Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII BIAŁEK
ul. Joliot-Curie 14a, pok. 3.30
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 29 29
fax +48 71 375 76 61

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 01-07-2016
L. dz. 285/16

Wrocław, 24 czerwca 2016

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR EWY KOWALCZYK, ZATYTUŁOWANEJ:

ROLA BIAŁKA ADAPTOROWEGO MAL/TIRAP W SZLAKU SYGNAŁOWYM ZALEŻNYM OD RECEPTORA TLR7

Praca doktorska pani mgr Ewy Kowalczyk przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę w Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Promotorem pracy był dr hab. Jakub Siednienko, profesor w Polskiej Akademii Nauk. Praca doktorska dotyczy mechanizmów odporności wrodzonej, która stanowi podstawową linię obrony organizmów przed patogenami. Odkrycie w latach 90-tych dwudziestego wieku rodziny receptorów Tol-podobnych zmieniło diametralnie rozumienie mechanizmów odporności wrodzonej i otworzyło olbrzymie pole do badań naukowych. Ponieważ od tego odkrycia nie upłynęło jeszcze dużo czasu, wiele szczegółowych mechanizmów działania odpowiedzi odpornościowej wynikającej z aktywacji receptorów Tol-podobnych, wciąż pozostaje nieznanych. Poznanie jednego z takich mechanizmów postawiła sobie za cel Pani mgr Ewa Kowalczyk.

Celem pracy było wyjaśnienie, czy białko adaptorowe Mal (zwane też TIRAP) bierze udział w przekazywaniu sygnałów od receptora TLR7, a jeśli tak, to do jakich efektów komórkowych prowadzi szlak sygnałowy w którym białko Mal uczestniczy.

Przedstawiona do oceny praca liczy 105 stron, składają się na nią następujące rozdziały: spis treści, streszczenie, wykaz skrótów używanych w pracy, wstęp, przedstawienie celu badań, opis stosowanych materiałów i metod, wyniki, następnie podsumowanie wyników, dyskusja, wnioski, potem streszczenie w języku angielskim oraz spis cytowanej literatury.

Praca jest zredagowana starannie, język i styl są poprawne, nie ma błędów gramatycznych ani interpunkcyjnych, zawiera raptem kilka tzw. literówek.

Wstęp liczy 27 stron. Po bardzo krótkim opisie składowych i mechanizmów obronności wrodzonej, przedstawiono w nim bardziej szczegółowo rodzinę receptorów Tol-podobnych, oraz wzorce molekularne rozpoznawane przez te receptory. Bardzo szczegółowo opisane zostały białka biorące udział w przekazywaniu sygnałów od aktywowanych receptorów Tol-podobnych do jądra komórkowego, aktywowane czynniki transkrypcyjne oraz interferony produkowane pod wpływem aktywacji receptorów Tol-podobnych. Na koniec przedstawiono choroby z autoagresji, w których rozpoznanie wzorców molekularnych przez receptor TLR7 jest elementem patomechanizmu. Jak wspomniano, dużą część wstępu zajmuje opis białek biorących udział w sygnalizacji od receptorów Tol-podobnych. Ta część wstępu mogłaby znacznie zyskać, gdyby umieszczono w niej rysunki, bądź schematy pokazujące sposób, umiejscowienie oraz kolejność aktywacji poszczególnych białek i cząstek sygnalizacyjnych. Wiele z wymienionych w treści składowych szlaków sygnalizacyjnych nie występuje na żadnym z rysunków zamieszczonych w pracy.

Na stronie 38 przedstawiono cel pracy. Ta część rozprawy składa się z trzech akapitów, spośród których tylko trzeci przedstawia cel pracy. Uważam, że dwa pierwsze akapity są niepotrzebne, gdyż ich treść została już przedstawiona we wstępie.

13-stronicowy rozdział „Materiały i metody" jest jasno i szczegółowo napisany. Jedynym moim zastrzeżeniem do tego rozdziału jest to, że nie podano w nim, ile razy powtarzano eksperymenty. W szczególności jest to istotne w przypadku eksperymentów typu Western-blot.

Rozdział „Wyniki" liczy 26 stron. W rozdziale tym przedstawiono wyniki licznych eksperymentów, wykonanych na komórkach mysich oraz ludzkich, których celem było zbadanie, czy białko Mal uczestniczy w przekazywaniu sygnału od aktywowanego receptora TLR7. W eksperymentach zastosowano wiele różnorodnych technik badawczych, hodowle komórek *in vitro* oraz *ex vivo*, transdukcje komórek lentiwirusami, reakcje PCR, Real-time PCR, testy ELISA, elektroforezę kwasów nukleinowych oraz białek, oznaczenia typu Western-blot, analizę reporterową ekspresji genów oraz immunoprecypitację chromatyny. Większość eksperymentów oraz ich interpretacji była logicznie przeprowadzona, jednak z niektórymi chciałabym polemizować. Moje zastrzeżenia do poszczególnych eksperymentów wymienię w kolejności odpowiadającej ich występowaniu w pracy.

Na stronie 52 napisano, że związek R848 jest selektywnym ligandem receptora TLR7, w związku z tym w dalszych eksperymentach wszelkie efekty wywołane przez R848 przypisywano aktywacji TLR7. Tymczasem firmy sprzedające R848 podają, że jest to aktywator TLR7 oraz TLR8 (np. http://www.invivogen.com/r848; http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0196?lang=pl&region=PL). Uprzejmie proszę o wyjaśnienie tej kwestii w trakcie obrony doktoratu.

Głównym modelem badawczym były komórki, mysie makrofagi BMDM oraz ludzkie komórki białaczki szpikowej THP-1, w których wyciszano ekspresję genu kodującego białko Mal. Modele te zostały stworzone w ramach wykonywania pracy doktorskiej, w celu pozyskania komórek pozbawionych białka Mal. Niestety, w pracy nie pokazano, jaki był poziom tego białka w wykorzystywanych modelach komórkowych. Pokazano jedynie brak mRNA w komórkach mysich w klasycznej reakcji PCR (ryc. 6.1.3.) oraz obniżenie do koło 60% mRNA dla Mal w komórkach THP-1 w reakcji Real-time PCR (ryc 6.4.3.1.). Tymczasem uważa się, że mechanizm działania shRNA wprawdzie jest różnorodny, ale głównie polega na hamowaniu translacji białka, więc poziom mRNA dla blokowanego genu niekoniecznie musi być wprost proporcjonalny do poziomu białka. Na stronach 54/55 napisano wręcz, że „obniżenie ekspresji genu kodującego IFNβ na drodze zależnej od TLR7 jest skutkiem nokautu genu kodującego ... Mal". Uważam, że jest to nadinterpretacja.

Na rycinie 6.3. przedstawiono wyniki eksperymentu, w którym badano aktywację kinaz Erk1/2 w eksponowanych na R848 komórkach mikrogleju, które, jak podano w pracy, nie syntetyzują receptora TLR7. Z faktu, że w żadnej z badanych prób nie zaobserwowano obecności fosforylowanej formy Erk1/2 wyciągnięto wniosek, że R848 działa specyficznie za pośrednictwem TLR7. Moim zdaniem, w tym eksperymencie powinna zostać pokazana pozytywna kontrola, w której kinazy Erk1/2 zostałyby fosforylowane w odpowiedzi na jakiś inny czynnik. Przedstawiony brak aktywnych kinaz Erk1/2 może bowiem wynikać z wielu innych powodów, niż ten podany w interpretacji, np. z powodu zbyt niskiego stężenia pierwszorzędowego przeciwciała w detekcji Western-blot.

W rozdziale 6.5.2. przedstawiono wyniki eksperymentów wykonanych na komórkach, w których oprócz białka Mal, wyciszano także czynnik transkrypcyjny IRF7. Proszę o wyjaśnienie, gdyż z tekstu nie wynika to jednoznacznie, czy oba wprowadzone wektory wyciszające ekspresję genów (Mal oraz IRF7) posiadają oporność na ten sam antybiotyk, puromycynę. Jeśli tak, to uważam, że zastosowana strategia wyciszania dwóch genów nie jest

prawidłowa, gdyż nie ma gwarancji, że w komórkach, na których wykonywano eksperyment oba wektory były stale obecne. Ponadto, również w tych komórkach nie zbadano poziomu białka, którego obecność zamierzano wyeliminować.

Na rycinie 6.9.1. przedstawiono wyniki eksperymentu, w którym badano w komórkach BMDM dzikiego typu oraz z wyciszonym białkiem Mal, eksponowanych na R848, aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT-1. Brak aktywacji STAT-1 w komórkach z wyciszonym Mal zinterpretowano, jako brak autokrynnego działania IFNβ, który wydzielany jest po ekspozycji komórek typu dzikiego na R848. Wydaje mi się, że jest to nadinterpretacja. Aby wykazać faktyczny udział IFNβ wydzielanego przez komórki BMDM, należałoby dodać do nich przeciwciała anty-IFNβ, uniemożliwiającego jego autokrynne działanie, lub chociaż zablokować translację białek, aby wykazać, że faktycznie czynnik aktywujący STAT-1 jest wtórnie produkowany w odpowiedzi na aktywację komórek za pomocą R848.

W 13-stronicowej „Dyskusji" doktorantka przeanalizowała uzyskane przez siebie wyniki, ułożyła badane przez siebie szlaki sygnałowe w sieć powiązań oraz przedyskutowała je na tle dostępnych w literaturze naukowej danych. Dyskusja jest prowadzona w sposób logiczny, jakkolwiek uważam, że niektóre stwierdzenia są zbyt mocne. Wynika to ze wspomnianej przeze mnie nadinterpretacji niektórych wyników. Uważam, że praca dostarczyła wielu silnych przesłanek na udział białka Mal w przekazywaniu sygnału od receptora TLR7 do aktywacji genów interferonowych, natomiast nie są to dowody (na tyle, na ile „dowody" w naukach biologicznych w ogóle istnieją). Również w tej części pracy przydałby się schemat lub rysunek podsumowujący sieć sygnalizacyjną, która zdaniem doktorantki, pośredniczy w przekazywaniu sygnałów od TLR7.

Na stronie 91 pracy znajduje się rozdział „Wnioski". Wniosków jest cztery. O ile z pierwszymi trzema wnioskami się zgadzam, to uważam, że punkt czwarty nie jest wnioskiem, lecz kolejną hipotezą, która wymaga dalszych badań.

Cytowana literatura to 210 publikacji dobranych adekwatnie do badanego tematu. Wszystkie cytowane publikacje są anglojęzyczne, pochodzą z renomowanych czasopism naukowych. Jedynym minusem jest pewien brak staranności w edycji niektórych publikacji, których tytuły są napisane wielkimi literami, w odróżnieniu od większości cytowanych tytułów.

Analizując pracę doktorską pani mgr Ewy Kowalczyk należy podkreślić, że temat pracy jest bardzo ciekawy naukowo, a doktorantka opanowała bardzo wiele nowoczesnych metod

badawczych. Uważam, że przedstawione wyniki wnoszą spory wkład w rozumienie przekazywania sygnału od receptora TLR7 do jądra komórek układu odporności. Nie zgadzam się z wszystkimi interpretacjami uzyskanych wyników i uważam, że wnioski powinny być formułowane z większą ostrożnością.

Moje uwagi do przedstawionej do oceny rozprawy nie umniejszają znaczenia większości przeprowadzonych eksperymentów. Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej zatytułowanej: *Rola białka adaptorowego Mal/TIRAP w szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR7* jest pozytywna. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Ewy Kowalczyk przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa Marcinkowska