



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Patryka Reniewicza „Mechanizmy regulacji szlaków sygnałowych receptora cytozolowego RIG-I przez ligazę ubikwityny Pellino3.”**

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Rady Naukowej IITD PAN we Wrocławiu ze 197 posiedzenia, które odbyło się 30 maja 2019 r. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dra hab. Jakuba Siednienki. Badania zostały przeprowadzone w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

***Formalny opis rozprawy***

Praca została przygotowana w języku polskim i liczy 93 strony. W następnej kolejności zaprezentowane zostało streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Właściwa praca została podzielona na Wstęp (20 stron maszynopisu), Cel pracy (1 strona), Materiały (5 stron), Metody (8 stron), Wyniki (18 stron), Dyskusję (6 stron) oraz Bibliografię (137 pozycji literaturowych). Praca ma charakter standardowej rozprawy doktorskiej.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia ..... 07.09.2020 r. ....
L.dz. .... 796 .....

## ***Ocena merytoryczna***

Celem autora przedłożonej pracy było zbadanie wpływu białka Pellino3 na regulację szlaku sygnałowego inicjowanego przez receptor RIG-I. Pellino3 jest ligazą ubikwityny, która zaangażowana jest w regulację szlaków sygnałowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej zależnej m.in. od TLR2, TLR3 i TNFR. We wstępie pracy autor kompleksowo opisuje znane systemy detekcji zagrożenia oraz wzorców charakterystycznych dla patogenów w komórkach eukariotycznych. Opisy są poprawne i wyczerpujące. Brakuje nieco pełnego schematu pokazującego przebieg poszczególnych ścieżek sygnałowych w różnych scenariuszach (podobny do ryciny 2), co pozwoliłoby na dodanie większej liczby szczegółów na rycinie 2. W dalszej części wstępu autor opisuje historię odkrycia oraz funkcję i budowę poszczególnych białek z rodziny Pellino. Ubikwitynacja, w zależności od miejsca, może prowadzić do zmiany funkcji białka, jego aktywacji lub degradacji w proteasomie. W rozprawie autor skupia się na jednym z przedstawionych białek z tej grupy, ligazie ubikwityny Pellino3.

W rozdziale 4. Opisano cel pracy. Białko Pellino3 posiada zdolność modyfikacji ścieżek sygnałowych w komórce, włączając w to ścieżki zależne od TLR i NOD. Celem pracy było sprawdzenie, czy białko Pellino3 może modyfikować również odpowiedź zależną od receptorów RLR przy zakażeniu wirusowym. Cel pracy został jasno zdefiniowany, chociaż niepotrzebnie moim zdaniem w rozdziale pojawiają się szczegóły techniczne przeprowadzonych badań, co nieco zaciemnia obraz.

W dalszej kolejności autor opisuje wykorzystane w pracy materiały. Opis jest wyczerpujący i pozwala na identyfikację poszczególnych odczynników. Następnie autor przechodzi do opisu zastosowanej metodyki. Opisy są poprawne, jednak pojawia się kilka braków oraz niejasności. Część tabel w mojej ocenie powinna znaleźć się w sekcji materiały (m.in. wykorzystywane linie komórkowe, szczepy wirusów). Ponadto brakuje nieco informacji o genotypie wirusów oraz odniesień literaturowych / numerów pozwalających na identyfikację. Podobne niedopatrzenia pojawiają się przy opisie linii komórkowych. W opisie testu łyśinkowego nie jest jasne, czy autor korzystał z barwników (np. czerwień neutralna). Jest to standardowe podejście, a brak wybarwienia materiału może prowadzić do nieprawidłowych odczytów. W rozdziale 5.2.5.2 pojawia się opis trawienia DNA, jednak nie podano czy efekt trawienia DNA był weryfikowany eksperymentalnie. Jest to bardzo ważne z punktu widzenia interpretacji uzyskanych wyników. Nieco szkoda, że w eksperymentach nie

wykorzystano standardów, co pozwoliłoby oszacować skalę zmiany liczby poszczególnych transkryptów.

W dalszym etapie pracy autor przechodzi do opisu uzyskanych wyników. Część ta jest bardzo obszerna i pozwala na pełne zrozumienie procesu badawczego. Pojawia się tutaj z mojej strony kilka pytań dotyczących zastosowanych analiz, o których wspominam w dalszej części recenzji. Głównym zarzutem w tym miejscu jest brak jakichkolwiek analiz, które potwierdzają, że doszło do zakażenia którymkolwiek z wirusów, a obserwowane wyniki nie są artefaktem. Ponadto, pojawiają się pewne problemy z interpretacją wyników western blot, ponieważ analiza densytometryczna została przeprowadzona tylko dla wybranego obrazu i brak jest informacji o istotności statystycznej wyników. Sam proces badawczy został jednak dobrze przemyślany, a uzyskane wyniki są pełne i tłumaczą mechanistycznie obserwowany efekt.

W ostatniej części uzyskane wyniki zostają poddane pod dyskusję. Dyskusja przeprowadzona jest prawidłowo i porusza wszystkie istotne wątki związane z tematem.

Podsumowując, autor wykazał, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest istotnym czynnikiem przy indukcji odpowiedzi wrodzonej w czasie zakażenia wirusowego. Przeprowadzone eksperymenty jasno pokazały, że w czasie zakażenia VSIV białko to uczestniczy zarówno w procesie hamowania ekspresji mRNA dla IFN $\beta$  oraz IP-10 (w wyniku modulacji fosforylacji IRF3/4), jak i w procesie indukcji translacji tych cytokin poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych eIF4E oraz eIF4B.

### ***Ocena edytorska rozprawy***

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie. Lektura pokazała, że liczba błędów językowych i ortograficznych jest stosunkowo mała, co przy dużym dokumencie wymaga sporej uważności. Pewne zastrzeżenia mam do oznaczeń stosowanych w pracy. Zgodnie z wytycznymi Rady Języka Polskiego „między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy”. W pracy w kilku miejscach zasada ta nie jest przestrzegana, chociaż jest to sporadyczne. W tym miejscu warto również przypomnieć, że w podobnych opracowaniach

należy stosować odpowiednie symbole, które w życiu codziennym czasem roboczo zastępujemy literami. Przykładowo, zamiast litery „x” powinno stosować się znak mnożenia „×”. Chciałbym również zwrócić uwagę na odpowiednie stosowanie słów „liczba” oraz „ilość” z rzeczownikami policzalnymi i niepoliczalnymi.

Struktura pracy poprawna, praca została podzielona na części pozwalające na łatwą lekturę. Zawarty na początku pracy wykaz skrótów jest pełny i wyczerpujący. Ryciny w pracy są czarno białe, czytelne i dobrze opisane. Niewielkie zastrzeżenia mam jedynie do legendy – opis rycin powinien być oznaczony inną czcionką. W obecnej wersji legenda często zlewa się z tekstem. W rycinie 6.1.1. legenda jest podzielona na dwie strony.

### ***Podsumowanie***

W mojej ocenie praca prezentuje bardzo złożony i trudny temat w sposób niezwykle przystępny. Poszczególne elementy ścieżki sygnałowej zostały prześledzone krok po kroku, co umożliwia faktyczną ocenę mechaniki działania poszczególnych białek oraz samego białka Pellino3. Niewielkie uchybienia edytorskie w żaden sposób nie obniżają jakości przedstawionej pracy.

Moja ocena pracy jest bardzo wysoka, chciałbym jednak uzyskać odpowiedź na kilka nurtujących mnie pytań:

1. W pracy brak informacji, jak sprawdzono czy doszło do zakażenia wirusowego. Brak również informacji o ilościowym przebiegu tego procesu. Autor początkowo rozpoczął pracę z serią wirusów (wirus paragrypy, wirus RS, wirus grypy, wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej), jednak już po pierwszym eksperymencie odrzucił większość z nich. Wydaje się, że decyzja ta została podjęta w oparciu o brak indukcji odpowiedzi interferonowej przy zakażeniu. W mojej ocenie jednak, powód mógł być znacznie bardziej prozaiczny. Mysie makrofagi są nie najlepszym modelem dla zakażenia wirusami ludzkimi, szczególnie wirusami oddechowymi. Brak dyskusji uwzględniającej ten fakt oraz brak dyskusji dlaczego została wybrana taka linia. Co więcej, brak ilościowej oceny procesu zakażenia utrudnia lub w niektórych przypadkach uniemożliwia korelacje obserwowanej indukcji poszczególnych ścieżek z samym procesem zakażenia. Proszę o przedyskutowanie tego zagadnienia.

2. W reakcji półilościowego PCR specyficzność starterów sprawdzana była poprzez analizę krzywych topnienia PCR. Czy zweryfikowano na żeli wielkość produktu oraz czy poddano sekwencjonowaniu produkt reakcji?
3. W badaniach analizowano zakażenie wirusem w odniesieniu do kontroli mock. W niektórych przypadkach brak dokładnego wyjaśnienia, czym była kontrola mock. Preparat zakaźnego wirusa jest *de facto* lizatem komórek uszkodzonych w czasie zakażenia i jest bogaty we wszelkie cząsteczki sygnałowe, które produkowane są przez zakażone i umierające komórki. Czy próbka mock była przygotowana w podobny sposób? Czy może stosowane preparaty wirusowe oczyszczano?
4. Rozdział 6.1.2. Czy stosowano kontrolę zawierającą inaktywowanego wirusa (np. poprzez naświetlenie UV)? Zazwyczaj stosuje się niereplikujący wirus, aby wyjaśnić czy obserwowany efekt jest związany z replikacją wirusa czy tylko z obecnością PAMPs.
5. Na ile specyficzny jest inhibitor FR180204?
6. W pracy analizowano aktywność / obecność poszczególnych cytokin w pożywce hodowlanej. Czy analizowano poziom poszczególnych białek w komórkach? Czy brak podobnej analizy mógł prowadzić do nieprawidłowego uznania braku sekrecji za brak translacji?
7. Rycina 6.1.2., 6.1.3., W jakim czasie pobierany był mock? Dla każdego z punktów czasowych powinna zostać pobrana próbka referencyjna.
8. Rozdział 6.2.2. W jaki sposób zweryfikowano, czy komórki A549 są wrażliwe na zakażenie wirusem VSIV?
9. Czy prowadzone eksperymenty obejmowały pojedynczy czy wielokrotny cykl replikacji?
10. Rycina 6.8. Autor pokazuje zmianę w aktywacji czynników inicjacji translacji w komórkach po infekcji wirusem. Mam dwa pytania do tej ryciny: (a) brak jest kontroli niezakażonych w poszczególnych punktach czasowych oraz (b) czy widać jakikolwiek efekt istotny statystycznie? Jeżeli nie, nie powinniśmy wyciągać wniosków na tej podstawie. Podobnie jest w przypadku ryciny 6.7.

### ***Wnioski końcowe***

Po wnikliwym zapoznaniu się z przedstawioną pracą doktorską oraz ocenie indywidualnego wkładu mgr Patryka Reniewicza w jej powstanie, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Praca ma oryginalny i nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki mają cechy nowości naukowej. Jestem pod wrażeniem systematyczności prowadzonych badań oraz wyników, które w przyszłości mogą być źródłem kolejnych, bardzo ciekawych prac.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Patryka Reniewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Krzysztof Pyró