

Prof. dr hab. Joanna Rzeszowska
Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów
Politechnika Śląska
ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice
Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej
ul. Krzywoustego 9, 44-100 Gliwice

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Paszek „Mechanizm i dynamika zmian w sygnalizacji NF-κB pod wpływem szoku termicznego”

1. Tematyka i zakres rozprawy

Jest to bardzo dobra i ciekawa praca, która dotyczy hamowania aktywności ścieżki sygnałowej NF-κB przez szok termiczny w liniach komórkowych hodowanych in vitro. W rozprawie przedstawiono wyniki badań dotyczących zmian reakcji na cytokiny TNFα i IL1β aktywujących ścieżkę sygnałową NF-κB po ekspozycji komórek na podwyższoną temperaturę. Sygnalizacja za pomocą ścieżek sygnałowych aktywujących NF-κB jest ważna przy odpowiedzi na wiele czynników stresujących powodujących w organizmie stany zapalne a także w wielu stanach chorobowych. NF-κB jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów ważnych dla różnych procesów komórkowych, reguluje odpowiedzi zapalne organizmu poprzez aktywację produkcji cytokin prozapalnych, procesy apoptozy, przebieg cyklu komórkowego i wiele innych. Białka kodowane przez geny zależne od NF-κB tworzą obwody autoregulacyjne z pętlami ujemnych sprzężeń zwrotnych powodujących wygaszanie aktywności czynnika transkrypcyjnego, ale także jak w przypadku produkcji niektórych cytokin, pętli o dodatnim sprzężeniu podtrzymującym aktywność ścieżki sygnalizacyjnej. Ten drugi rodzaj sprzężenia może prowadzić do procesów patologicznych a wysoka aktywność NF-κB sprzyja przeżywaniu komórek w warunkach w których powinny ulec apoptozie i jest często wykrywana w różnych typach nowotworów. Podjęte w pracy zagadnienie wpływu szoku termicznego na uruchamianie i pracę ścieżek sygnałowych angażujących NF-κB jest bardzo istotne, jako, że wszystkie organizmy wyższe mogą być w pewnych momentach narażone na działanie podwyższonych temperatur, choćby ze względu na warunki klimatyczne. Od jakiegoś czasu wiadomo, że szok termiczny może hamować uruchamianie sygnalizacji z udziałem NF-κB. Wiadomo również, że hipertermia może zmieniać przebieg różnych stanów chorobowych więc poddawanie pacjentów hipertermii jest już od jakiegoś

czasu stosowane jako dodatkowy element terapii w leczeniu nowotworów, ale także przy schorzeniach alergologicznych, dermatologicznych, ortopedycznych, zapaleniu reumatoidalnym stawów, chorobie nadciśnieniowej i innych. Zjawiska molekularne leżące u podstaw takiej terapii nie są do końca rozpoznane a badania związku procesów wywoływanych hipertermią i sygnalizacji komórkowej z udziałem NF- κ B dopiero się właściwie zaczynają. Tak więc przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy analizy zjawisk istotnych dla zrozumienia mechanizmów komórkowych, które są ważne poznawczo, ale także ważne dla rozwoju i lepszego zrozumienia praktyk medycznych.

2. Ocena zawartości rozprawy

Rozprawa obejmuje 131 numerowanych stron druku, ma klasyczny układ i jest podzielona na sześć głównych rozdziałów (Wstęp, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja i Literatura), poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz zakończonych wykazem stosowanych skrótów i oznaczeń. Rozdziały Wstęp, Materiały i Metody oraz Wyniki zostały podzielone na dalsze numerowane podrozdziały i podrozdziały podrozdziałów, co wprowadza do tekstu porządek, ale znacznie wydłuża spis treści (osobiście nie lubię numerowania złożonego z trzech i więcej cyfr i bardziej podoba mi się ewentualne wyróżnienie tytułów zagadnień np. pochylonym drukiem w tekście). Rozdział 1, obejmujący Wstęp, zawiera cztery główne podrozdziały na temat ogólnych mechanizmów odpowiedzi komórkowej na stres, odpowiedzi na szok cieplny, różnych aspektów sygnalizacji zależnej od czynnika NF- κ B i oddziaływania między szlakiem NF- κ B i systemami sygnałowymi uruchamianymi przez szok termiczny. Zawartość tego rozdziału bardzo dobrze i szczegółowo przedstawia dotychczasową wiedzę i motywację podjętych badań. Spis literatury zawiera 293 pozycje literaturowe z których 273 posłużyły zebraniu wiedzy przedstawionej w Rozdziale 1. Wstęp jest ciekawy, kolejność rozdziałów i przedstawianych problemów pozwala na łatwe zrozumienie zagadnień związanych z pracą, jest też bogato ilustrowany, zawiera 9 ilustracji, prezentujących mechanizmy molekularne związane z szokiem termicznym i działaniem ścieżek sygnałowych angażujących czynnik NF- κ B. W Rozdziale 2 opisane zostały główne cele pracy. Podstawowym celem było scharakteryzowanie warunków, w których szok termiczny najwydajniej blokuje aktywację ścieżki NF- κ B w komórkach nowotworowych, przez co można by lepiej wykorzystać hipertermię w praktyce medycznej. W rozdziale tym w punktach zostały opisane i dotychczasowe osiągnięcia i to co Autorka zamierzała zbadać. Rozdział jest napisany zwięźle i jasno określa cele pracy. Kolejny Rozdział 3 „Materiały i metody” zawiera większość informacji wyjaśniających w jaki sposób uzyskiwano

przedstawiane wyniki i potrzebnych do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. Brakowało mi w tym rozdziale wyjaśnienia jak uzyskiwano ciągłą stymulację cytokinami, czy dodawano je do pożywki jednorazowo na początku obserwacji? W takim przypadku ważną byłaby informacja o stabilności cytokin ich czasie półtrwania w pożywce, Przy różnych typach komórek może się okazać, że tempo znikania cytokin z pożywki jest inne. Niezbyt dokładnie opisane zostały też metody dotyczące oznaczeń za pomocą mikroskopii. W jaki sposób porównywano ilość fluoryzującego barwnika w jądrze i cytoplazmie? W rozprawie Autorka powołuje się na program komputerowy z automatyczną segmentacją jąder komórkowych wybarwianych barwnikiem Hoechst 33342, ale brakuje informacji jak obecność barwnika wpływa na właściwości komórek i reakcję na stymulację cytokinami oraz na jakiej zasadzie oznaczana była ilość barwnika w cytoplazmie. Brakuje również informacji czy wszystkie eksperymenty, w których oznaczano ilości aktywnego NF- κ B w jądrach przeprowadzono w trybie konfokalnym tzn. ze zbieraniem informacji z warstw czy były to pojedyncze zdjęcia, i z jaką częstotliwością prowadzono oznaczenia. Przy obserwacjach przyżyciowych naświetlanie laserem nawet o niskiej mocy indukuje odpowiedź komórkową.

W rozdziale 3 „Wyniki” bardzo szczegółowo i ładnym językiem opisano rezultaty badań. Rozdział ten jest bogato ilustrowany, ryciny są dobrze przemyślane i prezentują w sposób jasny idee, jedynym zarzutem w odniesieniu do nich może być trochę za mały rozmiar czcionki przy opisie osi i w legendzie na niektórych obrazkach. Nie ma to znaczenia w przypadku czytania na ekranie komputera gdzie można sobie tekst powiększać, ale stanowi pewną niedogodność przy czytaniu papierowej wersji rozprawy. Rozdział ten skonstruowany jest według schematu w którym najpierw prezentowane były wyniki dotyczące komórek U2OS, a w drugiej kolejności przedstawione zostały podobne oznaczenia dla komórek MCF7. W badaniach oznaczano poziom aktywnego NF- κ B w całej populacji komórkowej i wpływ szoku termicznego na jego poziom a następnie prezentowane były najważniejsze, z punktu widzenia nowości, wyniki oznaczeń w pojedynczych komórkach. Dla opisu wyników tej części opracowano bardzo elegancką metodę przedstawiania i porównywania reakcji kilkudziesięciu komórek w postaci „heat mapy”. Bardzo interesujące są także wyniki dotyczące poszukiwania mechanizmów uruchamianych przez szok termiczny i powodujących hamowanie ścieżki NF- κ B. Sprawdzono czy po szoku zmienia się wychwytywanie cytokin przez receptory komórkowe, czy zmieniają się właściwości uczestniczących w aktywacji NF- κ B kinaz, czy efekt hamowania zależy od genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny HSF1, który jest aktywowany przez szok termiczny. Jest to więc praca w której pokazany jest nie tylko efekt, ale także możliwe mechanizmy przez jakie jest on w komórkach osiąganym.

Ostatni rozdział pracy to Dyskusja w której Autorka skupiła się na porównaniu swoich wyników z tymi, które pojawiały się wcześniej w literaturze i na możliwym ich wykorzystaniu w terapiach których elementem jest hipertermia. Jest to dobrze skonstruowany rozdział w którym może trochę za dużo jest powtórzeń opisu wyników, ale czyta się go z zainteresowaniem.

3. Uwagi ogólne i krytyczne

Obserwacje stymulacji ścieżki NF-κB w pojedynczych komórkach i zmiany tej stymulacji pod wpływem szoku termicznego dają nowe spojrzenie na dotychczas uzyskiwane wyniki badań dotyczących tego zagadnienia. Autorka wykazuje, że to co obserwujemy przy badaniach na populacji nie odzwierciedla dobrze procesów zachodzących w pojedynczych komórkach i że szok termiczny powoduje zmiany zarówno w ilości aktywnego NF-κB translokowanego do jąder komórkowych jak i częstotliwości jego przemieszczania się między cytoplazmą i jądrem (oscylacji). Rozprawa wnosi wiedzę o nieprzebadanych dotychczas elementach regulacji odpowiedzi komórkowej na stres. Badania imponują swoim zakresem i zarówno ilością wykonanych pomiarów jak i metodami i dogłębnnością ich analizy.

Rozprawa napisana jest bardzo ładnym językiem i bardzo starannie przygotowana edytorsko, chociaż Autorka nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć. Z uwag krytycznych mam drobne zastrzeżenia do skrótowych lub żargonowych opisów i pomyłek edytorskich, których przykłady podaję poniżej:

Str 19 literówka obecności zamiast obecność

Str. 20 literówka devision zamiast division

Str. 23 literówka do gąbek zamiast od gąbek

Str. 24 i dalsze – Autorka konsekwentnie używa nazwy „anikrynowe” zamiast „ankirynowe”

Str. 25 w podrozdziale 1.3.1.2 w opisie podano, że „... homodimery RelA i c-Rel, dzięki obecności domeny RHD aktywują transkrypcję nie jest jasne o co tu chodzi jako, że zgodnie z ryciną 3 wszystkie białka z tej rodziny posiadają taka domenę

Str. 33 przydałoby się kilka słów dotyczących funkcji białek kodowanych przez geny „wczesnej, średniej i późnej fazy” odpowiedzi na NF-κB, podane zostały tylko ich symbole.

Str. 41 literówka „hisotnu” zamiast histonu

Str. 49 „dopierano” zamiast dobierano

Str. 51 W zdaniu „Komórki wysiewano na (Greiner Bio-One; nr kat. 627860;627870) szalki.. powinno się nazwę firmy i nr katalogowy umieścić na końcu

Str. 52 słowo "sklastrowano" brzmi bardzo żargonowo

Str. 53 brakuje informacji o składzie buforu lizującego komórki

Str. 58, 105 i inne nie podobają mi się określenia „odpowiedź populacyjna”, „populacyjna aktywacja NF- κ B”

Str. 58 literówka „protoetoksyczny” zamiast proteotoksyczny

Str.62 Na Ryc.13 podano liczbę komórek 149 a w opisie 146

Str.66 i inne, opis reakcji „wszystko albo nic” nie jest jasny

4. Wniosek końcowy

Mimo opisanych wyżej drobnych niedociągnięć praca jest w mojej opinii świetna i bardzo wartościowa, łączy w sobie badania eksperymentalne i studia literaturowe, ma spore znaczenie poznawcze a jej wyniki dostarczają nowych elementów wiedzy o mechanizmach molekularnych działających w pojedynczych komórkach i populacjach komórkowych w odpowiedzi na stres. Ogólna redakcja pracy, sposób wykorzystania źródeł i opis przeprowadzonych badań oraz otrzymanych rezultatów nie budzą zastrzeżeń.

Reasumując stwierdzam, że wszystkie sformułowane przeze mnie uwagi krytyczne nie mają zasadniczego charakteru a przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Paszek stanowi istotny wkład do problematyki dotyczącej mechanizmów angażujących ścieżki sygnałowe NF- κ B i ich modulacji przez szok termiczny. Praca także zawiera dużo wiedzy ogólnej i świadczy o bardzo dobrej znajomości problemu przez doktorantkę. W mojej opinii rozprawa spełnia wymagania stawiane przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Paszek do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego a także wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

Gliwice, 24.08.2018



Joanna Rzeszowska