

Prof. Tomasz Lipniacki,  
Zakład Biosystemów i Miękkiej Materii  
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Obory, 6 sierpnia 2018

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie  
*biologia medyczna*

*Mechanizm i dynamika zmian w sygnalizacji NF- $\kappa$ B pod wpływem stresu termicznego*  
wykonanej przez **mgr Annę Paszek**

pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Widłak i prof. dr hab. inż. Marka Kimmla

### **Cel i charakterystyka pracy**

Praca doktorska poświęcona jest analizie wpływu szoku termicznego na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na cytokiny TNF i IL1. Badania były prowadzone na dwóch liniach komórkowych: MCF7 i trochę pomocniczo na linii U2OS, charakteryzującej się słabszą odpowiedzią. Praca ma charakter doświadczalny, ale wyniki uzyskane przez Autorkę posłużyły do konstrukcji matematycznego modelu sprzężenia sygnalizacji NF- $\kappa$ B i odpowiedzi na stres termiczny, opublikowanego w tym roku w Plos Computational Biology. Anna Paszek jest jedną z dwóch głównych autorek publikacji. Materiał zawarty w rozprawie doktorskiej istotnie wykracza poza wzmiankowaną publikację. Autorka łączy badania populacyjne, Western blot oraz RT PCR z badaniami na pojedynczych komórkach wykorzystującymi przyżyciową mikroskopię konfokalną w których określa jądrową translokację NF- $\kappa$ B. Co istotne wyniki uzyskane w badaniach na pojedynczych komórkach okazały się kluczowe do zrozumienia mechanizmu regulatorowego polegającego na silnej inhibicji kinaz IKK pod wpływem szoku termicznego we frakcji komórek.

Praca składa się z 5 rozdziałów: obszernego, dobrze napisanego wprowadzenia, zwięzłego rozdziału określającego cele pracy, omówienia metod badawczych i wyprowadzonych linii komórkowych, wyników oraz dyskusji. Praca napisana jest poprawnym językiem i przygotowana jest bardzo starannie.

Kluczowy rozdział *Wyniki* posiada przemyślaną konstrukcję. Najpierw Autorka charakteryzuje wpływ szoku termicznego na aktywację ścieżki NF- $\kappa$ B poprzez TNF i IL1, a następnie formułuje hipotezy badawcze dotyczące mechanizmów regulatorowych powodujących wyciszenie odpowiedzi przez szok termiczny. W pierwszej części najważniejszymi wynikami są

1. Określenie dynamiki odpowiedzi komórek MCF7 na TNF oraz IL1 w zależności od długości trwania fazy podwyższonej temperatury (43 C°) przed stymulacją TNF. Wyniki badań pokazują, że godzinny szok termiczny prowadzi to istotnego wyciszenia odpowiedzi na TNF (obserwowanego zarówno na trajektoriach jądrowego NF- $\kappa$ B, jak i fosforylacji podjednostki NF- $\kappa$ B, RelA na Ser536), natomiast wpływ szoku 15 i 30 minutowego jest stosunkowo nikły. Godzinny szok termiczny prowadzi do istotnych zmian konformacyjnych białka IKK $\alpha$  (oraz w mniejszym stopniu IKK $\beta$ ) zmniejszając frakcję rozpuszczalnego białka (do ok 40% dla IKK $\alpha$ ) Efekt ten jest jednak zbyt słaby by wyjaśnić istotny spadek aktywacji NF- $\kappa$ B, chyba że jak sugerują badania przyżyciowe występuje tylko we frakcji komórek. Hipoteza ta jest analizowana w publikacji w Plos Computational Biology, 2018.
2. Określenie czasu powrotu komórek do homeostazy po szoku termicznym. Tu wynik jest niezwykle ciekawy, 4 godziny po szoku termicznym komórki stymulowane TNF, mają wprawdzie słabszy pierwszy puls aktywacji, ale wykazują istotnie więcej oscylacji w ciągu pierwszych 10 godzin stymulacji TNF (większość 4 bądź 5 oscylacji). Ten sam efekt