

Prof. dr hab. Joanna Wesoły
Laboratorium Technologii Wysokoprzepustowych
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 5 czerwca 2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Łośko zatytułowanej „Rola białka MCPIP1 w biologii adipocytów i otyłości”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Magdaleny Łośko została wykonana w ramach realizacji projektu badawczego, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz grantu Uniwersytetu Jagiellońskiego dla młodych naukowców, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką prof. dr hab. Jolanty Jury.

W pracy doktorskiej opisano badania związane z homeostazą adipocytów, a dokładniej funkcją białka MCPIP1 - czynnika regulującego ich różnicowanie i regulującego odpowiedź zapalną na czynniki zewnętrzne (gromadzenie tłuszczu). Białko to, będące RNAzą, inhibuje czynniki transkrypcyjne NF- κ B i AP1 oraz redukuje poziom transkryptów IL-6 i IL-1beta, jednocześnie regulując poziom transkryptu C/EBPbeta, transaktywatora kolejnych czynników transkrypcyjnych, kluczowych w procesie różnicowania adipocytów (C/EBP α , PPAR γ). Celem pracy była analiza ekspresji MCPIP1 w tkance tłuszczowej myszy poddanych diecie wysokotłuszczowej, u pacjentów z otyłością trzewną i skórną oraz w procesie adipogenezy. Funkcję MCPIP1 analizowano w liniach komórkowych 3T3-L1 (preadipocyty), w biopsjach tkanki tłuszczowej mysiej i ludzkiej, a także w ludzkich komórkach macierzystych z tkanki tłuszczowej podskórnej. W pracy pokazano, iż ekspresja białka MCPIP1 jest obniżona w tkance tłuszczowej myszy poddanych diecie wysokotłuszczowej, jego transkrypt jest także obniżony w podskórnej tkance tłuszczowej osób otyłych i negatywnie koreluje z poziomem cytokin prozapalnych. Ponadto, zarówno poziom białka jak i transkryptu, zmieniają się podczas adipogenezy i są indukowane poprzez stymulację IL-1beta oraz TNFalfa. Zwiększona ilość MCPIP1 koreluje z obniżeniem poziomu transkryptów genów zaangażowanych w proces adipogenezy, regulacji metabolizmu węglowodanów i kwasów tłuszczowych oraz zwiększoną ekspresją mRNA i białka czynników biorących udział w sygnalizacji komórkowej: RAS, Rap, TNF i PIK-ATK. W komórkach 3T3-L1, w których nadeksprimowano MCPIP1, obserwuje się obniżony poziom Glut4 i osłabiony wychwyt glukozy

oraz obniżoną aktywację szlaku insulinowego, co może być konsekwencją zmniejszenia ekspresji receptora insulinowego i fosforylacji Akt.

Struktura pracy jest poprawna i przejrzysta, chociaż wstęp mógłby zostać poszerzony o kilka rycin. Biorąc pod uwagę, iż wstęp opisuje stosunkowo dużą liczbę procesów molekularnych i jest szczegółowy, łatwiejsze dla czytelnika byłoby wsparcie tekstu kilkoma schematami, zapewne oczywistymi dla Autorki, ale przyjaznymi dla osób czytających pracę (np.: etapy adipogenezy, budowa MCPIP1 itp.). Należy podkreślić szczególną staranność w dopracowaniu edytorskim tekstu i brak błędów literowych, co świadczy o skrupulatności Autorki. Zauważyłam tylko jeden błąd w Rycinie 6, gdzie pomyłono w opisie przypisanie podpunktów do ryciny. Z przyjemnością czytałam także Dyskusję, która jest zarówno obszerna jak i rzeczowa, co ukazuje, iż Autorka bardzo dobrze orientuje się w dostępnej literaturze i stanowi świadectwo dojrzałości naukowej.

Biorąc pod uwagę założone cele, po przeczytaniu pracy i przeanalizowaniu wykonanych doświadczeń, nasunęły mi się uwagi oraz pytania i prosiłabym, aby Kandydatka odniosła się do nich w czasie obrony pracy doktorskiej.

1. We wstępie (str.32) Autorka pisze, że wpływ kinazy JNK na proces różnicowania adipocytów nie jest dobrze znany – czy od momentu przygotowania pracy pojawiły się dodatkowe publikacje i czy wiadomo więcej na ten temat?

2. W celu pracy Kandydatka opisuje, że określony został „profil transkryptów, białek i regulowanych ścieżek sygnałowych, zależnych od aktywności MCPIP1” w dniu 2 i 4 różnicowania. Nigdzie w tekście Wyników nie argumentuje, dlaczego wybrane zostały właśnie te punkty czasowe.

3. W Materiałach i Metodach zabrakło mi szczegółowego opisu doświadczeń tzw. QC RNAseq i SmallRNAseq. Nie ma informacji na temat modułu sekwencjonowania, ilości otrzymanych odczytów na próbę, ilości przyrównanych odczytów itp., a są to podstawowe informacje otrzymywane podczas QC sekwencjonowania i umożliwiające ocenę, a także późniejszą interpretację przebiegu sekwencjonowania.

4. W Wynikach, na stronie 70, Autorka opisuje ocenę poziomu białka MCPIP1 w tkance tłuszczowej podskórnej i trzewnej myszy. Zwróciłam uwagę na stosunkowo niewielką liczbę osobników wziętych do analizy i z tym wiąże się moje pytanie: czy wykonano wcześniej obliczenia

siły testu? Czy ta liczba osobników jest wystarczająca, aby otrzymać wiarygodne statystycznie wyniki?

5. W Wynikach, na str. 76, Autorka komentuje Rycinę 6A i B, pisząc, że „białko MCPIP1 pojawia się na kilku wysokościach, co może wskazywać na modyfikacje posttranslacyjne”. Czy analizowano te modyfikacje? Czy wiadomo jak zmieniają się one w procesie różnicowania adipocytów?

6. W analizie miRNA o obniżonym poziomie w adipocytach w komórkach z nadekspresją dzikiego MCPIP1 (str. 83), w Tabeli 15, pokazano listę miRNA i z tej listy wybrano kandydatów do walidacji. Jakie było zastosowane tutaj kryterium wyboru – nie jest to jasno opisane w tekście.

7. W Rozdziale 7.10 opisano analizę bioinformatyczną szlaków sygnałowych i potencjalnych transkryptów regulowanych przez miRNA. Jakie zastosowano kryteria włączenia targetów do tej analizy? Potwierdzonych eksperymentalnie czy w oparciu o analizy bioinformatyczne?

8. Analizy całogenomowe, między innymi RNAseq, są raczej trudnymi doświadczeniami jeśli chodzi o treściwą wizualizację wyników. W związku z dużą ilością przedstawionych danych nasuwa się także wiele pytań. Czytając ten rozdział zabrakło mi listy top 50/100/200 deregulowanych genów w Danych uzupełniających. Ta lista byłaby pomocna w interpretacji rycin typu Ryc.14, a jednocześnie zaspokaja ciekawość czytelnika, który jest zainteresowany szczegółami takiego doświadczenia, a nie tylko globalnymi analizami bioinformatycznymi.

9. W Rozdziale 7.15 (str.92) Autorka pisze, że zaobserwowano obniżony/podwyższony poziom kilkunastu transkryptów genów i sugeruje, że transkrypty te mogą być potencjalnie regulowane przez MCPIP1. Czy wykonano analizę struktury tych transkryptów? Które z nich przyjmują formę spinki? Czy któreś z transkryptów są cząsteczkami regulowanymi przez wcześniej opisane na stronie 83 miRNA ?

10. W porównaniu danych z analizy transkryptomu i proteomu wyróżniono regulację wspólnych procesów modulowanych przez MCPIP1. Czy zidentyfikowano szlak, proces, gen/y ważne dla funkcji adipocytów, które nie były spójne w obu analizach?

Pomimo pytań i komentarzy pracę mgr Magdaleny Łośko oceniam pozytywnie, jest to praca interesująca, zawierająca różnorodne analizy, opisuje doświadczenia, w których wykorzystywano

zarówno podstawowe, jak i zaawansowane techniki biologii molekularnej, co stanowi zdecydowanie mocną stroną pracy doktorskiej.

Niniejszym stwierdzam, że praca doktorska mgr Magdaleny Łośko spełnia wymagania zawarte w art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Po przeczytaniu przedłożonej pracy doktorskiej zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdaleny Łośko do dalszych etapów przewodu doktorskiego".



Joanna Wesoły