UNIWERSYTET GDAŃSKI

IN MARI VIA TUA

Prof. dr hab.
KRZYSZTOF P. BIELAWSKI
Zakład Diagnostyki Molekularnej

Gdańsk, 06 czerwca 2016 r.

PAN Instytut Immunologii
Wpł. dnia 10-06-2016
L. dz 252/16

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Magister Ewy Kowalczyk

p.t.: "Rola białka adaptorowego Mal/TIRAP w szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR7"

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Jakuba Siednienko, prof. PAN
w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Rozprawa doktorska Pani magister Ewy Kowalczyk koncentruje się na badaniu mechanizmów molekularnych działania białek zaangażowanych w indukcję odpowiedzi zapalnej i przebieg chorób wynikających z autoagresji, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń układowy rumieniowaty czy łuszczyca – schorzeń niezwykle trudnych w leczeniu, stanowiących bardzo istotny problem zdrowotny na całym świecie. Z tego względu podjęta tematyka pracy wpisuje się w pełni w nurt światowych badań nad zagadnieniami sygnalizacji komórkowej, których celem jest znalezienie właściwych metod immuno-modulujących przydatnych w leczeniu powyższych chorób.

W niniejszej pracy podjęto próbę ustalenia roli białka adaptorowego Mal w szlaku sygnałowym receptora TLR7. W tym celu analizie poddano poziom indukowanych przez TLR7 cytokin: IFNβ, TNFα i IP-10. Zbadano aktywację poszczególnych elementów kaskady sygnałowej w komórkach typu dzikiego i pozbawionych zdolności ekspresji białka Mal. Podjęto również próbę wyjaśnienia mechanizmu stojącego za zależną od białka Mal aktywacją kinaz białkowych ERK1/2 i czynnika transkrypcyjnego IRF7. Badania oparto na komórkach pochodzenia mieloidalnego: mysich makrofagach izolowanych z myszy $Mal^{-/-}$ i typu dzikiego oraz komórkach THP-1 i ludzkich plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych z wyciszoną ekspresją genu dla białka Mal oraz po zastosowaniu peptydu o działaniu antagonistycznym względem białka Mal.

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

MWB

Praca wykonana została w Laboratorium Białek Sygnałowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod kierunkiem Pana dr hab. Jakuba Siednienko, profesora PAN w ramach projektu **OPUS4 Narodowego Centrum Nauki** nr UMO-2012/07/B/NZ3/02550 i współfinansowana ze środków **Wrocławskiego Centrum Badań EIT+** w ramach realizacji projektu **NanoMat** – „Wykorzystanie nanotechnologii w nowoczesnych materiałach", (POIG.01.01.02-02-002/08), zadanie 7.2, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani Magister Ewy Kowalczyk jest opracowaniem w języku polskim, zawartym na 105 stronach maszynopisu i posiada wszystkie istotne wymagane elementy składowe tj.: streszczenie pracy, wykaz stosowanych skrótów, wstęp z uzasadnieniem wyboru tematu, cel pracy, ponadto materiały i metody, wyniki i ich omówienie w postaci dyskusji oraz wnioski. Wstęp (27 stron) zawiera 4 podrozdziały, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po jednostronicowym przedstawieniu celu pracy następuje opis materiałów i metod (13 stron). Wyniki (25 stron) są podzielone na 11 podrozdziałów a osobną częścią rozprawy jest jednostronicowe podsumowanie wyników. Dyskusja zawarta jest na 13 stronach i zakończona czterema syntetycznymi wnioskami z realizacji projektu pracy doktorskiej. Praca zawiera ponadto spis 210 pozycji literatury oraz streszczenie w języku angielskim. Rozprawa doktorska Pani magister Ewy Kowalczyk spełnia zatem wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom.

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy przedstawia aktualny stan wiedzy na temat sygnalizacji komórkowej aktywowanej przez receptory Toll – podobne.

Autorka w wyczerpujący sposób opisuje budowę receptorów Toll- podobnych ze szczególnym uwzględnieniem receptora TRL, który stanowił przedmiot badań w projekcie. Czytelnik ma też możliwość zapoznania się z bardzo dobrze opisanymi szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez receptory Toll – podobne. Doktorantka kończy „Wstęp" opisem

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

aktualnych możliwości terapeutycznych i perspektyw nowych terapii opartych o wiedzę o tych receptorach.

Wstęp napisany jest dobrym językiem, zwięźle i przejrzyście. Opracowanie to wskazuje, iż Autorka posiada usystematyzowaną wiedzę teoretyczną na temat molekularnych aspektów badanego problemu. Dobór źródeł literaturowych użytych do opisu przedstawionych zagadnień nie budzi zastrzeżeń.

Z obowiązku recenzenta pragnę natomiast odnieść się do stosunkowo słabego, w mojej opinii, zilustrowania bardzo złożonych i trudnych zagadnień opisywanych we wstępie. Doktorantka zamieściła w całym wstępie jedynie trzy schematy, z których kluczowy dla zrozumienia i zilustrowania prezentowanych szlaków sygnałowych aktywowanych przez receptor TLR7 schemat na stronie 31 pozostawia niedosyt. Brak jest np. w tekście opisującym sygnalizację aktywowaną przez TLR7 odniesienia do niektórych białek zaznaczonych na schemacie (OPN, a raczej iOPN). W innym miejscu pracy Autorka stwierdza, iż wiedza na temat prezentowanych danych (zwłaszcza dotycząca funkcji białka adaptorowego Mal) jest w niektórych aspektach **dyskusyjna,** co nie jest odzwierciedlone w prezentowanym schemacie. Pani Kowalczyk nie podaje poza tym, na podstawie jakich źródeł literaturowych opracowała schemat.

W podrozdziale opisującym rolę receptorów TLR w toczniu układowym rumieniowatym doktorantka wspomina o wycinkach **węzłów chłonnych pobranych.... ze szpiku kostnego** (str. 36). Prosiłbym o **doprecyzowanie źródła pochodzenie tychże węzłów chłonnych.** Ciekawi mnie również, **czym według Autorki różni się zakażenie od infekcji** (str. 36) i na koniec tej analizy krytycznej wstępu - chciałbym zapytać **jaki rodzaj nowotworu może być powodowany przez zakażenie narządów płciowych wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV)**, powodującego powstawanie brodawek, czyli kłykcin kończystych?

Mimo tych kilku uwag krytycznych, wysoko oceniam tę część rozprawy, którą przeczytałem z zaciekawieniem. Na pochwałę zasługuje odpowiedni dobór treści, podanych w sposób logiczny, na właściwym poziomie szczegółowości. Wstęp jest oparty na bogatym piśmiennictwie i dokumentuje dużą wiedzę Doktorantki w zakresie tematyki pracy.

Cel pracy sformułowany poprawnie i zrealizowany w toku pracy został przedstawiony w jednostronicowym rozdziale, w formule, która w mojej opinii jest nieco błędna, gdyż zawiera fragment należący raczej do końcowej części wstępu (dwa pierwsze akapity rozdziału „Cel pracy")

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

oraz fragment opisujący zastosowaną metodykę badań (pasujący raczej do części „Wyniki" lub „Dyskusja"). W tej części powinno pojawić się tylko jedno zdanie rozpoczynające akapit trzeci.

Pragnę natomiast w tym miejscu zaznaczyć, iż cały omawiany rozdział „Cel pracy" dużo lepiej spełniłby, po odpowiednim uzupełnieniu o uzyskane wyniki i wnioski, funkcję Streszczenia pracy niż to streszczenie, które jest zaprezentowane przez Autorkę. Mam nadzieję, iż ta uwaga krytyczna skłoni na przyszłość Doktorantkę do bardzo precyzyjnego formułowania streszczenia (czy w innych rodzajach prac - abstraktu), który ma zarysować aktualny stan wiedzy i hipotezę naukową, cel badań, zastosowaną metodykę, osiągnięte wyniki i wyciągnięte z nich wnioski w niezmiernie skondensowanej i syntetycznej postaci.

Materiały i metody zostały przedstawione w kolejnym rozdziale i dobrane odpowiednio do założonych celów. Ich zakres jest szeroki, co wskazuje na dużą biegłość i sprawność Doktorantki w posługiwaniu się warsztatem doświadczalnym w dziedzinie biologii molekularnej komórki.

W moim przekonaniu, opis zastosowanych metod jest na tyle szczegółowy, że umożliwia powtórzenie przeprowadzonych doświadczeń.

Wyniki pracy przedstawione zostały na 25 stronach maszynopisu. Rozdział ten składa się z 4 części, konsekwentnie opisujących realizację postawionego sobie przez Doktorantkę celu projektu. Wyniki pracy obejmują 29 rycin, przedstawiając konsekwentny cykl doświadczeń prowadzących do próby poznania roli białka adaptorowego Mal/TIRAP w szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR7. W swojej pracy Autorka zastosowała dwa modele doświadczalne: mysi – w postaci unieśmiertelnionych mysich makrofagów pochodzenia szpikowego (linia komórkowa BMDM) oraz ludzki – w postaci ludzkich białaczkowych plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych (linia komórkowa pmDC05), ludzkich komórek mikrogleju (CHME-5), ludzkich monocytów krwi obwodowej (THP-1) oraz ludzkich komórek embrionalnych nerek, w których w stabilny sposób następuje ekspresja receptora TLR7 (HEK293/TLR7). Takie zaplanowanie modelu badawczego umożliwiło kompleksową analizę roli białka Mal w szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR7.

W swojej pracy pani mgr Kowalczyk wykazała między innymi, iż białko adaptorowe Mal jest niezbędne do zależnej od receptora TLR7 ekspresji genu dla IFNβ, wpływa na aktywację kinaz białkowych ERK1/2 na drodze zależnej od TLR7, nie wpływa z kolei na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Białko to jest natomiast niezbędne do aktywacji czynnika IRF7. Ponadto,

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

w wyniku aktywacji receptora TLR7 (w myśli interpretacji uzyskanych wyników zaprezentowanej przez Doktorantkę) dochodzi do zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF-κB indukcji ekspresji czynnika transkrypcyjnego IRF7, a proces ten jest wymagany do ekspresji genu kodującego IFNβ. Indukcja ekspresji genu dla IFNβ jest zależna od receptora TLR7 i białka adaptorowego Mal i wpływa na aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT-1 i indukcję ekspresji chemokiny IP-10. Aktywacja kinazy TBK1 w odpowiedzi na ligand receptora TLR7 nie jest zależna od białka Mal. Fosforylacja kinaz białkowych ERK1/2 w odpowiedzi na aktywację receptora TLR7 nie podlega kontroli kinazy tyrozynowej Brutona czy kinazy białkowej C, ale jest warunkowana aktywnością kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K.

W szeregu eksperymentów z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym do normalizacji wyników stosowano gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (HPRT). Proszę o wyjaśnienie, **na jakiej podstawie wybrano ten gen referencyjny do normalizacji pomiaru ekspresji genów w różnych układach doświadczalnych** – zarówno mysich makrofagach pochodzenia szpikowego (BMDM), komórkach ludzkich monocytów (THP-1) jak i ludzkich białaczkowych plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych (PMDC05).

W ramach dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej Pani magister Ewy Kowalczyk z przyjemnością **poproszę ponadto o wyjaśnienie kilku pojęć zastosowanych w pracy:**

- bufor pasywny (str. 60, podpis pod ryc. 6.5.1.),
- podczerwony fluorofor (str. 49, 55, 59, 67, 72, 73, 74, 75),
- całkowita forma kinaz (str. 56)

Generalnie bardzo pozytywnie oceniam poziom merytoryczny i techniczny zamieszczonych w rozprawie wyników, a także sposób ich prezentacji. Autorka przedstawiła spójną linię badawczą, jasno zaprezentowała i poprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki. Badania Doktorantki przyczyniają się do bardziej szczegółowego zrozumienia molekularnych mechanizmów interakcji białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory Toll – podobne.

Strona edytorska pracy nie budzi zasadniczo zastrzeżeń, stosunkowo nieliczne błędy interpunkcyjne, literowe i stylistyczne nie umniejszają jej jakości.

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

Dyskusja zawierająca omówienie uzyskanych wyników zajmuje 13 stron maszynopisu.

Autorka przeprowadza w niej krytyczną i wnikliwą analizę uzyskanych wyników w kontekście aktualnego stanu wiedzy. Autorka potwierdza, między innymi, że cześć uzyskanych wyników jest zgodna z istniejącymi doniesieniami literaturowymi. Dyskusja ma charakter wszechstronny i wyczerpujący i jest mocnym elementem rozprawy. Praca jest zarówno zakończona wyodrębnionym podsumowaniem wyników jak i wnioskami końcowymi po zaprezentowanej dyskusji, co daje końcowe, ostateczne przeświadczenie czytelnikowi, iż Autorka precyzyjnie umie określić wartość uzyskanych w trakcie realizacji projektu wyników, oszacować stopień zrealizowanego celu i umiejscowić swoje osiągnięcia na tle aktualnej wiedzy w badanym przedmiocie.

Pozytywnie oceniam zatem Dyskusję pracy i zawarte w niej treści. Ten ważny rozdział monografii doktorskiej mgr Ewa Kowalczyk napisała wartkim, poprawnym językiem naukowym i ładną polszczyzną, z należnym podkreślaniem wartości własnych wyników oraz autorskich przemyśleń związanych z ich nie zawsze łatwą interpretacją.

Jedyny niedosyt budzić może brak propozycji modelu (np. w postaci schematu) interakcji białka adaptorowego Mal/TIRAP z innymi elementami szlaku sygnałowego zależnego od receptora TLR7. Schemat taki mógłby być swoistym „graficznym" podsumowaniem uzyskanych przez Doktorantkę wyników i jako nowa hipoteza naukowa – punktem wyjścia do zaproponowania dalszych badań.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Ewy Kowalczyk podejmuje istotny problem naukowy z dziedziny biologii molekularnej komórki, o potencjalnym znaczeniu praktycznym w poszukiwaniu możliwych terapii chorób o podłożu autoagresji. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane. Uzyskane wyniki są niewątpliwie cennym wkładem Autorki do wiedzy przedmiotu i solidną podstawą do dalszych badań. Doktorantka wykazała się zarówno dużą wiedzą teoretyczną, sprawnością eksperymentatora jak i umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników i ich interpretacji w stosunku do istniejącego stanu wiedzy. Moje uwagi mają przede wszystkim charakter dydaktyczny i nie umniejszają wartości rozprawy, są natomiast wskazówkami do planowania przyszłych badań i prezentacji wyników.

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w rozumieniu Ustawy o tytule i stopniach naukowych i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN z wnioskiem o dopuszczenie Pani Magister Ewy Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Bielawski

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-307 Gdańsk ul. Abrahama 58
tel. 058 523 63 14,
kom. 725 991 243
bielawski@biotech.ug.edu.pl