



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
KIEROWNIK ZAKŁADU IMMUNOLOGII

PROF. DR HAB. JOANNA CICHY

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Iwony Karwaciak

pt. „Działanie szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B w kontekście aktywacji receptora TLR2 w modelu różnicowania monocytu-makrofagi”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy komórek o fenotypie monocytów, i ich bardziej dojrzałych form tj. makrofagów. Komórki te pełnią kluczową rolę w odpowiedzi nieswoistej a także w indukcji odpowiedzi swoistej. Głównym modelem doświadczalnym były dwie ludzkie linie komórkowe THP-1 i Mono Mac 6 (MM6), charakteryzujące się różnym stopniem dojrzałości pod względem cech fenotypowych i funkcjonalnych. Komórki te były ponadto różnicowane za pomocą estrów forbolu-PMA (linia THP-1) oraz witaminy D3 w kombinacji z cytokiną TGF β 1 (linia MM6). W niektórych przypadkach, w eksperymentach wykorzystywano także ludzkie monocyty, pozyskiwane metodą negatywnego sortu magnetycznego z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego. Monocyty te były następnie różnicowane pod wpływem cytokiny GM-CSF w kierunku tzw. „makrofagów prozapalnych”, opisywanych w literaturze jako M1, lub pod wpływem cytokiny M-CSF do tzw. „makrofagów antyzapalnych”, określanych często jako M2.

Praca została wykonana w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi, pod kierunkiem dr hab. Łukasza Pułaskiego, prof. IBM PAN. Praca jest napisana w języku polskim i ma typowy dla prac doktorskich układ, na który składają się; Wstęp, Materiały i Metody, Rezultaty, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w j. polskim i angielskim, oraz spis literatury.

Przy użyciu wymienionych modeli badawczych analizowano wpływ syntetycznego liganda dla receptora TLR2, a zarazem silnego aktywatora czynnika transkrypcyjnego NF κ B tj. pam3CSK4. Pam3CK4 jest często wykorzystywany w badaniach, jako surogat komponentów ściany komórkowej bakterii Gram + i Gram -, tj. acylowanych na końcu N bakteryjnych lipoprotein.

W pierwszej części badań, skupiono się na analizie markerów różnicowania w komórkach traktowanych za pomocą PMA, lub witaminy D3 w kombinacji z cytokiną TGF β 1.

Następnie analizowano wpływ procesu różnicowania i stymulacji za pomocą pam3CSK4 na funkcje komórek takie jak; zdolność do fagocytozy, produkcja reaktywnych form tlenu (ROS), i cytokin, czy ekspresja receptorów dla molekularnych wzorców patogenności.

Jedną z najbardziej rozbudowanych części badań była analiza mechanizmów antyoksydacyjnych w komórkach monocytarnych różnicowanych i/lub stymulowanych za pomocą liganda dla TLR2.

Mechanizmy te mogą w znacznej mierze umożliwić funkcjonowanie komórek w warunkach stresu oksydacyjnego, który prowadzi do uszkodzeń i śmierci komórek. Badano żywotność komórek i uszkodzenia białek na skutek oksydacji, a w kolejnej fazie poziom ekspresji genów związanych z podstawowymi systemami antyoksydacyjnymi, takimi jak SOD/katalaza, glutation/reduktaza glutationowa oraz tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny. Należy podkreślić, że tą część badań wykonano w oparciu o szerszy plan, który uwzględniał badania na poziomie RNA i białka, a także pomiar aktywności wybranych komponentów systemów antyoksydacyjnych.

Przedmiotem badań był także czynnik transkrypcyjny NF κ B i jego rola w regulacji ekspresji czynników antyoksydacyjnych. Zbadano ekspresję i aktywność NF κ B w kontekście różnicowania i stymulacji komórek za pomocą pam3CSK4, a także dzięki użyciu inhibitorów szlaku NF κ B, wpływ tego czynnika na ekspresję wybranych składników systemu antyoksydacyjnego.

Uzyskane wyniki generalnie wskazują na wzrost aktywności czynnika NF κ B pod wpływem zarówno różnicowania jak i stymulacji za pomocą liganda dla TLR2, a także na większą oporność na stres oksydacyjny komórek różnicowanych za pomocą wymienionych czynników, lub fenotypowo bardziej dojrzałych.

Warto podkreślić szeroki zestaw technik badawczych, wykorzystanych w pracy, od izolacji i hodowli komórek, po qPCR, Western Blot, testy ELISA, badanie aktywności NF κ B w transfekowanych komórkach metodą pomiaru ekspresji genu reporterowego-lucyferazy, czy liczne metody spektrofotometryczne, zastosowane do oznaczeń aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Plusem pracy, jest także duża liczba uzyskanych wyników. Trudno jednak czasem oprzeć się wrażeniu, że ich ilość przytłacza samą doktorantkę, ponieważ w niektórych przypadkach te wyniki są bardzo lakonicznie komentowane. Dla przykładu, doktorantka w swojej pracy opisuje ekspresję receptorów PRR w warunkach różnicowania i ekspozycji na bakteryjny lipopeptyd. Chociaż analiza dotyczyła analizy qPCR sześciu receptorów dla molekularnych wzorców patogenności, doktorantka odnosi się głównie do dwóch; TLR2 i TLR1.

Lektura pracy nasunęła mi jednak kilka wątpliwości, które wdrożony byłoby przedyskutować w trakcie obrony pracy.

1. Najwięcej niedosytu pozostawia brak jasno sformułowanej hipotezy badawczej a także brak komentarza na temat szerszego znaczenia przeprowadzonych badań. Podczas publicznej obrony, chętnie zatem wysłuchałabym opinii doktorantki na temat wartości naukowej i poznawczej jej pracy, z zaznaczeniem, co jej zdaniem stanowi największy element nowości tej pracy.

W pełni zgadzam się z doktorantką, że badania na liniach komórkowych dają wiele korzyści, ale tylko pod warunkiem, że wyniki uzyskane na liniach komórkowych, zostaną porównane z badaniami na komórkach pierwotnych. Dlatego, warto docenić, że doktorantka w wielu wypadkach porównywała wyniki uzyskane w oparciu o linie komórkowe do wyników uzyskanych na różnicowanych monocytach ludzkich. Jednakże praca byłaby znacznie

ciekawsza, gdyby przedmiotem badań były przede wszystkim komórki pierwotne, albo gdyby przeprowadzone eksperymenty, w każdym przypadku były oparte o takie porównanie.

2. Dodatkową kwestię polemiczną stanowi interpretacja wyników niektórych doświadczeń. Nie bardzo są dla mnie zrozumiałe podstawy, w oparciu o które doktorantka interpretowała wyniki cytometrii przepływownej. Dla przykładu, poziom ekspresji antygenu CD11a w komórkach THP-1 stymulowanych za pomocą PMA nie zmieniał się, bo wyniki barwień za pomocą przeciwciał swoistych dla CD11a, były takie same jak dla kontroli izotypowej. Tymczasem, doktorantka na wykresie sporządzonym w oparciu o te dane, wskazuje na kilkudziesięciokrotny wzrost ekspresji tego antygenu pod wpływem PMA. Podobna analiza dotyczy pozostałych antygenów.
3. Również kontrowersyjna może być interpretacją wyników dotyczących poziomu ekspresji cytokin w różnicowanych komórkach. W tym przypadku, problem polega na zbyt małej liczbie porównywalnych grup ($n=3$), lub nieuprawnionym użyciu wybranego testu statystycznego. W tej sytuacji bardzo wyraźne, ale podlegające sporym wahaniom różnice w ekspresji, są pomijane, jako nieistotne statystycznie. Tymczasem małe różnice, które również najprawdopodobniej ze względu na niewielkie wartości, nie wykazują takich wahań, są interpretowane jako największe różnice w ekspresji danej cytokiny. Dla przykładu, poziom ekspresji IL1 β w komórkach MMP6 na wykresie (Ryc. 11D) osiąga po 6 godz. średni poziom ok. 300 pg/ml, ale poziom uzyskany po 2 godz., który wynosi ok. 65 pg/ml jest opisywany jako maksymalny (strona 85).
4. W niektórych doświadczeniach, opis uzyskanych wyników nie pokrywa się z ich prezentacją na wykresach. Dla przykładu, Na Ryc. 9, nie widać istotnych różnic w ilości wytwarzanego rodnika ponadtlenkowego w komórkach THP-1 stymulowanych za pomocą pam3CSK4, podczas gdy doktorantka w opisie zamieszcza informację o wzroście ilości rodnika ponadtlenkowego pod wpływem tego liganda (strona 82).
5. W przypadku niektórych wyników, takich jak badanie translokacji NF κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego, należałoby pokazać oryginalne zdjęcia mikroskopowe, a nie tylko wykres sporządzony na podstawie pomiarów średniej intensywności fluorescencji w określonych lokalizacjach komórkowych. Bez takich zdjęć nie jest dla mnie jasne, jak oceniano specyficzność barwienia za pomocą przeciwciała specyficznego dla podjednostki p65 NF κ B, które zostało wykorzystane do barwień?

Z obowiązku recenzenta zwracam również uwagę, że praca zawiera sporo błędów stylistycznych i literowych. Ponadto, raczej brak tej pracy elegancji językowej. Poniżej podaje kilka przykładów mniej udanych sformułowań językowych zamieszczonych we wstępie;

„Funkcje monocytów i makrofagów i ich realizacja”,

„Proces krwiotworzenia obejmuje kaskadę procesów”,

„Komórki tracą zdolność do samoodnawiania i powstają z nich prekursorzy wielopotencjalne i ukierunkowane”,

„Charakteryzują się wysoką ekspresją MHC klasy II oraz cząsteczek konstymulujących prezentację antygeny, CD80/86” ?

Podsumowując, przedstawione w rozprawie wyniki badań oceniam pozytywnie. Doktorantka wykazała się pracowitością i pomimo kilku równoległych wątków pracy, podjęła próbę ich powiązania w jedną opowieść.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN o dopuszczenie Pani Iwony Kwarciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

