



Warszawa 28.07.2021

Dr hab. Paweł Dobrzyń, prof. Instytutu Nenckiego PAN  
Kierownik Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Pydyn

#### *Rola białka MCPIP1 w utrzymaniu homeostazy wątroby oraz rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby*

Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi obszerne, bo liczące 157 stron opracowanie, w którym mgr Pydyn przedstawiła wyniki swoich badań wykonanych na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr. hab. Jolanty Jury oraz dr. Jerzego Kotlinowskiego (Promotor pomocniczy). Praca podzielona jest na następujące rozdziały: 1) Wykaz skrótów (7 stron); 2) Streszczenie (2 strony); 3) Summary (2 strony); 4) Wstęp (21 stron), 5) Cel pracy (1 strona), 6) Materiały i metody (22 strony), 7) Wyniki (46 stron), 8) Dyskusja (18 stron), 9) Wnioski (2 strony), 10) Piśmiennictwo (14 stron), 11) Dane uzupełniające (15 stron). Pod względem redakcyjnym praca ma klasyczny układ dla rozpraw doktorskich.

Głównym **celem pracy** było określenie roli MCPIP1 w metabolizmie lipidów w hepatocytach, w utrzymaniu prawidłowej funkcji wątroby oraz w patogenezie niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby (NAFLD). Wątroba, poza tkanką tłuszczową, jest głównym organem, w którym zachodzi proces *de novo* lipogenezy oraz syntezy triacylogliceroli. Jednakże narząd ten nie jest przystosowany do funkcji gromadzenia lipidów, dlatego ilość triacylogliceroli w hepatocytach w stanie fizjologicznym jest niewielka. NAFLD jest obecnie najczęstszą przewlekłą chorobą wątroby na świecie i w krajach rozwiniętych dotyczy 17 - 46% populacji. Jest to przewlekła choroba, której metaboliczną przyczyną jest akumulacja kropli lipidowych w hepatocytach. Najbardziej prawdopodobny jest związek otyłości brzusznej, cukrzycy typu 2, nadciśnienia i dyslipidemii z progresją stanu zapalnego i stłuszczeniem hepatocytów.

Białko MCPIP1 jest RNazą, której główną rolą jest kontrola procesów zapalnych w organizmie, także w przypadku urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego wątroby. Wykazano, że białko to pełni również istotną rolę w regulacji metabolizmu lipidów, gdyż hamuje ono proces adipogenezy, a myszy z nokautem genu kodującego białko MCPIP1 charakteryzują się zmniejszonym



stłuszczeniem ciała i dyslipidemią. Dlatego też podjęcie tematu badań, które dotyczy analizy roli białka MCPIP1 w fizjologii i patologii wątroby, przez mgr Natalię Pydyn było pomysłem uzasadnionym i bardzo przemyślanym.

Praca została przygotowana starannie pod względem edycyjnym i nomenklaturowym. Nie uniknięto jednak kilku uchybień. W wykazie skrótów część z nich została rozwinięta nieprawidłowo, np. ATGL to swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa a nie lipaza trójglicerydów tłuszczowych, HSL to lipaza zależna od hormonów a nie hormonozależna lipaza itp. Poza tym używane w pracy pojęcia trójglicerydy i dwuglicerydy pochodzą z powszechnego języka laboratoryjnego, natomiast poprawna nomenklatura biochemiczna to triacyloglicerole i diacyloglicerole.

**Streszczenia w języku polskim i angielskim** stanowią zwięzłe podsumowanie przeprowadzonych badań i otrzymanych rezultatów. Pewnym niedociągnięciem jest brak rozwinięcia większości używanych w nich skrótów, gdyż celem takich podsumowań jest również to, że mogą one funkcjonować niezależnie od reszty pracy.

**Wstęp** stanowi konsekwentnie przeprowadzone wprowadzenie do części eksperymentalnej. W tej części pracy Autorka przedstawiła niezwykle ważne zagadnienia dotyczące: 1) patogenezы NAFLD, 2) zaburzeń w metabolizmie lipidów powiązanych z NAFLD, 3) metabolicznej roli PPAR $\gamma$  w hepatocytach, 4) budowy i funkcji białka MCPIP1, 5) roli białka MCPIP1 w powstawaniu stanu zapalnego, oraz w metabolizmie lipidów i fizjologii wątroby. Ten niezwykle obszerny rozdział powinien stanowić podstawę do przygotowania dwóch publikacji poglądowych: 1) dotyczącej molekularnych mechanizmów powstawania NAFLD, oraz 2) roli białka MCPIP1 w metabolizmie wątroby. Rozdział ten został wzbogacony o dwie czytelne ryciny, które ułatwiają zrozumienie prezentowanych informacji. Drobnym niedociągnięciem tego rozdziału, jak i całej pracy, jest brak sukcesywnego wprowadzania skrótów w języku polskim. Nawet jeżeli na początku rozprawy został przedstawiony wykaz skrótów, to zgodnie z obowiązującymi standardami w pracy powinny być one wprowadzane przy ich pierwszym użyciu. Korekty wymaga także informacja na temat myszy *ob/ob* (strona 28). Nie jest prawdą, że mają one delecję genu kodującego leptynę. Zwierzęta te nie zostały stworzone metodami bioinżynierii genetycznej, a mają spontaniczną mutację w tym genie, co powoduje jego unieczynnienie.

Oczywiście powyższe drobne uwagi w żadnym stopniu nie zmniejszają wartości merytorycznej tego rozdziału, w którym wszystkie zagadnienia omówione są z dużą swobodą, co budzi szacunek dla szerokiej wiedzy Doktorantki.

**Część doświadczalna** - Mgr Pydyn wykonała bardzo szeroki zakres badań, które przeprowadzono z użyciem modeli *in vitro* (komórki HepG2, w których indukowano lub wyciszano



ekspresję MCPIP1 oraz pierwotne hepatocyty izolowane z wątroby myszy) oraz *in vivo* (myszy z nokautem genu *Mcpip1* w mieloidalnych leukocytach lub komórkach epitelialnych wątroby poddane 12 tygodniowej diecie wzbogaconej w tłuszcz). W czasie analiz określono m.in. zawartość lipidów w hepatocytach za pomocą barwienia Oil Red O; poziom białek za pomocą Western Blot; poziom ekspresji genów przy użyciu wykoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomu, a następnie w celu potwierdzenia uzyskanych wyników za pomocą PCR w czasie rzeczywistym; aktywność czynnika PPAR za pomocą pomiaru aktywności lucyferazy. Dodatkowo w modelach *in vivo* wykonano test tolerancji glukozy, analizę histologiczną wątroby, pomiar parametrów biochemicznych oraz zawartości cytokin w osoczu przy użyciu techniki Luminex. Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane przy wykorzystaniu programu GraphPad Prism 7.0 przy użyciu odpowiednio dobranych testów. Metodyka ta została szczegółowo opisana, a szeroki zakres użytych technik wskazuje na bardzo dobre przygotowanie mgr Pydyn do przyszłej pracy naukowej. Mam natomiast jedną uwagę nomenklaturową. Mianowicie komórki w modelu *in vitro* stymulowane były kwasem oleinowym, a nie oleinianem sodu, i bardziej poprawne jest używanie tej formy. Oleinian sodu używany jest jedynie w celu uzyskania lepszej rozpuszczalności kwasu oleinowego.

**Wyniki** przedstawione są na 25 rycinach i w 3 tabelach. Dodatkowo jako dane uzupełniające przedstawiono listę genów, których ekspresja była zmieniona w komórkach HepG2 z nadekspresją białka MCPIP1 oraz 4 ryciny przedstawiające dane histologiczne oraz fenotyp myszy użytych w badaniach. Jest to bez wątpienia najcenniejsza część rozprawy zawierająca zestaw bardzo ciekawych danych. Wśród najważniejszych rezultatów otrzymanych przez Doktorantkę wymienić należy: 1) długotrwała ekspozycja hepatocytów na kwas oleinowy/lipidy prowadzi do obniżenia poziomu białka MCPIP1; 2) białko MCPIP1 wpływa na aktywność PPAR $\gamma$  poprzez regulację poziomu i aktywności białek TXNIP i PGC-1 $\alpha$ ; 3) myszy pozbawione białka MCPIP1 w leukocytach linii mieloidalnej rozwijają systemowy stan zapalny, hipoglikemię, dyslipidemię, i są chronione przed otyłością wywołaną dietą wzbogaconą w tłuszcz; 4) myszy z nokautem genu MCPIP1 w komórkach epitelialnych wątroby rozwijają pierwotne zapalenie dróg żółciowych i nie są chronione przed otyłością wywołaną dietą wzbogaconą w tłuszcz. Wszystkie te dane wskazują na istotną rolę białka MCPIP1 w utrzymaniu prawidłowej funkcji wątroby.

Rozdział ten, tak jak i cała praca jest napisany klarownym językiem. Przynosi bardzo dużo interesujących danych. Część spostrzeżeń Doktorantka będzie mogła rozwinąć w przyszłych badaniach. Warto tutaj nadmienić, że rezultaty z części *in vivo* badań zostały już przyjęte do druku w prestiżowym czasopiśmie FEBS Journal. W moim przekonaniu, również pozostałe wyniki



przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej mają szansę na publikację w równie dobrym czasopiśmie w dziedzinie.

**Dyskusja i wnioski** - Uzyskane przez siebie wyniki doktorantka omówiła w oparciu o najnowsze obserwacje opublikowane w piśmiennictwie naukowym. Podkreślić chciałbym fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 215 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Natalia Pydyn bardzo łatwo porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z metabolizmem lipidów w hepatocytach, fizjologią wątroby oraz metaboliczną rolą białka MCPIP1 w organizmie.

Zwięzłe i logiczne podsumowanie wyników badań i ich naukowego komentarza zawartego w Dyskusji Autorka zawarła w 9 wnioskach, które dobrze podsumowują prezentowane badania i są zwięzłą odpowiedzią na stawiane w pracy cele. Należy zwrócić tylko uwagę, że wniosek 9 jest w zasadzie podsumowaniem informacji przedstawionych we wnioskach 5-8.

Niezależnie od mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji, czuję się w obowiązku przedstawić kilka uwag, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu.

1. Dlaczego wybrano 4-godzinny czas głodzenia myszy przed wykonaniem testu GTT oraz przed uśmierceniem, a nie zazwyczaj stosowane głodzenie przez 12-16 godzin?
2. Na jakiej podstawie określono stężenia kwasu oleinowego używanego w badaniach *in vitro*? Dlaczego 0,5 mM stężenie kwasu oleinowego prowadziło do istotnego podwyższenia poziomu białka MCPIP1, a stężenie 1 mM już nie wywoływało takiego efektu? Czy spadek zawartości białka MCPIP1 w komórkach HepG2 po 9 dniach hodowli w obecności kwasu oleinowego mógł być spowodowany aktywowaną apoptozą?
3. Jaki może być mechanizm chroniący myszy z nokautem genu MCPIP1 w komórkach epitelialnych wątroby, które rozwijają stłuszczenie wątroby, wywołane dietą wzbogaconą w tłuszcz, przed rozwojem stanu zapalnego? Powszechnie znany jest fakt, że NAFLD wywołuje silny stan zapalny.

Proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do powyższych uwag podczas obrony pracy.

Poza wymienionymi powyżej drobnymi uwagami, przedstawioną pracę oceniam bardzo wysoko. Autorka postawiła przed sobą interesujące cele, które osiągnęła przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład poznawczy w regulacyjną funkcję białka MCPIP1 w procesie patogenezy niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Na podkreślenie zasługuje fakt, że znaczna część wyników zaprezentowanych w dysertacji została już opublikowana w pracy: Pydyn N, Żurawek D, Kozieł J, Kus E, Wojnar-Lason



K, Jaształ A, Fu M, Jura J, Kotlinowski J, Role of Mcpip1 in obesity-induced hepatic steatosis as determined by myeloid and liver-specific conditional knockouts. FEBS J. 2021; doi: 10.1111/febs.16040 (IF=5,542).

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pani Natalii Pydyn spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Natalii Pydyn do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

Pawel Dobryś