



**WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII**  
**im. gen. Karola Kaczkowskiego**  
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4  
tel. 261 853 101 fax 261 853 133  
e-mail: [kancelaria.jawna@wihe.pl](mailto:kancelaria.jawna@wihe.pl)

PAN - Instytut Immunologii  
Wpł. dnia ...04-07-2022  
L.dz. ...170

dr hab. n. med. Małgorzata Krzyżowska, prof. WIHiE  
Kierownik Zakładu Medycyny Regeneracyjnej  
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii  
w Warszawie

Warszawa, 15.06.2022

### **OCENA**

#### **rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabelli Jasyk pt. "Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w szlaku"**

Praca wykonana w Laboratorium Immunologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Promotor: dr hab. Jakub Siednienko

Ze względu na nieustanny kontakt z czynnikami zakaźnymi o etiologii wirusowej, bakteryjnej ale również z grzybami czy pasożytami, w drodze ewolucji doszło do rozwoju mechanizmów rozpoznawania i usuwania patogenów atakujących zarówno organizmy jednokomórkowe, jak i zaawansowane ewolucyjnie kręgowce. Wrodzona, nieswoista odpowiedź immunologiczna opiera się na mechanizmach które rozwinęły się wcześniej w filogenezie, są mniej precyzyjne ale stanowią pierwszą linię obrony. Interferony (IFN) stanowią grupę cytokin wytwarzanych i uwalnianych przez komórki w odpowiedzi na zakażenia wirusowe.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 120 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie Doktorantka opisuje szczegółowo wszystkie trzy typy interferonów: I, II i III, z uwzględnieniem ich roli w odpowiedzi immunologicznej, oraz budowy białka i lokalizacji w genomie. Następnie Autorka szczegółowo opisuje wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnałów uruchamiane w odpowiedzi na związanie IFN 3 wymienionych typów ze

specyficznymi receptorami. Wstęp zakończono opisem ligaz Pellino z dokładną charakterystyką uruchamianych przez nie szlaków transdukcji sygnału oraz pełnią przez nie rolę, na podstawie dostępnych danych literaturowych. Autorka nie ustrzegła się błędu merytorycznego we wstępie, chociaż w moim poczuciu może być on zwykłym błędem edytorskim. Na stronie 19 Autorka pisze m.in.: „W osoczu i surowicy osób z chorobami autoimmunologicznymi [DeStefano i wsp. 1982] takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów czy zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS)[Lau i wsp. 1991]”. AIDS to choroba wywołana zakażeniem wirusem HIV, nie zaś choroba autoimmunologiczna.

W mojej opinii wstęp do rozprawy stanowi dobre i wyczerpujące wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Zważywszy na powszechne wykorzystanie interferonu typu I w terapiach przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych oraz w leczeniu stwardnienia rozsianego, dokładne poznanie mechanizmów regulacji odpowiedzi zależnej od IFN typu I może mieć kluczowe znaczenie dla powodzenia tych terapii. W swojej rozprawie doktorskiej Doktorantka postawiła sobie cel badawczy polegający na ustaleniu funkcji jaką pełni ligaza Pellino3 w IFNAR-zależnej aktywacji kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do produkcji chemokin ważnych w odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, Doktorantka podjęła się również próby identyfikacji kinaz i czynników transkrypcyjnych regulowanych przez Pellino3 i determinujących inicjację transkrypcji chemokin aktywowanych przez IFN $\beta$ .

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka przedstawiła szczegółową listę technik oraz odczynników stosowanych przez nią w pracach badawczych. Należy przypuszczać, że przed przystąpieniem do badań opracowano kryteria wyboru zarówno komórek *in vitro*, jak i użycia IFN $\beta$  do stymulacji receptora IFNAR, chociaż w rozprawie doktorskiej zabrakło tych informacji. Opis technik biologii molekularnej jest bardzo wyczerpujący i sporządzony w sposób umożliwiający ich odtworzenie. Zastanawia mnie jednak wybór BMDM do badań. Z opisu skrótu można wnioskować, że bone marrow derived macrophages zostały poddane jakiejś procedurze unieśmiertelnienia, jednak sam fakt że nie jest to linia dostępna komercyjnie, jak THP-1, wymaga opisu skąd została pozyskana, w jaki sposób otrzymana itp. Zakładamy, że są to makrofagi otrzymane ze szpiku kostnego myszy, ale czemu wybrano taki model – tej informacji nie znalazłam. Istnieją mysie linie komórkowe, jak choćby RAW 264, które są dobrze poznane i powszechnie wykorzystywane do badań.

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie 29 klarownych graficznie rycin, stanowiących ilustrację dla opisywanych wyników. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że

Doktorantka posłużyła się w badaniach techniką Western-blotting, która bywa techniką trudną i „kapryśną” w praktyce laboratoryjnej, a przedstawione wyniki wskazują na uzyskanie dużej biegłości w posługiwaniu się tą techniką przez Doktorantkę.

Ważną częścią rozprawy doktorskiej jest przeprowadzona na 11 stronach Dyskusja, w której omówione zostały uzyskane wyniki w oparciu o ok. 150 pozycji literaturowych oraz Rycinę przedstawiającą hipotetyczne działanie szlaku ligazy Pellino 3. Autorka dokonuje klarownego podsumowania wyników oraz ich omówienia w świetle informacji dotyczących ligaz Pellino dostępnych w literaturze. Dyskusja pozwala na poznanie znaczenia pozyskanych wyników w świetle istniejącej wiedzy o przekazywaniu sygnału indukowanego przez IFN typu I, co świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności krytycznego spojrzenia na pozyskane wyniki. Autorka formułuje wnioski w ścisłym powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań.

W obowiązku recenzenta pozostaje mi jednak zadać pytania dotyczące związane bezpośrednio ze sposobem wykonywania badań, który mógł wpływać na wyniki i ich interpretację.

- Na ryc. 8.2 Autorka pokazuje kinetykę zmian ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM i zarówno w rozdziale Wyniki, jak i w Dyskusji stwierdza, że najwyższą ekspresję pozyskano w 4h stymulacji IFN $\beta$ . Zważywszy na dokładność przedstawienia pozostałych wyników pozostaje zadać pytanie czy nie badano kinetyki zmian ekspresji w/w genów po 4h, bądź czy istnieje inny powód, dla którego nie pokazano ekspresji w innych godzinach po inkubacji z IFN $\beta$ ?

- Omawiając wyniki uzyskane na blotach, Autorka posługuje się stwierdzeniami typu: „znaczaco wyższy”, „wyraźny”, itp. Technika Western-blottingu ma swoje niezaprzeczalne zalety, ale również wady, a do nich zalicza się brak możliwości uzyskania bezpośredniego wyniku w postaci cyfr, które można następnie poddać obróbce statystycznej. Dopiero taka obróbka pozwala na użycie stwierdzenia „znaczaco wyższy” z podaniem przedziału ufności. Pozostaje mi zatem zadać Autorce pytanie, czy przy ocenie wzrostu/spadku aktywacji czy translokacji do jądra komórkowego, Doktorantka posługiwała się techniką densytometryczną, która pozwala na ocenę „gęstości” sygnału, a tym samym ocenę statystyczną? Ocena wizualna może wprowadzać w błąd, czego przykładem jest ryc. 8.15 oraz znajdujący się na str. 78 opis tej ryciny. Zakładam, że Doktorantka wykonywała bloty w powtórzeniach, a do dysertacji użyła blotów wizualnie najatrakcyjniejszych.

- Zastanawiam się, czy wyniki pokazane na Ryc. 8.5 dla chemokiny CXCL9 w formie białka i jednocześnie brak wyników dla ekspresji mRNA genu *Cxcl9* w BMDM wynika z rodzaju dobranych starterów do reakcji PCR? Czy Doktorantka dokonywała optymalizacji doboru starterów?

Rozprawa doktorska mgr inż. Izabelli Jasyk, pominiawszy powyższe usterki, jest napisana starannie, logicznie a poziom merytoryczny świadczy o dużej wiedzy Autorki i umiejętności jej wykorzystania przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem mgr inż. Izabelli Jasyk wniesionym do wiedzy o roli ligazy Pellino3 w szlakach transdukcji sygnału uruchamianych przez IFN $\beta$ , jak również do wiedzy o szlakach wewnątrzkomórkowych uruchamianych przez zaliczany do IFN typu I.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.) i tym samym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o dopuszczenie magister inżynier Izabelli Jasyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

