorka bardzo trafnie zinterpretowała uzyskane wyniki badań. Przeanalizowała je wnikliwie i kompleksowo w oparciu o dobrze wybrane cytowania aktualnej literatury światowej. To potwierdza, że Doktorantka jest bardzo dobrze wprowadzona w temat, posiada dużą wiedzę i umiejętności trafnej oceny i interpretacji uzyskanych rezultatów.

Warto podkreślić, że praca ma charakter nowatorski i wnosi istotne i oryginalne wartości do wiedzy o kaskadach sygnalizacyjnych aktywnych w komórkach w stanach infekcji wirusowych. Stanowi dobrą podstawę do dalszych badań nad mechanizmami kontrolującymi odpowiedź komórki na atakujące ją wirusy.

Tekst rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuli napisany jest interesująco, dlatego ocena tej pracy nie była dla mnie jedynie formalnym obowiązkiem, ale okazała się źródłem ciekawych informacji i możliwością pogłębienia własnej wiedzy. Generalnie oceniana rozprawa stanowi interesujące i oryginalne dzieło. Jest starannie opracowana edytorsko i graficznie. Tekst w zasadzie nie budzi zastrzeżeń co do poprawności językowej.

Podsumowując, w mojej ocenie praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane. Mgr inż. Anna Kula podjęła się zbadać bardzo ważny problem naukowy i zrealizowała zamierzone cele. Logiczny układ tekstu rozprawy, dobry styl pisania, prawidłowo cytowana literatura, a przede wszystkim sposób analizowania rezultatów badań i logicznie wyciągnięte wnioski wskazują na dużą wiedzę Doktorantki i jej dojrzałość naukową.

Warto dodać, że dodatkowym atutem wykonanej pracy jest to, iż uzyskane w tych badaniach podstawowych wyniki dają możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy w praktyce klinicznej. Odkryte przez Doktorantkę nowe mechanizmy regulujące odporność wrodzoną ustroju mogą stanowić atrakcyjny cel działania terapeutyków projektowanych do zwalczania infekcji wirusowych.

Uważam, że przedłożona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Przedstawiam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pozytywną ocenę rozprawy oraz wnioskuje o dopuszczenie mgr inż. Anny Kuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy i jej nowatorski charakter składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Katedra Biochemii i Immunochemii
Zakład Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu