

Warszawa 8.06.2020

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Dyrektor Instytutu
Kierownik Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Łośko
pt. „Rola białka MCPIP1 w biologii adipocytów i otyłości”

Białko MCPIP1 jest rybonukleazą, która oprócz swojej klasycznej funkcji, odgrywa także rolę w przebiegu procesów zapalnych, różnicowaniu i apoptozie komórek oraz angiogenezie. Dostępne dane wskazują, że białko to jest również zaangażowane w regulację procesu dojrzewania preadipocytów 3T3-L1 za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych C/EBP β oraz PPAR γ . Dlatego też, głównym celem rozprawy była identyfikacja miRNA, białek oraz genów zależnych od MCPIP1 biorących udział w regulacji ścieżek sygnałowych wpływających na adipogenezę w komórkach tkanki tłuszczowej w początkowych etapach ich różnicowania. Poza wartością poznawczą, tematyka pracy ma ważne odniesienie społeczne, ponieważ nadmiar tkanki tłuszczowej prowadzi do otyłości i nadwagi, co zwiększa ryzyko zapadalności na choroby układu krążenia, cukrzycę typu 2, niektóre typy nowotworów i powstawanie stanów zapalnych (tzw. choroby Zespołu Metabolicznego). Wydzielane przez adipocyty cytokiny i chemokiny uczestniczą także m.in. w regulacji łaknienia, utrzymywaniu homeostazy energetycznej organizmów, metabolizmie węglowodanów i tłuszczów, regulacji hemostazy naczyniowej, ciśnienia tętniczego, procesów zapalnych i immunologicznych.

Praca doktorska mgr Magdaleny Łośko zrealizowana została na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Jury. Maszynopis zawiera 143 strony i ma klasyczny układ. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wykaz skrótów (2 strony), 2 i 3) Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 3 strony), 4) Wstęp (27 stron), 5) Cel pracy (1 strona), 6) Materiały i Metody (27 stron), 7) Wyniki (37 stron), 8) Dyskusja (16 stron), 9) Wnioski końcowe (1 strona), 10) Dane

uzupełniające (3 strony), 11) Literatura (17 stron). Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edycyjnym. Nie uniknięto jednak kilku niedociągnięć. Przez większość dysertacji używane jest pojęcie triglicerydy zamiast triacyloglicerole (które to sformułowanie jest używane w Dyskusji). W zestawieniu skrótów brakuje rozwinięcia, m.in. PPAR γ , SREBP1 itp. (białka te nie zostały także nazwane w języku polskim w tekście rozprawy).

W rozdziale Wstęp doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące rodzajów, biogenezy i funkcji tkanki tłuszczowej. Przedstawiono także przyczyny powstawania oraz komplikacje związane z Zespołem Metabolicznym. Najbardziej interesująca jest część dotycząca regulacji adipogenezy na poziomie molekularnym oraz rozdział dotyczący biologicznej roli białka MCPIP1. Rozdział Wstęp zawiera wszystkie niezbędne informacje, które wprowadzają czytelnika w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Rozdział ten, tak jak i cała praca, jest napisany klarownym językiem i powinien posłużyć jako podstawa do napisania pracy poglądowej o roli MCPIP1 (wydaje mi się, że nie ma takiej pracy o takiej tematyce w języku polskim). Szkoda, że w rozdziale tym Doktorantka nie umieściła żadnych rycin i schematów - ułatwiłyby one zapewne czytelnikom zrozumienie przedstawianych w nim trudnych zagadnień. Nie jasne jest także, co Autorka ma na myśli, pisząc o osiągnięciu stanu krytycznego przez adipocyty w stanie hipertofii (str. 20). Bardzo proszę o wyjaśnienie tego podczas obrony pracy.

Cel pracy doktorskiej został jasno sformułowany, a przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na jego osiągnięcie.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań wymagały od doktorantki opanowania wielu metod badawczych, w tym wielkoskalowych i bioinformatycznych. W ramach wykonywania badań określono rolę białka MCPIP1 w różnicowaniu preadipocytów 3T3-L1, populacji ludzkich komórek macierzystych pochodzących z podskórnej tkanki tłuszczowej oraz z biopsji pobranych z mysiej i ludzkiej tkanki tłuszczowej. Ponadto dokonano analizy transkryptomu (NGS) i proteomu w komórkach 3T3-L1 (w 2 i 4 dniu ich różnicowania), w których dokonano nadekspresji natywnego białka MCPIP1 lub jego zmutowanej formy. Poza tym określono profil miRNA zależnych od MCPIP1 w adipocytach 3T3-L1 w 2 dniu różnicowania. Bardzo istotną i ciekawą częścią rozprawy były bardzo logicznie przeprowadzone analizy dotyczące powiązania białka MCPIP1 oraz GLUT4 w regulacji procesu adipogenezy. Fakt wykorzystania bardzo nowoczesnej metodyki zarówno z zakresu biochemii jak i biologii molekularnej zasługuje na podkreślenie. Metodyka ta została szczegółowo opisana, natomiast przydatne byłoby przedstawienie zestawienia użytych w badaniach odczynników.

Drobne uwagi szczegółowe dotyczące rozdziału Materiały i Metody:

1. Str. 43 - Co przedstawia zapis: „.....BMI równy 48,0 (7,7) kg/m²”? Czy chodzi o wartość średnią $\pm$ SE?
2. Brak jest informacji o składzie i dostawcy paszy wzbogaconej w tłuszcz użytej w eksperymencie. Czy pasza z niską zawartością tłuszczu użyta w eksperymencie to standardowa dieta Chow czy też specjalnie sformułowana pasza niskotłuszczowa?
3. Str. 46 – na jakiej podstawie wybrano stężenia cytokin użytych w badaniach?

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zaprezentowano w formie 22 czytelnych rycin (oraz 2 tabel i 2 rycin dodatkowych). Przeprowadzone analizy wykazały, że poziom białka i ekspresja MCPIP1 jest niższy w adipocytach w stanie otyłości. Stwierdzono także, że mutacja punktowa w białku MCPIP1 nie wpływa na różnicowanie adipocytów, a nadekspresja dzikiego białka MCPIP1 obniża poziom miRNA zaangażowanych w proces adipogenezy. Poza tym wykazano, że białko MCPIP1 może być zaangażowane w szlaki transmisji sygnałów, metabolizm węglowodanów oraz kwasów tłuszczowych. Istotna w tych procesach jest rola białka GLUT4. Rozdział ‘Wyniki’ napisany jest klarownym językiem i przedstawia bardzo interesujące dane, zawiera jednak także pewne uchybienia. Nie podano w jakich jednostkach wyrażane są dane prezentowane na wykresach. Podpisy rycin przechodzą na następne strony co utrudnia dokładną analizę rezultatów. Str. 72 – czy stwierdzenie „Wyniki te ukazały negatywną korelację poziomu mRNA dla MCPIP1....” zostało poparte analizą statystyczną? W pracy używa się skrótowego, niezbyt zręcznego stwierdzenia „...w określonych punktach czasowych zebrano ekstrakty białkowe, które użyto do analizy Western blot...”. Rozumiem, że zebrano komórki, z których następnie wyizolowano białka? Te drobne nieścisłości będące nawiązaniem co codziennego żargonu laboratoryjnego nie wpływają na moją bardzo pozytywną opinię odnośnie wartości naukowej zaprezentowanych rezultatów.

Otrzymane przez mgr Łośko oryginalne wyniki eksperymentalne zostały omówione w odniesieniu do dostępnego stanu wiedzy w rozdziale ‘Dyskusja’. Doktorantka krytycznie odniosła się do uzyskanych rezultatów wskazując w dalszej perspektywie na potrzebę identyfikacji specyficznych inhibitorów MPIP1, co mogłoby mieć znaczenie farmakologiczne. Podkreślić należy także fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 224 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Magdalena Łośko z łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z biologią adipocytów. Logicznym

podsumowaniem zaprezentowanych i omówionych w Dyskusji wyników są zaprezentowane w 11 punktach wnioski.

Jednocześnie, jest kilka zagadnień, które pozostawiają pewien niedosyt:

1. Na podstawie uzyskanych przez Doktorantkę rezultatów proszę o przedstawienie potencjalnych mechanizmów, poprzez które GLUT4 reguluje metabolizm lipidów w adipocytach.
2. W przeciwieństwie do zaprezentowanych w rozprawie wyników stwierdzających obniżony poziom białka MCPIP1 w podskórnej tkance tłuszczowej u myszy z otyłością indukowanej dietą, u otyłych myszy db/db ten poziom był podwyższony. Doktorantka sugeruje, że różnice te wiążą się z rozwojem insulinooporności, cukrzycy, hiperglikemią i obniżonym zapotrzebowaniem energetycznym u myszy db/db. Czy 12-tygoniowa dieta wzbogacona w tłuszcz nie prowadzi do takiego samego fenotypu?
3. Praca porusza wiele interesujących i różnorodnych aspektów funkcjonowania adipocytów. Brakuje w niej jednak podsumowania/ schematu przedstawiającego mechanizmy/ szlaki regulowane przez MCPIP1 i to w jaki sposób wpływają one na metabolizm adipocytów. Proszę, aby w czasie obrony Doktorantka przedstawiła schematyczne podsumowanie swoich wyników i wniosków.

Wniosek końcowy

Pracę doktorską mgr Magdaleny Łośko pt. *"Rola białka MCPIP1 w biologii adipocytów i otyłości"* oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład poznawczy zarówno w regulacyjną funkcję białka MCPIP1 jak i w proces dojrzewania adipocytów. Wyniki badań stanowiące podstawę dysertacji doktorskiej zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych w świetnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Łośko 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 przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Magdaleny Łośko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Dobczyński