

Prof. dr hab. Katarzyna Kwiatkowska
Pracownia Biologii Molekularnej Błony Komórkowej
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

17 czerwca 2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Wadowskiej
pt. „Rola MCPIP1 w regulacji procesu tolerancji na LPS oraz kontroli odpowiedzi na INF γ ”**

Rozprawa powstała pod kierunkiem prof. Joanny Kozieł w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dedykowana jest wyjaśnieniu niektórych z aspektów funkcjonowania białka nazywanego MCPIP1/Regnazą 1. Białko MCPIP1 znajdziemy w wielu tkankach, ale jego poziom jest najwyższy w leukocytach, gdzie ulega dodatkowemu wzbogaceniu pod wpływem stymulacji przez chemokinę MCP-1. Jest to białko o aktywności RNAzy zdolne do degradacji transkryptów, między innymi cytokin. Uczestniczy też w deubikwitynacji białek zaangażowanych w prozapalne szlaki sygnałowe. Z tych powodów jest ważnym regulatorem – „wyłącznikiem” – odpowiedzi prozapalnej wywołanej, między innymi, przez bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) w czasie infekcji. Mówiąc w szerszym kontekście, jest to jedno z białek poskramiających odpowiedź zapalną i z tego powodu wzbudza zainteresowanie badaczy. Pracę nad jego funkcjonowaniem umożliwiają modele zwierzęce, w tym myszy pozbawione ekspresji genu kodującego MCPIP1 - najpierw w całym organizmie, a ostatnio także w wybranych tkankach, w tym w komórkach linii mieloidalnej. Takie myszy były też obiektem badań Pani mgr Wadowskiej, co znacząco podnosi wartość naukową i istotność osiągniętych przez Nią wyników.

Doktorantka zainteresowała się potencjalnym udziałem białka MCPIP1 w wykształcaniu tzw. tolerancji na LPS, a zatem hamowaniem odpowiedzi prozapalnej makrofagów na powtórzoną ekspozycję na tę endotoksynę. Molekularne mechanizmy tego procesu są warte badania, gdyż jest ono istotne w przeciwdziałaniu szkodliwemu sztormowi cytokinowemu w przebiegu sepsy. Wstęp rozprawy przynosi więc informacje na temat budowy i aktywności białka MCPIP1, a następnie jego roli w regulacji reakcji zapalnej wywołanej przez drobnoustroje, a także w szeregu innych procesach. Doktorantka omawia sposób w jaki MCPIP1 kontroluje wybrane szlaki sygnałowe, co jest poznane najlepiej w przypadku szlaków indukowanych przez LPS. Sporo uwagi poświęca też mechanizmowi aktywacji komórek przez interferon- γ , który wyłonił się w trakcie jej pracy jako drugi (obok tolerancji na LPS) przedmiot Jej badań. W mojej opinii Wstęp jest napisany bardzo dobrze i łącznie z Dyskusją świadczy o dobrej znajomości tematu przez Doktorantkę. Wstęp zawiera wszystkie elementy niezbędne do zrozumienia celu i przebiegu badań podjętych przez Doktorantkę. Jednocześnie przytoczone informacje są uporządkowane w przemyślany sposób, nie jest to tylko encyklopedyczne wyliczanie danych i ostatecznie tekst jest przystępny.

Założenia i cele pracy są jasno sformułowane. Jak wspomniałam, Doktorantka skupiła się na wyjaśnieniu roli białka MCPIP1 w rozwoju tolerancji makrofagów na LPS oraz regulacji odpowiedzi tych komórek na INF- γ . Rozdział Materiały i Metody przynosi wymagane informacje na odnośne tematy. Po tym rozdziale następuje prezentacja Wyników oraz ich Dyskusja, rozprawa ma zatem układ klasyczny. Opatrzona jest bogatym zbiorem pozycji literaturowych (233 publikacji). Warto podkreślić, że Pani Wadowska jest współautorką 6 prac doświadczalnych opublikowanych w szacownych czasopismach, takich jak *Journal of Immunology* oraz *Biochimica and Biophysica Acta*.

Znajduje to odbicie w dużej wartości merytorycznej Jej rozprawy doktorskiej. W celu wyjaśnienia roli białka MCPIP1 w rozwoju tolerancji makrofagów na LPS doktorantka zastosowała model badawczy, w którym komórki (makrofagi otrzymane w wyniku różnicowania komórek szpiku kostnego myszy, a w niektórych doświadczeniach także mysie splenocyty, leukocyty krwi ludzkiej i komórki makrofagopodobne linii Raw264) traktowała wstępnie lub nie niską dawką LPS (1 ng/ml) przez 24 godziny, po czym stymulowała je drugą dawką LPS w stężeniu 10 ng/ml. Zgodnie z oczekiwaniem, poziom cytokin prozapalnych takich jak TNF α , IL-6 produkowanych w tych warunkach był niższy niż w komórkach poddanych działaniu jedynie wyższej dawki LPS. Jednocześnie spadała fosforylacja (a więc zapewne aktywność) kinaz MAP: p38, ERK1/2 i JNK, a także fosforylacja białka I κ B, czyli podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (a więc prawdopodobnie dochodziło do spadku aktywności tego czynnika). Podanie drugiej dawki LPS wiązało się też ze wzrostem poziomu transkryptu białka MCPIP1, a także spadkiem aktywności parakasazy MALT-1, która katalizuje proteolizę MCPIP1. Na podstawie tych korelacji Doktorantka wysnuła wniosek, że białko MCPIP1 może być istotne dla rozwoju tolerancji makrofagów na LPS. Słuszność tego wnioskowania potwierdziły w pewnym stopniu badania prowadzone na komórkach linii Raw264 z wyciszoną ekspresją genu lub nadespresją genu kodującego MCPIP1.

W związku z tymi wynikami Doktorantka przeprowadziła dalsze badania wykorzystując myszy heterozygotyczne z obniżonym znacząco poziomem białka MCPIP1 w komórkach mieloidalnych dzięki użyciu systemu Cre-loxP. W badaniach wstępnych potwierdziła skuteczność i swoistość ubytku (praktycznie całkowitego usunięcia) białka MCPIP1 w komórkach mieloidalnych. W swoich analizach pominęła wyjściowe różnice poziomu szeregu cytokin w surowicy zwierząt kontrolnych i zubożonych w MCPIP1. To uproszczenie, które pozwoliło Jej jednak skupić się na badaniu tolerancji wywołanej dwuetapowym nastrzykiwaniem otrzewnej myszy dwoma różnymi dawkami LPS. Doktorantka wykryła zwiększoną śmiertelność myszy zubożonych w MCPIP1 w badanym układzie doświadczalnym. Wykazała, że we krwi takich zwierząt znajduje się więcej cytokin prozapalnych, IL-6 i TNF α (wpływ na poziom anty-zapalnej IL-10 był niejednoznaczny) niż we krwi myszy kontrolnych z wyjściowym poziomem białka MCPIP1. Pogłębiła i potwierdziła wyniki tych analizy wykorzystując komórki szpiku różnicowane do makrofagów z obu typów myszy.

Wyciszenie ekspresji genu kodującego MCP1P nie wpływało na poziom receptorów LPS (CD14 i TLR4), ani nie obniżało wiązania LPS w makrofagach otrzymanych ze szpiku kostnego opisanych myszy. Jednakże Doktorantka ustaliła, że podanie drugiej dawki LPS wiązało się ze zmianami fosforylacji niektórych kinaz MAP, a także I κ B, a więc prawdopodobnie zmianami aktywności transkrypcyjnej określonych czynników. Ostatecznie Doktorantka podsumowała tę część badań stwierdzając iż MCPIP1 współuczestniczy w rozwoju tolerancji na LPS, prawdopodobnie poprzez deubikwityzację TRAF6 i TRAF3, co prowadzi do zahamowania szlaków sygnałowych zależnych od tych białek.

Chcę podkreślić oryginalność podjętej przez Doktorantkę tematyki, a także adekwatność stosowanych metod. Te ostatnie obejmowały techniki typowe dla warsztatu immunologa, ale też mikroskopię fluorescencyjną. Ważnym elementem pracy było pozyskiwanie i praca *in vitro* na komórkach izolowanych ze szpiku i śledziony myszy, a także doświadczenia *in vivo* na tych zwierzętach. Wszelchonność takiego podejścia zadecydowała o jakości uzyskanych wyników. Zostały one opublikowane w prestiżowym *Journal of Immunology* w artykule, którego Doktorantka jest pierwszym autorem.

Moja uwaga dotyczy wyników prezentowanych na Rycinie 32, w których Doktorantka analizuje niełatwe do interpretacji wyniki badań nad wpływem ubytku/braku MCPIP1 na fosforylację kinaz MAP. Autorka pisze: „U zwierząt z obniżoną ekspresją MCPIP1 nastąpiło całkowite odwrócenie procesu tolerancji na LPS w przypadku kinaz p-38 oraz JNK (Ryc. 32A, C, D), w przypadku kinaz ERK1/2 nie stwierdzono istotnych różnic (Ryc. 32B)”. Tymczasem wymowa Ryc. 32A, obrazującej fosforylację p-38 jest inna niż wymowa Ryc. 32D obrazującej fosforylację kinazy JNK. W mojej opinii o „odwróceniu” można mówić w przypadku kinazy JNK (dla ścisłości jest to odwrócenie efektu wywieranego na jej fosforylację, a nie odwrócenie „procesu tolerancji” spowodowanego ubytkiem białka MCPIP1). Natomiast wyraźny spadek fosforylacji kinazy p-38 obserwuje się tu pomiędzy komórkami kontrolnymi komórkami z obniżoną ilością MCPIP1 po ich stymulacji przez jedną, wyższą dawkę LPS (słupek 3 vs. 1). Natomiast komórki z obniżoną ilością MCPIP1 nie reagują zmianą fosforylacji p-38 na stymulację drugą dawkę LPS (słupek 4 vs. 3), podczas gdy w komórkach kontrolnych ta fosforylacja spada (słupek 2 vs. 1). Chciałbym, aby Doktorantka wyjaśniła, co skłoniło ją do łącznego wnioskowania o wpływie ubytku białka MCPIP1 na fosforylację p-38 i JNK.

W drugiej części badań Doktorantka wykorzystwała otrzymane myszy z wyciszoną ekspresją genu kodującego MCPIP1 w komórkach mieloidalnych do przeanalizowania wpływu tego białka na regulację szlaku sygnałowego indukowanego przez INF- γ w tych komórkach. Przesłanką do tych badań był wykryty podwyższony poziom INF- γ w surowicy otrzymanych zwierząt. Doktorantka wykryła konstytutywnie wyższy poziom zarówno transkryptu jak i białka STAT1 w komórkach szpiku myszy z obniżonym poziomem MCPIP1, który jednak wiązał się ze spadkiem aktywacji (fosforylacji) tego białka pod wpływem INF- γ . Stosując dwa pomysłowe modele badawcze Doktorantka wykazała, że MCPIP1 reguluje szlak JAK1/2-STAT1 wpływając na poziom białek SOCS1 (i 3), negatywnych regulatorów ścieżki sygnałowej prowadzącej do aktywacji STAT1. MCPIP1 okazał się regulować zarówno poziom transkryptu białek SOCS (z uwagi na swoją aktywność RNAzy) jak i wpływać pośrednio na poziom białek SOCS1/3 przez regulację poziomu cytokin, zwłaszcza IL-6. W podsumowaniu, Doktorantka wykryła istnienie mechanizmu angażującego SOCS1/3 w regulacji odpowiedzi na INF- γ przez białko MCPIP1.

Wiadomo jest, że INF- γ moduluje szlaki sygnałowe indukowane przez LPS, o czym Doktorantka wspomina we Wstępie. Jaki mógł być zatem Jej zdaniem wpływ (prawdopodobnego) zwiększonego poziomu białka STAT1 na rozwój tolerancji względem LPS w makrofagach pozbawionych białka MCPIP1, który badała i opisała w pierwszej części rozprawy?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Wadowskiej przynosi nowe dane na temat regulacji dwóch ważnych biologicznie procesów kształtujących reakcję zapalną organizmu. Zakres badań i uzyskane wyniki zasługują na uznanie. Wyniki dyskutowane są szczegółowo w zestawieniu z dostępną literaturą tematu. Doktorantka wspomina w Dyskusji także negatywne wyniki swoich badań, co

pozwała na ich ocenę w szerszym kontekście. Chcę też podkreślić, że rozprawa przygotowana jest starannie, napisana poprawną polszczyzną (choć ja wolę rezerwować zwrot „ekspresja” dla genu) i jest dopracowana pod względem edytorskim. Mam tylko kilka drobnych uwag w tym względzie:

a). *Pro domo sua*: zauważyłam pewną nieścisłość na stronie 26 Wstępu. Częsteczka LPS prezentowana jest receptorowi TLR4 przez białko CD14, które jest homodimerem. Po jednej cząsteczce LPS wiązane jest w jednej kieszeni hydrofobowej białka MD-2. Dochodzi wtedy do formowania tetrameru złożonego z dwóch cząsteczek receptora TLR4 i dwóch cząsteczek MD-2, zasocjowanego z CD14. Zatem schemat przedstawiony na Rycinie 3 nie oddaje tej stechiometrii. Przyjmuje się, że kompleks TLR4 ze związanym kowalencyjnie białkiem MD-2 istnieje przed przyłączeniem LPS.

b). Opisując bloty powinno się zaznaczać pozycje markerów masy cząsteczkowej zamiast opisywania mas cząsteczkowych prezentowanych białek. Na Ryc. 9D opis ten jest błędny- białko o większej masie cząsteczkowej (54 kDa) migruje w żelu poliakryloamidowym wolniej niż białko o niższej masie (46 kDa).

c) Warto byłoby podać numery katalogowe, a nie tylko producenta używanych przeciwciał.

Konkludując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska zawiera nowe odkrycia badawcze. Umieszczone w recenzji uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Doktorantka wykazuje dobrą znajomość tematyki badawczej, sprawnie posługuje się szerokim warształem metodycznym i prawidłowo wyciąga wnioski.

W związku z powyższym, w mojej ocenie rozprawa spełnia warunki ustawowe „Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Wadowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, mając na względzie oryginalność i wartość uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Katarzyna Kwiatkowska

