

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; 601 342 781
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. EDYTY SZUREK PT. „ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO AIRE W RÓŻNICOWANIU AUTOREAKTYWNYCH I REGULATOROWYCH LIMFOCYTÓW T CD4⁺”

Rozprawa na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr inż. Edyty Szurek została przygotowana w postaci monografii w języku polskim. Pracę wykonano w the Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, USA pod kierunkiem Prof. dr hab. Leszka Ignatowicza. Praca dotyczy zagadnień związanych z mechanizmami selekcji limfocytów T w grasicy, a w szczególności roli czynnika transkrypcyjnego Aire. Zaburzone mechanizmy selekcji limfocytów T w grasicy prowadzą do wielu zjawisk immunopatologicznych będących podstawą rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym i autozapalnym. Mechanizmy tych zaburzeń nie zostały jak dotąd w pełni wyjaśnione. Stąd wybór tematyki pracy uważam za niezwykle interesujący zarówno z teoretycznego jak i klinicznego punktu widzenia i podjęcie badań tym kierunkiem było w pełni uzasadnione.

Monografia mgr inż. Edyty Szurek liczy 133 strony i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz literaturę.

Zanim przejdę do bardziej szczegółowego omówienia treści rozprawy muszę najpierw podzielić się z Doktorantką i pozostałymi czytelnikami pewnymi ogólnymi, ale w mojej opinii bardzo ważnymi uwagami. W całej rozprawie Doktorantka używa niepoprawnych terminów takich jak „odpowiedź immunologiczna”, „choroby autoimmunologiczne” itp. Chciałbym zwrócić uwagę, że termin „immunologiczny” odnosi się do nazwy nauki zajmującej się odpornością. Tym samym powinno się używać prawidłowo terminów „odpowiedź odpornościowa” (immune response) i „choroby autoimmunizacyjne” (autoimmune diseases). Wiem, że w potocznym języku naukowym często używa się przymiotnika „immunologiczny”, ale w piśmiennictwie, podręcznikach i monografiach należy jednak używać form uznanych za językowo poprawne.

Przy okazji pozwalam sobie zwrócić również uwagę na inne zagadnienia terminologiczne. W mojej opinii, zgodnie z trendami w piśmiennictwie międzynarodowym, powinniśmy zarzucić używanie terminów „odpowiedź nieswoista” i „odpowiedź swoista lub nabyta” i zastąpić je

bardziej adekwatnymi terminami „odporność/odpowiedź wrodzona” (innate) i „odporność/odpowiedź adaptacyjna” (adaptive).

Streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera zwięzły opis założeń i tematu pracy i w sposób ogólny przedstawia uzyskane wyniki. We wstępie mgr inż. Edyty Szurek przedstawiła podstawowe informacje dotyczące wrodzonej (nieswoistej) i adaptacyjnej (swoistej) odpowiedzi odpornościowej. O ile informacje dotyczące odpowiedzi nieswoistej są na bardzo ogólnym poziomie, to opis odpowiedzi swoistej jest bardziej szczegółowy i dotyczy dojrzewania i różnicowania limfocytów T oraz, co szczególnie istotne w kontekście tematyki rozprawy, powstawania kompleksu receptora limfocytów T oraz ich selekcji pozytywnej i negatywnej. Co się tyczy mechanizmów selekcji limfocytów to odczuwam pewien niedosyt, ponieważ ich opis jest zbyt ogólnikowy. Kilka zdań Autorka poświęca też w tej części wstępu limfocytom B.

Zasadniczą częścią wstępu jest część dotycząca tolerancji odpornościowej. Doktorantka opisuje tu główne mechanizmy kładąc nacisk na rozwój i różnicowanie limfocytów Treg oraz budowę i rolę białka AIRE. Podsumowaniem wstępu jest informacja na temat mysich modeli opartych na nokaucie genu *Aire*.

Jako całość wstęp jest dobrym wprowadzeniem w tematykę rozprawy i uzasadnia założenia i cele pracy. Muszę jednak dodać, że wstęp znacznie zyskałby na atrakcyjności i przejrzystości, gdyby Doktorantka zilustrowała go np. schematami mechanizmów prezentacji antygenów w przebiegu selekcji pozytywnej i negatywnej z uwzględnieniem roli AIRE. Doskonałym uzupełnieniem byłoby również zamieszczenie schematu budowy cząsteczki AIRE z zaznaczeniem głównych domen związanych z jego aktywnością.

Główny celem pracy mgr inż. Edyty Szurek było zbadanie wpływu prezentacji zależnych od Aire antygenów tkankowo-swoistych na rozwój, różnorodność i auto-reaktywność limfocytów Treg w grasicy i obwodowych narządach limfatycznych. Ponadto Doktorantka zajęła się również identyfikacją klonów odpowiedzialnych za uszkodzenia „organów” u myszy ze znokautowanym genem *Aire*. Przesłanki do realizacji powyższych celów znajdują potwierdzenie w aktualnym stanie wiedzy. Mam jednak zastrzeżenie do tego, że cele pracy zostały sformułowane w sposób bardzo nieprecyzyjny co w pewnym stopniu utrudnia recenzentowi ocenę czy cele te zostały zrealizowane zgodnie z założeniami.

Jak to opisano w założeniach i celu pracy, do realizacji powyższych celów Doktorantka oparła się na modelu myszy transgenicznych o ograniczonym repertuarze TCR (TCR^{mini}), które skrzyżowano z myszą TCR α ^{ko}, a następnie z myszą transgeniczną B6Foxp3^{hCD2}. Niestety nie wspomniała ona w tym miejscu nic o myszach Aire^{ko}. W tym miejscu rodzi mi się również wątpliwość czym w rzeczywistości jest używana w doświadczeniach mysz nazywana TCR^{mini}. Wydaje mi się bowiem, że to co w dalszych opisach Doktorantka określa jako kontrolna mysz

TCR^{mini}, z którą krzyżuje się mysz Aire^{ko}, jest w rzeczywistości krzyżówką „właściwej” myszy TCR^{mini} z myszą TCR α ^{ko} i myszą B6Foxp3^{hCD2}.

Kolejna część pracy „Materiały i metody” podzielona jest na dwie zasadnicze sekcje, gdzie Doktorantka opisuje materiały stosowane w pracy (sekcja Materiały) oraz zastosowane metody (sekcja Metody). W sekcji Materiały wymieniono wszystkie używane w pracy odczynniki chemiczne oraz szczegółowo opisano skład wszystkich stosowanych buforów, roztworów i pożywek. Podane są również sekwencje wszystkich stosowanych starterów oraz lista stosowanych przeciwciał. Sekcję tę uzupełnia lista stosowanych linii komórkowych oraz szczepów myszy z ich bardzo dokładnym opisem od strony molekularnej i genetycznej.

W sekcji Metody Doktorantka opisała szczegółowo sposoby izolacji i sortowania limfocytów z badanych narządów, metody hodowli komórek, tworzenie hybrydom oraz ich stymulację antygenami tkankowymi, oznaczanie przeciwciał metodą ELISA, oznaczanie cytokin, izolację kwasów nukleinowych, ich rozdział elektroforetyczny, reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), przygotowywanie bibliotek DNA oraz sekwencjonowanie metodą Illumina. Tę część kończy opis metod statystycznych.

Generalnie opis materiałów i metodyki badań jest poprawny i spełnia warunki stawiane tego rodzaju opisom. Osobiście wolałbym, gdyby np. składy buforów lub pożywek były podawane w opisie metod, bo to ułatwiłoby czytanie bez konieczności cofania się do innej części pracy. Nie jest to jednak istotny problem. Problemem jest natomiast opis izolacji limfocytów z „blaszki właściwej jelita grubego”. Otóż z opisu tego wynika, że do badań pobierano jelito cienkie, a nie grube co może podważać dalsze rozważania Doktorantki dotyczące natury obserwowanych zjawisk immunopatologicznych. Nie jest dla mnie również jasne co to jest „blaszka właściwa”. Jako „praktykujący” histolog domyślałem się, że może chodzić o blaszkę właściwą błony śluzowej. Jednak z opisu preparacji wynika, że obróbce poddawano całą ścianę jelita. Dużą wątpliwość budzi również opis sposobu pozyskiwania surowicy. Autorka pisze, że pobierano „kilka” kropli krwi do 250 μ L HBSS. Oznacza to, że surowica była rozcieńczana, ale słowo „kilka” oznacza, że nie wiadomo, ile razy (nieznana jest objętość pojedynczych kropli i ile ich było). Tym samym ilościowe oznaczanie immunoglobulin i cytokin w surowicy, które jest według Doktorantki ważnym kryterium oceny zaburzeń autoimmunizacyjnych, może być obciążone ogromnym błędem.

W sekcji „Wyniki” mgr inż. Edyta Szurek opisała na samym początku rezultaty „analizy kolonii pod kątem choroby autoimmunologicznej”. W tym miejscu jestem nieco skonfundowany, ponieważ nie wiem o jaką lub jakie kolonie chodzi. Z kontekstu domyślałem się, że chodzi o kolonie myszy TCR^{mini} i Aire^{ko}. W dalszej części Doktorantka przedstawiła analizę fenotypową komórek z grasicy zarówno pod względem fenotypu jak i repertuaru TCR.

W kolejnych etapach pracy mgr inż. Edyta Szurek zajęła się analizą fenotypową limfocytów w różnych węzłach limfatycznych oraz jelicie, wątrobie i gruczole krokowym. Przedstawienie szczegółowych wyników jest poprzedzone bardzo dokładnym opisem strategii analizy cytometrycznej (strategii bramkowania). Opis ten jest niezwykle istotny, ponieważ upewnia czytelnika o poprawności i rzetelności wykonanej oceny analizy cytometrycznej. Podkreślam ten fakt, bowiem przedstawianie takiej strategii nie zawsze jest regułą. Analiza limfocytów w badanych narządach została przeprowadzona wielokierunkowo, pod względem wielu markerów, zarówno u myszy młodych jak i dorosłych. Daje to bardzo dokładny obraz zmian charakteryzujących oba porównywane szczepy myszy. Poza tym, Doktorantka dokonała również analizy histologicznej jelita, gruczołu krokowego i wątroby badanych myszy oraz przeanalizowała w tych narządach sekwencje CDR3 TCR.

Na koniec Doktorantka przeanalizowała potencjalne reakcje autoimmunizacyjne hybrydom uzyskanym z komórek z różnych narządów w odpowiedzi na stymulację antygenami z tych narządów.

Muszę przyznać, że metodologia oraz zakres badań przeprowadzonych przez mgr inż. Edytę Szurek zasługuje na duże uznanie. Uzyskane wyniki zostały bardzo dobrze i przekonująco udokumentowane graficznie na kolorowych wykresach i szczegółowo opisane w tekście. Mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że uzyskane wyniki i ich opis stanowią bardzo mocny element niniejszej rozprawy.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedyskutowała w świetle dotychczasowej wiedzy, która w tej dziedzinie niestety nie jest bardzo obszerna. Dyskusję oceniam bardzo dobrze, chociaż wydaje mi się, że Autorka mogła ustrzec się powtarzaniu niektórych informacji zawartych we wcześniejszych częściach rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej analizy wyników oraz korzystania z piśmiennictwa. Piśmiennictwo zostało starannie dobrane i jest właściwie cytowane.

W podsumowaniu Doktorantka odniosła się do założeń i celów swojej pracy. W mojej opinii zostały one w pełni zrealizowane chociaż, jak już wcześniej wspominałem szczegółowa ocena ich realizacji jest trudna z powodu wielu wielowątkowości pracy. Bez wątpienia Doktorantka dowiodła, że ekspresja Aire jest istotna dla prawidłowej selekcji limfocytów, a co najciekawsze, że brak tego czynnika jest powodem rozwoju zmian w wątrobie o charakterze autozapalnym, czego główną przyczyną wydaje się być upośledzona funkcja komórek Treg.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr inż. Edyta Szurek dysponuje bardzo bogatym i zaawansowanym technicznie warsztatem badawczym. Ma szeroką wiedzę w temacie prowadzonych badań i nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniającej ją do ubiegania się o stopień doktora. Doktorantka nie ustrzegła się od pewnych błędów i niedociągnięć głównie wynikających ze swego rodzaju niestaranności w

opisie przedstawianych zagadnień. Moje krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie mają jednak wpływu na moją ogólną wysoką ocenę rozprawy. Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Edyta Szurek jest oryginalnym osiągnięciem Autorki oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Edyty Szurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 05/04/2023

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk