

Warszawa, dn. 15 czerwiec 2022 r.

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni
Kierownik Zespołu Biotechnologii Molekularnej
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabelli Jasyk zatytułowanej
„Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od
receptora dla interferonów typu I”**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Izabelli Jasyk została wykonana w Laboratorium Immunologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem dr hab. Jakuba Siednienko.

Nadrzędnym celem pracy było ustalenie roli ligazy ubikwityny Pellino3 w IFNAR – zależnej aktywacji kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do produkcji chemokin. Ponadto celem dodatkowym była próba identyfikacji kinaz i czynników transkrypcyjnych regulowanych przez ligazę ubikwityny Pellino3, pozwalających na inicjację procesu transkrypcji cytokin aktywowanych przez interferon IFN β . Nie mam wątpliwości, że zakres tematyczny niniejszej pracy i jej cele są ważne i wartościowe.

Interferony są znanymi od ponad pół wieku białkami produkowanymi przez m.in. komórki ludzkie w odpowiedzi na obecność patogenów takich jak wirusy, mikroorganizmy, pasożyty, ale też komórki nowotworowe. Cytokiny te umożliwiają komunikację komórek naszego organizmu uruchamiając



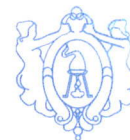
mechanizmy obronne układu odpornościowego w przypadku pojawienia się patogenów, a jednym z najważniejszych z nich jest interferon typu I (INF I), do którego zalicza się też interferon IFN β , wykorzystywany do badań w niniejszej pracy. Dzięki szerokiej wiedzy nt. immunomodulacyjnej roli interferon typu I i jego skutecznego działania farmakologicznego od wielu lat wykorzystywany jest w terapiach przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych, ale też chorób dot. zaburzeń odporności. Ze względu na powyższe, zainteresowanie zarówno naukowców, jak i przemysłu biofarmaceutycznego jest ogromne, a ilość doniesień naukowych i patentów już dawno przekroczyła wartość 100 000. Tematyka badawcza niniejszej dysertacji wpisuje się w trendy współczesnych badań, a jej owoce mogą stanowić cenny wkład w rozwój nauki i przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia.

Rozprawa doktorska mgr inż. Izabelli Jasyk, napisana w języku polskim, obejmuje 120 stron maszynopisu, podzielonych na 13 ponumerowanych rozdziałów, wśród których znajdują się elementy typowe dla tego typu utworów m.in.: streszczenie w języku polskim i angielskim (3 strony), wstęp (22 strony), założenia i cel pracy (1 strona), opis zastosowanych w pracy metod badawczych (21 stron), wyniki badań własnych (25 stron), dyskusję (10 stron), wnioski (1 strona). Ponadto praca zawiera wykaz stosowanych skrótów, bibliografię (142 pozycje literaturowe) oraz spis rycin i rysunków. Tekst został napisany jasnym językiem, jednakże nie jest on wolny od błędów, szczególnie znajdują się w dalszej części recenzji.

Prace eksperymentalne zostały podzielone na dziewięć części. We wszystkich z nich wykorzystywano dwie mysie (BMDM) i dwie ludzkie (THP-1) linie komórkowe, przy czym w każdym przypadku wykorzystano linię typu dzikiego, jak i linię z nokautem genu kodującego ligazę ubikwityny Pellino3, co pozwoliło na uzyskanie dość jednoznacznych, a zarazem cennych wyników. Wszystkie doświadczenia zostały zaplanowane w przemyślany i staranny sposób,



a kolejny etapy badań stanowią logiczną konsekwencję uzyskanych wcześniej wyników. Doboru zarówno badanych linii komórkowych, wykorzystywanych przeciwciał, jak i metod badawczych, w tym do badania poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny (reakcja RT-PCR), poziomu wydzielanych cytokin (test ELISA), jak i analizy translokacji czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego (technika Western blotting), dokonano w adekwatny do zrealizowania założonych celów sposób. W początkowej fazie prac badawczych przeprowadzono ocenę wpływu stężenia interferonu IFN β na indukcję ekspresji wybranych genów kodujących cytokiny (Cxcl9, Cxcl10, Cxcl11) i wpływu ligazy ubikwityny Pellino3 na ich ekspresję, co pozwoliło na wyznaczenie podstawowych parametrów, zastosowanych w dalszej części doświadczeń. Następnie określono wpływ białka targetowego na wydzielenie wybranych cytokin w odpowiedzi na interferon IFN β oraz przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących podjednostki receptora IFNAR, wykazując m.in., iż wzór ich ekspresji jest identyczny dla wszystkich linii komórkowych. Zbadano też wpływ ligazy ubikwityny Pellino3 na aktywację kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez interferon IFN β w trzech różnych szlakach aktywujących: JAK-STAT, MAPK i NF κ B, co pozwoliło na uzyskanie interesujących wyników, wskazujących na brak zaangażowania białka targetowego w aktywację i fosforylację kinaz białkowych MAPK (ERK1/2, JNK, p38). Ponadto sprawdzono jaki jest wpływ ligazy ubikwityny Pellino3 na translokację do jądra komórkowego czynników transkrypcyjnych aktywowanych w szlakach sygnałowych pochodzących od interferonu IFN β , ewidentnie wykazując translokację dimeru STAT1/IRF9, zwłaszcza w przypadku mysiej linii komórkowej. W ostatnich trzech etapach pracy określono wpływ ligazy ubikwityny Pellino3 na ekspresję genów kodujących cytokiny w odpowiedzi na interferon IFN β w obecności inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF κ B



(JSH23), inhibitora proteasomu 26S (MG132), inhibitora kinazy PI3K (wortmanniny) i inhibitora kinazy białkowej C (Ro318220).

Recenzowaną pracę doktorską kończy wyczerpująca dyskusja i zwięzłe podsumowanie wyników. Na podstawie uzyskanych rezultatów ustalono funkcję ligazy ubikwityny Pellino3, jako pozytywnego regulatora szlaków sygnałowych interferonu IFN β . Przedmiotowe białko wpływa na ekspresję genów *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11*, a co się z tym wiąże wydzielanie kodowanych przez nie cytokin. Ligaza ubikwityny Pellino3 przyczynia się do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 oraz pozwala na translokację do jądra komórkowego kompleksu STAT1/IRF9 i podjednostek Rel. Ponadto wpływa ona na przekazywanie sygnału w szlaku aktywującym czynnik transkrypcyjny NF κ B oraz degradację podjednostki inhibitorowej I κ B. Dyskusja została zakończona schematem przedstawiającym prawdopodobny mechanizm pozytywnej regulacji transkrypcji genów kodujących cytokiny w szlakach sygnałowych aktywowanych interferonem IFN β przez ligazę ubikwityny Pellino3, co stanowi wartościowe podsumowanie.

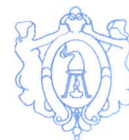
Zamierzone cele zostały osiągnięte, wzbogacając świat nauki w cenne informacje. Uzyskane przez mgr inż. Izabellę Jasyk wyniki mają dużą wartość poznawczą i z pewnością będą stanowiły podwaliny pod dalsze badania zespołu Laboratorium Immunologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu PAN oraz innych grup naukowych.

Lektura pracy doktorskiej nasunęła też kilka pytań, do których ustosunkowanie się proszę autorkę:

- i. Str. 25, 26, 28, 31, 32, 35 – ryciny 5.1-5.6 przedstawiają różne szlaki, które zostały zapożyczone z artykułu naukowego autorki. Dlaczego nie zastosowano cytowań literaturowych w opisie pod rysunkami? Proszę o wyjaśnienie dlaczego wszystkie ryciny są



- v. Str. 78 (Rys. 8.15) „Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach THP-1 wykazały, że podczas traktowania komórek IFN β do translokacji STAT1 do jądra komórkowego dochodzi jedynie w komórkach dzikich.” – jak wyżej.
- vi. Str. 79 (Rys. 8.17) „Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach THP-1 wykazały, że podczas traktowania komórek IFN β przez 60 i 90 minut jedynie w komórkach typu dzikiego dochodzi do translokacji białka p65 do jądra komórkowego.” – jak wyżej.
- vii. Str. 80, niektóre rysunki mają anglojęzyczne oznaczenia jak np. rys 8.18 czy 8.22. Z czego to wynika?
- viii. Str. 82 „Wyniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym pokazały, że w THP-1 WT nie zaobserwowano zahamowania ekspresji genu kodującego CXCL10 (Rys. 8.19). Jednakże w teście ELISA obserwowano obniżenie produkcji cytokiny CXCL9...” – proszę o wyjaśnienie z czego mogą wynikać te rozbieżności.
- ix. Str. 86-88, na rysunkach 8.26 - 8.29 przedstawiono poziom ekspresji genów kodujących cytokiny tylko dla linii komórkowych mysich w odpowiedzi na traktowanie komórek interferonem IFN β , w obecności wortmanniny. Dlaczego nie przeprowadzono badań również dla linii komórkowych ludzkich? Ponadto proszę wyjaśnić dlaczego na w/w rysunkach zestawiono obok siebie słupki dla linii komórkowej BMDM WT i BMDM Peli3^{-/-}? We wszystkich wcześniejszych eksperymentach wyniki uzyskane dla w/w linii były prezentowane osobno.
- x. Str. 100 na rysunku 10.1 brakuje dokładnego opisu tak jak ma to miejsce w przypadku wszystkich innych rycin i rysunków. Warto też wyjaśnić co oznacza czerwony kolor.



czarno-białe i nie najlepszej jakości/rozdzielczości, a część rycin (np. 5.1 i 5.2) została pozbawiona dolnej części w stosunku do publikacji. Warto zauważyć, że w publikacji rysunki są kolorowe i czytelne. Ponadto żadna z rycin nie ma odnośnika w tekście.

- ii. Str. 64 „*Stężenie 50 ng/ml okazało się granicznym, wyższe nie dały istotnego wzrostu pobudzenia ekspresji*” – czy na pewno jest to stężenie graniczne? Z rysunku 8.1 wynika, że w przypadku stężenia 100 ng/ml relatywny poziom mRNA dla genu *Cxcl10* jest o ok. 20% wyższy, a dla genu *Cxcl11* jest nawet o ok. 40% wyższy.
- iii. Str. 67 „*Ze względu na niewykrywalny poziom ekspresji genu CXCL9 oraz CXCL11 w komórkach nietraktowanych IFN β , niemożliwe było wyznaczenie relatywnego poziomu mRNA dla tych cytokin*” – czy próbowano zastosować zamiast metody izolacji całkowitego RNA alternatywne metody izolacji samego mRNA (np. z wykorzystaniem kuleczek magnetycznych), które zazwyczaj pozwalają na otrzymanie wyższych stężeń mRNA o znacznie lepszej czystości niż w przypadku mieszaniny RNA? Alternatywnie można przeprowadzić reakcję RT-PCR przy pomocy różnych zestawów – czy dokonano optymalizacji wyboru najlepszej jakości odczynników od różnych producentów?
- iv. Str. 70 (Rys. 8.8) „*...wyraźna fosforylacja STAT1 obserwowana jest dopiero po 15 minutach stymulacji*” oraz str. 71 (Rys. 8.9) „*W komórkach THP-1 WT obserwowana fosforylacja TYK2 zanika po 60 minutach stymulacji IFN β , podczas gdy w komórkach Pellino3 KO fosforylacja kinazy TYK2 jest znikoma*” – ze względu na nie najlepszą jakość czarno-białych zdjęć trudno to ocenić. Proszę o przedstawienie wysokiej jakości kolorowych zdjęć. Proszę wyjaśnić w jaki sposób dokonano weryfikacji.



Praca doktorska została napisana w sposób zrozumiały i logiczny, niemniej jednak nie uniknięto błędów edycyjnych i językowych, takich jak brak spacji (np. str. 44) czy przecinków, „literówki”, błędów składniowych i fleksyjnych itp. Zdarzają się też niefortunne sformułowania, np.

- i. Str. 9-10 w wykazie stosowanych skrótów wyjaśniono wzory sumaryczne związków chemicznych jak np. CO₂, H₂O, które są powszechnie znane.
- ii. Str. 19 „*Wszystkie ludzkie geny IFN typu I wywodzą się z tego samego genu ancestralnego i za ich kodowanie odpowiedzialne jest wiele genów*”. – geny nie są odpowiedzialne za kodowanie genów, natomiast są odpowiedzialne za kodowanie białek.
- iii. Str. 21 „*Ze względu na dużą homologię sekwencji aminokwasowej z IFN α (...)*” – homologia oznacza obecność podobnych własności ze względu na pochodzenie od wspólnego przodka, nie jest tożsama z identycznością sekwencji. W przypadku sekwencji aminokwasowych można stwierdzić pewien stopień podobieństwa bądź identyczności.
- iv. Str. 23 „*Ludzki IFNAR1 jest białkiem o masie cząsteczkowej około 130 kDa zbudowanym z 557 aminokwasów (...)*” – powinno być reszt aminokwasowych, przy czym należy zaznaczyć, iż to sformułowanie pojawia się wielokrotnie.
- v. Str. 23 „*Jedynie u kotów ekspresji ulega funkcjonalne białko (...)*” – ekspresji ulegają geny nie białka. Wyrażenie dotyczące ekspresji białka pojawia się wielokrotnie.
- vi. Str. 29 „*Ludzki IFNAR1 jest kodowany przez 30 kb gen*” – powinno być „Ludzki IFNAR1 jest kodowany przez gen o



długości około 30 kpz”. Skrót kb pochodzi od angielskiej nazwy „kilo base”, co oznacza kilo zasad (ssDNA a nie dsDNA), w języku polskim używamy skrótu kpz – kilo par zasad. Powtarza się w tekście kilka razy.

- vii. Str. 90 Zdanie rozpoczynające dyskusję nie jest w pełni zrozumiałe „*Odkrycie INF i chęć zrozumienia molekularnych mechanizmów jakie pełni on w organizmach było głównym postępem w biologii i medycynie w ciągu ostatnich 60 lat.*” Warto zauważyć, że w całym tekście stosuje się anglosaski sposób zapisu nazw białek operując tylko skrótami np. INF, CXCL10, Pellino3. Znacznie lepiej w języku polskim brzmią pełne sformułowania dotyczące biomakromolekuł tzn. np. zamiast INF to białko INF, zamiast CXCL10 to cytokina CXCL10, zamiast Pellino3 to białko Pellino3 lub ligaza ubikwityny Pellino3.

Powyższe uwagi nie przeczą mojej pozytywnej opinii nt. recenzowanej pracy. Kandydatka do stopnia naukowego doktora potrafi umiejętnie sformułować cele badawcze i zaplanować doświadczenia, by je osiągnąć. Ponadto bardzo dobrze umie dobrać i wykorzystać zasoby literaturowe, czego dowodem są cytowania najważniejszych prac w zakresie jej tematyki. Potrafi też posługiwać się we właściwy sposób szeregiem metod eksperymentalnych, uzyskując wymierne rezultaty, co dowodzi jej dojrzałości naukowej i zasługuje na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dorobek mgr inż. Izabelli Jasyk obejmuje dwie publikacje, w tym jedną przeglądową i doniesienie konferencyjne związane tematycznie z pracą doktorską. Wszystkie prace są anglojęzyczne, a łączny współczynnik wpływu



wynosi 6,802. Prowadzone badania były finansowane w ramach projektu Sonata BIS Narodowego Centrum Nauki nr UMO-2015/18/E/NZ3/00695.

Reasumując, doktorantka podczas realizacji prac badawczych przedstawionych w dysertacji uzyskała bogaty materiał doświadczalny, a jej praca doktorska wykazuje istotną wartość przede wszystkim pod względem poznawczym, ale też aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości naukowej.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Izabelli Jasyk w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789 z późniejszymi zmianami) w związku z artykułem ustawy z dnia 13 lipca 2018 roku - Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Jednocześnie **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr inż. Izabelli Jasyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego w celu nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni

