



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU



1950–2020

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	03-07-2020
L. dz.	647

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Patryka Reniewicza pt. „*Mechanizmy regulacji szlaków sygnałowych receptora cytozolowego RIG-I przez ligazę ubikwityny Pellino3*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Jakuba Siednienko

Przedstawiona mi do recenzji praca podejmuje próbę wyjaśnienia udziału białka Pellino3 w regulacji odpowiedzi antywirusowej zależnej od receptorów RIG-I. W kontekście panującej pandemii, która boleśnie obnażyła bezradność ludzkości wobec wirusów, nikogo nie trzeba przekonywać, jak istotny i aktualny to temat. Pogłębienie wiedzy w tym zakresie ma nie tylko wartość poznawczą, ale i potencjał aplikacyjny, ponieważ może przyczynić się do opracowania skutecznych terapii antywirusowych.

Recenzowana rozprawa liczy 93 strony maszynopisu w układzie typowym dla rozpraw doktorskich i jest bardzo zwięzła. Doktorant cytuje 137 pozycji piśmiennictwa. Pracę poprzedza spis treści i poręczny wykaz stosowanych skrótów, a uzupełnia spis rycin i rysunków. We Wstępie Doktorant wyczerpująco przedstawia mechanizm odpowiedzi antywirusowej, charakteryzując rodzaje i rolę wzorców molekularnych, typy receptorów błonowych i cytozolowych oraz aktywowane przez nie szlaki sygnałowe, a także przedstawia rodzinę białek Pellino. Konstrukcja tej części pracy nie budzi zastrzeżeń, jest napisana bardzo przejrzysto, a piśmiennictwo zostało dobrane właściwie. Jej zrozumienie ułatwiają przygotowane przez Doktoranta ryciny. Chciałabym jednak zwrócić uwagę na konieczność precyzyjnego wyrażania się. W części tej pojawia się bowiem informacja o udziale białek Pellino w regulacji stanu zapalnego w układzie nerwowym. Doktorant wspomina o podwyższonym poziomie ekspresji Pellino1 w mózgzach pacjentów ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z mózgzami zdrowych dawców (str. 33), co sugeruje przeprowadzenie badań na żywych ochotnikach i jest raczej nieprawdopodobne. Rzeczywiście, przywołana w tym fragmencie praca Xiao i wsp. przedstawia wyniki badań *post mortem*, trudno więc mówić w tym wypadku o ochotnikach, a tym bardziej o osobach zdrowych. Co więcej,

materiał referencyjny stanowiły próbki mózgu pobrane od osób chorych, tyle że ze schorzeniami innymi niż stwardnienie rozsiane.

W dalszej części pracy Doktorant definiuje cel badań, który nieco ginie w towarzyszącym mu opisie roli ubikwitynacji w ogóle i ubikwitynazy Pellino3 w szczególności. Uważam, że opis szerszego kontekstu i zasadności przeprowadzonych badań jest bardzo istotny. Powinien on jednak pojawić się we Wstępie i być dokładnie omówiony w Dyskusji, czego wyraźnie zabrakło. Sprzeciw budzi twierdzenie Doktoranta o wykonaniu w pracy „kompleksowej analizy profilu cytokin” w świetle przeanalizowania jedynie trzech: IFN β , TNF α i IP-10. Stworzenie faktycznego profilu cytokin umożliwiłoby zastosowanie techniki multipleksowania i, w przypadku białek, oznaczeń na platformach typu Luminex, z czego w pracy nie skorzystano. Z tym zastrzeżeniem, pozostałe zaproponowane w pracy techniki badawcze uważam za dobrze dobrane i wystarczające dla realizacji zamierzonego celu. Uważam jednak, że ich opis w rozdziale Materiały i Metody wymaga uzupełnienia. Przy opisie izolacji RNA, Doktorant wspomina o ocenie czystości izolatów, nie ma jednak mowy o ocenie integralności wyizolowanego RNA – czy była w ogóle przeprowadzona? Nie pojawia się informacja o zastosowaniu kontroli reakcji odwrotnej transkrypcji, czy qPCR, ani też o wydajności użytych sekwencji starterowych. Kluczowy w reakcjach qPCR jest właściwy dobór genów referencyjnych służących do normalizacji wyników. W pracy posłużono się *HPRT*, ale nie ma informacji o badaniach własnych, czy danych literaturowych, które by wskazywały na to, że w danych warunkach eksperymentalnych wystarczy tylko jeden gen i które uzasadniałyby wybór właśnie *HPRT*. Jako praktyk uważam też, że wykonywanie badań qPCR tylko w dwóch powtórzeniach nie jest optymalne. Z kolei opis oznaczeń immunoenzymatycznych wymaga uzupełnienia o współczynniki zmienności wewnątrz- i między testami i informacji o ilości wykonanych powtórzeń technicznych. W opisie oznaczania ilości białka zabrakło sprecyzowania zastosowanych wzorców białkowych, a Western blotu - informacji o sposobie normalizacji wyników i czy przeprowadzono kontrole specyficzności przeciwciał. W opisie zastosowanych analiz statystycznych mowa jest o przedstawianiu wyników w postaci średniej \pm SD, tymczasem na rysunkach wąsy obrazujące odchylenie standardowe są tylko w jednym kierunku.

Wyniki badań Doktorant przedstawia w sposób zwięzły i logiczny, informując, co uważam za cenne, o celu każdego kolejnego kroku badawczego i interpretując uzyskany wynik. Moje krytyczne uwagi do tej części pracy dotyczą sposobu prezentacji wyników. Każdy rysunek powinien zawierać komplet informacji umożliwiający jego zrozumienie bez konieczności odwoływania się do tekstu. Tymczasem w opisach rysunków znaleźć można sprzeczne

na którym wykonano np. wizualizację (niepotrzebne), a brakuje kluczowej informacji, co dany rysunek przedstawia (np. że słupki z wąsem reprezentują średnie z powtórzeń biologicznych+SD). Na rysunkach figurują nie objaśnione w legendzie skróty, których znaczenia trzeba się domyślać (np. UT, RLU, pbiałko – przy czym „p” czasem oznacza „protein” a czasem jest symbolem fosforylacji), brakuje opisów osi Y (rys. 6.4, 6.5, 6.7, 6.8), czy opisów, co przedstawiają poszczególne panele A, B, etc. (rys. 6.4, 6.5, 6.7, 6.8). Rys. 6.3.3 przedstawia jedynie analizowane geny, a brak jest kontroli ilości DNA naniesionego na żel (gen referencyjny). Podobnie, Rys. 6.5. przedstawia jedynie analizowane białka, a brak jest normalizatora. Na Rys. 6.4, 6.5, 6.7 i 6.8 w panelu A przedstawiono reprezentatywne bloty, co jest zrozumiałe i akceptowalne. Jednak wykresy słupkowe umieszczone w kolejnych panelach powinny przedstawiać wyniki uśrednione ze wszystkich powtórzeń biologicznych wraz z analizą statystyczną. Jest to niezbędne dla potwierdzenia powtarzalności wyniku i jego znamienności. Zastosowanie przeciwiał znakowanych podczerownym fluoroforem sugeruje, że zastosowano odczyt fluorescencyjny w podczerwieni, tymczasem w pracy Doktorant powołuje się na analizę densytometryczną. W rozdziale Wyniki pojawiają się odwołania do danych literaturowych, lecz przy niektórych zabrakło odnośników (str. 58-59, str. 62).

Uzyskane wyniki podsumowują trzy poprawnie sformułowane i uzasadnione wnioski, które pozwoliły Doktorantowi zaproponować na zakończenie Dyskusji model działania Pellino3, jako molekularnego przełącznika między transkrypcją a translacją genów efektorowych indukowanych przez wirus VSIV. Szkoda, że poza tym Dyskusja pracy stanowi głównie przywołanie i interpretację wyników. Część ta bardzo by zyskała, gdyby pojawiło się tu szersze spojrzenie na znaczenie uzyskanych wyników, o którym Doktorant napomknął w Celu pracy. Sposób prowadzenia dyskursu jest miejscami zbyt zwięzły i skrótowy i tok rozumowania Autora staje się niejasny (fragment dotyczący zakażeń bakteryjnych, str. 75). Stwierdzenia „analizy te są spójne z danymi literaturowymi” aż proszą się o rozwinięcie.

Praca napisana jest ładnym i zrozumiałym językiem, choć Doktorant nie uniknął drobnych błędów edytorskich (mała/duża litera, brak nawiasów kwadratowych przy jednostkach, etc.), czy interpunkcyjnych. Przede wszystkim dopracowania wymaga staranność i konsekwencja w zapisie nazw genów z uwagi na to, że sposób zapisu wskazuje, czy mowa o genie, czy białku, oraz operowanie skrótami. Sugerowałabym również unikania słowa „poziom”, gdy można je zastąpić określeniami typu „stężenie”, czy „ilość transkryptów”, co pozwoliłoby uniknąć niefortunnnych powtórzeń, jak „...analiza poziomego czynnika *eIF4A*, który występuje w komórce na stałym poziomie”.

W podsumowaniu recenzji chciałabym podkreślić, że nie mam żadnych istotnych zastrzeżeń merytorycznych i uważam pracę za oryginalną, dobrze zaplanowaną i wykonaną, zaś jej wyniki za istotne i warte popularyzacji. Dlatego też uważam, że rozprawa doktorska mgr. Patryka Reniewicza pt. „*Mechanizmy regulacji szlaków sygnałowych receptora cytozolowego RIG-I przez ligazę ubikwityny Pellino3*”, spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr. Patryka Reniewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 28.06.2020

Z poważaniem

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOCHEMII LEKARSKIEJ

adiunkt
Małgorzata Krzystek-Korpacka
dr hab. Małgorzata Krzystek-Korpacka *Małgorzata Krzystek-Korpacka*