



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia ...0.6...07...2022....
L.dz.176.....

Wydział Lekarski
Katedra Biochemii i Immunochemii
Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Wrocław, 04-07-2022

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabelli Jasyk pt. „Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptora dla interferonów typu I”

promotor rozprawy: dr hab. Jakub Siednienko

Charakterystyka formalna

Rozprawa doktorska mgr inż. Izabelli Jasyk jest klasyczną dysertacją napisaną w formie monografii. Na uwagę zasługuje fakt, że źródłem finansowania badań zawartych w rozprawie był projekt grantowy SONATA BIS nr UMO-215/18/E/NZ/2/00695 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki. Doktorantka jest autorką lub współautorką dwóch prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie anglojęzycznych o współczynnikach wpływu 5.924 i 0.878 oraz jednego wystąpienia konferencyjnego.

Dysertacja obejmuje 120 stron tekstu i ma układ typowy dla prac tego rodzaju. Doktorantka podzieliła całość opracowania na 12 rozdziałów ułatwiających w ten sposób prześledzenie zawartych treści.

Wstęp teoretyczny został poprzedzony wykazem publikacji Doktorantki, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. Zawarty na 24 stronach tekst Wstępu podzielony na podrozdziały zawiera zwięzłe wprowadzenie teoretyczne do podjętych badań. W osobnym rozdziale Doktorantka umieściła założenia i cel pracy. Następną część rozprawy tworzy opis wykorzystanych materiałów, zajmujący osiem podrozdziałów oraz omówienie metod, przedstawione w kolejnych sześciu podrozdziałach. W dalszej partii tekstu, zawartej na 26 stronach, przedstawione są wyniki wykonanych badań; dla lepszej czytelności część ta została podzielona na 9 podrozdziałów. Zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników zawiera kolejny rozdział dysertacji. Po nim, na 11 stronach rozwinięta jest dyskusja, gdzie Doktorantka omawia najważniejsze problemy

naukowe rozprawy. W ostatniej części umieszczone są wnioski końcowe, wykaz cytowanego piśmiennictwa oraz spis rycin i rysunków.

Charakterystyka i ocena merytoryczna

Tytuł rozprawy doktorskiej „Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptora dla interferonów typu I” prawidłowo odzwierciedla jej zawartość.

Wstęp teoretyczny napisany jest rzeczowo, przystępnie i stanowi właściwie wyselekcjonowany kompleks wiedzy na temat kontroli szlaków sygnalizacyjnych istotnych w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej funkcjonujących w komórkach obronnych atakowanego przez patogeny ustroju, odpowiedzialnych za odporność wrodzoną.

Podane w pierwszej części wprowadzenia kluczowe informacje dotyczące układu odpornościowego w organizmie człowieka umiejętnie kierują uwagę czytelnika w stronę interferonów typu I, receptorów Toll-podobnych, różnych elementów kaskad sygnalizacyjnych zaangażowanych w wyzwianie odpowiedzi odpornościowej i produkcję chemokin, wytwarzanie cytokin prozapalnych, w mechanizmach odporności wrodzonej. Doktorantka omawia w przystępny sposób znaczenie fosforylacji, a przede wszystkim procesu ubikwitynacji w modyfikacjach potranslacyjnych białek uczestniczących w szlakach sygnalizacyjnych, wskazując na istotną rolę ligazy ubikwityny E3 w mechanizmach regulacyjnych odpowiedzi immunologicznej.

Najobszerniejszą częścią Wstępu jest podrozdział poświęcony cytokinom przeciwwirusowym, takim jak interferony. Doktorantka przystępnie charakteryzuje rodzinę interferonów typu I, w tym interferon β oraz ich receptory błonowe. Bardzo przydatne są włączone w tekst ryciny ilustrujące szlaki sygnałowe aktywowane w komórkach odpornościowych przez interferony typu I, w tym czytelny schemat aktywacji czynnika jądrowego NF κ B. Omówione w kolejnej części Wstępu ścieżki sygnalizacyjne pobudzone interferonem typu II i III dobrze uzupełniają i wzbogacają ten rozdział rozprawy.

Następnie Autorka opisuje rodzinę białek Pellino i ich w niewielki stopniu poznane funkcje w kontroli aktywacji niektórych szlaków sygnalizacyjnych uczestniczących w mechanizmach odpowiedzi odpornościowej wrodzonej. W mojej opinii, we Wstępie klarownie omówiono mechanizmy i zjawiska niezbędne do zrozumienia założeń i celu rozprawy oraz podano kluczowe zagadnienia istotne w późniejszej ocenie i interpretacji uzyskanych wyników doświadczalnych. Warto dodać, że Doktorantka trafnie wyselekcjonowała cytowane piśmiennictwo, w tym również ważne publikacje promotora rozprawy, mającego bogaty dorobek naukowy w zakresie badań mechanizmów odpowiedzi immunologicznej komórek systemu obrony.

Założenia i cel pracy zostały określone prawidłowo, w sposób jasny i jednoznaczny. Celem głównym zaplanowanych badań było określenie funkcji ligazy ubikwityny E3, Pellino3 w kaskadzie sygnalizacyjnej pobudzonej wskutek stymulacji komórek obronnych przez interferon β . Dodatkowo zaplanowano cele szczegółowe, które dotyczyły określenia, jakie tory sygnałowe nie będą wrażliwe na Pellino3, a które zostaną zaktywowane z udziałem tego białka. Ponadto postanowiono zbadać, jakie elementy tych szlaków będą kontrolowane bezpośrednio przez Pellino3 oraz zamierzono wykazać, których cytokin produkcja nasili się w takich warunkach.

Materiały i metody opisane są dokładnie i klarownie. Dobre wrażenie robi przedstawiony wykaz odczynników, tabelarycznie pokazane m.in. zestawy komercyjne do wykonania reakcji PCR w czasie rzeczywistym, różne zestawy do testów ELISA, duży wachlarz przeciwciał I i II rzędu do immunodetekcji ilościowych i jakościowych.

Warto podkreślić, że w metodach badawczych Autorka wykorzystywała najnowsze techniki biologii molekularnej, oznaczeń biochemicznych i immunochemicznych. Godna uznania jest duża różnorodność i kompleksowość użytych technik laboratoryjnych. Procedury zastosowane w realizacji założonych zadań są skomplikowane, czasochłonne i ich wykonanie wymaga dużego nakładu pracy. Ich wykorzystanie wskazuje na wielką pracowitość Doktorantki i jej bardzo dobre opanowanie warsztatu metodycznego.

Wyniki. Bardzo wysoko oceniam jakość uzyskanych wyników i formę ich prezentacji. Ten rozdział rozprawy podzielono na podrozdziały, w których rzetelnie udokumentowano i konsekwentnie omówiono rezultaty badań *in vitro* na liniach komórkowych makrofagów mysich pochodzenia szpikowego oraz monocytach ludzkich.

Uzyskane wyniki zilustrowano na 29 rycinach o bardzo przejrzystej konstrukcji, prawidłowo i jasno opisanych. Styl ilustracji jest jednorodny, co w istotny sposób ułatwia porównywanie analizowanych parametrów badanych w różnych wariantach linii komórkowych, tzn. w typie dzikim makrofagów mysich BMDM WT i monocytów ludzkich THP1 WT oraz w odpowiednich liniach komórek z nokautem genu kodującego białko Pellino3 – BMDM *Peli3*^{-/-} i THP1 Pellino3 KO.

Do istotnych i oryginalnych rezultatów należy zaliczyć wykazanie przez Autorkę, że ligaza ubikwityny E3 Pellino3 nie uczestniczy w aktywowaniu kinaz białkowych ERK 1/2, JNK, p38 należących do kinaz MAPK. Ukoronowaniem pracy Doktorantki jest wyjaśnienie, że Pellino3 w komórkach makrofagów mysich i w monocytach ludzkich pobudzanych przez interferon β odpowiada za regulację czynnika transkrypcyjnego NF κ B oraz IRF9 - czynnika transkrypcyjnego 9, regulującego ekspresję genu kodującego interferon typu I. Poprzez aktywację tych czynników Pellino3 ma wpływ na wzrost produkcji chemokin Cxcl10, Cxcl11 odpowiedzialnych za migrację komórek obronnych do miejsca zapalnego.

Na podstawie zebranych danych Autorka zaproponowała dwa nowe modele działania Pellino3 w regulacji procesów translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego wyżej wymienionych aktywnych form specyficznych czynników transkrypcyjnych, kluczowych w pobudzeniu transkrypcji genów kodujących oba typy zidentyfikowanych chemokin w komórkach monocytów ludzkich i makrofagów mysich.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób wnikliwy i przejrzysty. Analizę i interpretację uzyskanych wyników oparto o trafnie dobrane cytowania literatury światowej. Z treści dyskusji wynika, że Doktorantka jest bardzo dobrze wprowadzona w temat, posiada dużą wiedzę oraz umiejętności trafnej oceny i interpretacji uzyskanych rezultatów. Warto podkreślić, że otrzymane wyniki mają charakter nowatorski i wnoszą do nauki istotne i oryginalne wartości.

Muszę przyznać, że czytanie tekstu rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabelli Jasyk nie było dla mnie jedynie formalnym obowiązkiem, ale okazało się źródłem intelektualnej satysfakcji.

Generalnie oceniana rozprawa stanowi interesujące i oryginalne dzieło. Jest starannie opracowana edytorsko i graficznie. Tekst w zasadzie nie budzi zastrzeżeń jeśli chodzi o poprawność językową. Doktorantce udało się uniknąć większych błędów edytorskich. Jednak z obowiązku recenzentki muszę wskazać na kilka drobnych potknięć:

1. w wykazie skrótów:

str. 10 jest niewłaściwe opisanie skrótu IRF jako czynnik regulujący interferon;
powinno być IRF: czynnik regulujący ekspresję genu kodującego interferon

str. 11 brak skrótu NEMO wymienionego na str. 98

– powinno być wyjaśnienie: czynnik modulujący NFκB

str. 13 brak skrótu TNF jako czynnik martwicy nowotworu

2. str. 24 jest „...indukującej ekspresję geny...”
powinno być „.. indukującej ekspresję genów...”

3. str 65/ ryc. 8.2- opis:
jest ... w odpowiedzi na FNβ ...; powinno być na IFNβ

4. str. 91/ 5 wiersz od góry:
jestzwiązania się z INFβ.. ; powinno być ... z IFNβ..

/ 4 wiersz od dołu:
jest ...po stymulacji komórek IFNβ ..; powinno być ... przez IFNβ....

5. str.95/ 14 wiersz od góry
jest ... delacją... powinno być delecją...

6. str. 97/ 13 wiersz od góry jest Mg132 powinno być ... MG132....

7. str. 99/ 6 wiersz od góry
jest prowadzącej do aktywacji....., a w rezultacie indukcji czynników
powinno być: prowadzącej do aktywacji....., a w rezultacie do indukcji czynników..

8. str 101/ punkt 3)
jest ...fosforylacje, . translokacją...; powinno być ...fosforylację ... translokację

Powyższe uwagi nie obniżają wartości naukowej ocenianej rozprawy i nie umniejszają mojej wysokiej oceny.

Podsumowując, w mojej ocenie mgr inż. Izabella Jasyk podjęła się zbadać bardzo ważny problem naukowy i zrealizowała zamierzone cele. Logiczny układ tekstu rozprawy, dobry styl pisania, prawidłowo cytowana literatura, a przede wszystkim sposób analizowania rezultatów badań i logicznie wyciągnięte wnioski wskazują na dużą wiedzę Doktorantki i jej dojrzałość naukową.

Warto dodać, że dodatkowym atutem wykonanej pracy jest to, iż uzyskane w takich podstawowych badaniach wyniki dają możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy w praktyce klinicznej. Odkryte przez Doktorantkę nowe mechanizmy regulujące odporność wrodzoną ustroju mogą stanowić atrakcyjny cel działania terapeutyków projektowanych do zwalczania infekcji wirusowych.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny dysertacja spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Przedstawiam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

pozytywną ocenę rozprawy oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Izabelli Jasyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy i jej nowatorski charakter składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej nagrodą.

Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Katedra Biochemii i Immunochemii
Zakład Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu



Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Biochemii i Immunochemii
ZAKŁAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ
starszy wykładowca

dr hab. Jadwiga Pietkiewicz