



Dr hab. Piotr Pawlak

13.11.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Hanny Nowickiej
wykonanej w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Hansa A.R. Bluysena

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. "The role of phosphorylation of ISGF3 components in the regulation of ISG expression and viral protection" to 162-stronicowe, anglojęzyczne opracowanie zawierające typowy układ złożony z rozdziałów: wstęp, hipoteza i cele badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja, streszczenia w języku obcym i polskim, wykaz figur, tabel oraz akronimów, spis literatury oraz informacje o źródłach finansowania badań. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Hans A.R. Bluysen z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu, kierownik Zakładu Genetyki Molekularnej Człowieka. Na wstępie chciałbym zaznaczyć, że zespół prof. H. Bluysena od wielu lat prowadzi badania m.in. z zakresu szlaku sygnałowego JAK/STAT, a więc głównego wątku badawczego rozwijanego w ocenianej pracy.

Ścieżka sygnalizacyjna interferonu (IFN) jest głównym składnikiem wrodzonej odpowiedzi przeciwwirusowej ssaków, choć patogeny wirusowe wykształciły wiele mechanizmów ułatwiania infekcji i antagonizowania tego szlaku. Wytwarzanie IFN jest inicjowane po rozpoznaniu specyficznych wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP) przez receptory rozpoznawania wzorców gospodarza. IFN wiążą się ze swoimi receptorami, aktywując fosforylację kinaz JAK1 i TYK2, a w konsekwencji fosforylację białek STAT1 i STAT2, tworzących heterodimer. Po związaniu z czynnikiem IRF9, tworzą kompleks ISGF3, który przemieszcza się do jądra i aktywuje element odpowiedzi stymulowanej interferonem (ISRE), indukując szeroki zakres genów stymulowanych przez IFN (ISG). Szlak sygnałowy JAK/STAT jest jedną z ważnych regulacyjnych kaskad sygnałowych dla mnogich procesów komórkowych inicjowanych przez różne rodzaje ligandów, takich jak cytokiny, czynniki wzrostu lub hormony. W rozprawie stawiane są istotne pytania, będące wynikiem i rozwinięciem prowadzonych przez zespół badań, mających na celu zrozumienie alternatywnych mechanizmów indukujących ekspresję ISG przy użyciu technik wysokoprzepustowych.

Wstęp rozprawy jest bardzo obszernym rozdziałem, w którym Autorka drobiazgowo wyjaśnia poznane do tej pory mechanizmy odpowiedzi immunologicznej na zakażenie patogenami. Szczegółowo opisuje molekularne aspekty aktywacji ścieżek sygnałowych prowadzących do zwalczania wirusów. Na samym początku słusznie wskazuje na istotę problemu chorób wirusowych oraz mutagenności wirusów, wspominając o doświadczeniach ostatnich lat, a więc pandemii COVID-19 wywołanej wirusem SARS-Cov2. Dzięki zabiegom stylistycznym, z jednej strony pozostawia czytelnika z retorycznymi pytaniami, z drugiej zaprasza do dalszej interesującej lektury. W niektórych momentach można uniknąć powtórzeń informacji, które pojawiały się we wcześniejszych podrozdziałach, co może nieco skrócić wypowiedź, a nie wpłynie na płynność przekazu. Z jednej strony wstęp jest szczegółowym opracowaniem, ale zdarza się, że Autorka pozostawia niektóre kwestie niewyjaśnione, jak np. na stronie 11, opisując możliwą aktywację (w określonych warunkach), genów stymulowanych wzajemnie przez interferony, zawierających sekwencje ISRE lub GAS. Podobnie, na stronie 29, zawarto ciekawą informację, że IRF9 może samodzielnie, choć z mniejszym powinowactwem rozpoznawać sekwencje ISRE i łączyć się z DNA. Nasuwają się pytania czy w takim razie IRF9 może samodzielnie wchodzić do jądra komórkowego, jeśli tak to w jakich warunkach, kiedy jako ISGF3, a kiedy samodzielnie i jaka może być tego przyczyna. Niewątpliwie cenne są fragmenty wstępu, w których Autorka porównuje mechanizmy odpowiedzi komórkowej u różnych gatunków, najczęściej jednak u myszy, wskazując na różnice z komórkami ludzkimi.

Hipoteza badawcza została jasno sformułowana i zakłada współistnienie i funkcjonowanie kompleksów ISGF3 z innymi, w skład których nie wchodzi STAT1, w formie fosforylowanej lub nie. Postawiono pięć głównych celów badawczych, do których Autorka odnosi się w rozdziale wyniki w formie, od najbardziej ogólnych po bardziej szczegółowe i dogłębne.

W rozdziale Materiał i metody, podrozdziale izolacja RNA i odwrotna transkrypcja zabrakło informacji tabelarycznej odnośnie stężeń niektórych używanych odczynników, podobnie w tabeli 3/2, w której zamiast objętości dodawanych starterów, ważniejsze byłoby zamieszczenie informacji o ich końcowym stężeniu. W tabeli 3/3, w punkcie 3 powinna zostać uzupełniona informacja o etapie wydłużania amplikonów, a nie tylko przyłączania starterów. Choć zestawiono sekwencje starterów używane do PCR, to brakuje informacji o długości produktów oraz specyficznych warunkach. Autorka zawarła także informacje, że ilościowy PCR było wykonywany na dwóch różnych maszynach. Biorąc pod uwagę wytyczne MIQE guidelines, opracowania na potrzeby analiz qPCR, które ma na celu ujednoczenie metod i zapewnienie powtarzalności



publikowanych wyników, w rozprawie powinny w mojej ocenie zostać zawarte dodatkowe istotne informacje. Po pierwsze, Autorka wskazuje, że bazowała w obliczeniach na dwóch genach referencyjnych, ACTB lub GAPDH, jednak w rozdziałach przedstawiających wyniki wszystkie analizy odnoszone są względnie do GAPDH. Czy zatem zwalidowano stabilność ekspresji genów referencyjnych oraz jak przedstawiał się profil ekspresji tych genów pomiędzy analizowanymi liniami komórkowymi? Czy analizy wykonano na cDNA bibliotek, użytych do analiz wysokoprzepustowych (RNA-seq), które przygotowano w trzech powtórzeniach biologicznych, czy przygotowano dodatkowe próby na cele qPCR? Warto uzupełnić także ten rozdział, szczególnie gdy ekspresja mRNA genów badanych jest porównywana ze sobą, o kontrolę efektywności reakcji dla poszczególnych genów (m.in. slope i Y-intercept). Nie przedstawiono także rozdziału odnośnie metod statystycznych użytych do porównań międzygrupowych lub w odstępach czasowych. Inne metody, RNA-seq, Chip-seq czy western-blot zostały szczegółowo opisane i zapewniają ewentualnym odbiorcom odwzorowanie technik. Dla zaspokojenia ciekawości recenzenta, uwzględniłbym w tym rozdziale, lub na wstępie wyników krótką informację lub zestawienie tabelaryczne opisujące jakość sekwencjonowania, ilość uzyskanych odczytów w próbach etc.

Wyniki przedstawiono w podziale na 5 podrozdziałów, w których Autorka umiejętnie przedstawia analizy jednocześnie dokonując wstępnych konkluzji. W niektórych miejscach pojawiają się jednak niejednoznaczne stwierdzenia np. "phosphorylation remained slightly higher", które jak rozumiem, mają wskazać pewien trend, jednak powinna zostać zawarta informacja o ewentualnej istotności (lub jej braku) danego wyniku. W rycinie 4.3, przedstawiającej ekspresję wybranych genów w komórkach 2fTGH oraz Huh7.5 nie jest jasne czy dane uwzględniają średnią ekspresję dla genów wyszczególnionych na kolejnych wykresach, czy szerszy/odmienny pakiet ISG. W podrozdziale 4.6 Autorka wskazuje także na dwa odmienne progi stosowane w analizie krotności ekspresji (\log_2FC), co spowodowane jest prawdopodobnie brakiem genów ulegających zróżnicowanej ekspresji (DEG) w komórkach ST2-U3C przy założeniu $\log_2FC > 1$. Bardzo ciekawe wyniki przedstawiono w trzeciej części tego rozdziału, w oparciu o analizy z użyciem inhibitora JAK (JII). Słusznie zaznacza Autorka, że w niektórych przypadkach, ekspresja nie została zupełnie wyciszona i utrzymywała się nawet do 72h, jak w przypadku IFI6. Zastanawiająca może być zatem próba prześledzenia szlaku ekspresji tego genu i indukcji także przez inne czynniki. Zwracam uwagę na potrzeby przygotowania manuskryptu, że tożsame wykresy dla linii ST2-U3C mają odwróconą kolorystykę słupków. Bardzo trafionym pomysłem są formułowane podsumowania konkretnych rozdziałów i partii wyników w zwięzłym akapicie.

Dyskusja rozprawy liczy 15 stron, na których Doktorantka czytelnie i zrozumiale omawia uzyskane wyniki jednocześnie odnosząc je do wcześniej publikowanych. Szczególnie cenne są proponowane przez Autorkę, odpowiednio zilustrowane modele przebiegu szlaków sygnalizacyjnych zbudowane na podstawie istniejącej wiedzy oraz badań zespołu i własnych. W tej części nasuwa się kilka istotnych pytań. W pierwszej kolejności pytanie dotyczy profilu ekspresji genów stymulowanych interferonem, w szczególności tych wykazujących długotrwałą ekspresję. Czy obserwowany efekt wynika z ciągłej ekspresji na względnie stałym poziomie czy początkowej wysokiej ekspresji i utrzymaniu mRNA. Drugie pytanie, nieco wykraczające poza obszar badawczy rozprawy dotyczy białek STAT2 i potencjalnych mechanizmów prowadzących do ich degradacji. W pracy Autorka podała kilka przykładów inhibicji białka STAT1 przez niektóre wirusy. Jednak, dla przykładu, wśród gatunków dużych zwierząt (przeżuwaczy) i zakażenia orbivirusem (BTV) wykryto mechanizm degradacji także białka STAT2. Jak wspomniałem wcześniej zestawienie takich mechanizmów, dla różnych gatunków zwierząt modelowych, towarzyszących oraz człowieka byłoby bardzo przydatne.

W pracy doktorantka posługuje się głównie liczbą mnogą opisując wyniki, ale także wnioski lub prowadząc dyskusję. O ile w pracach oryginalnych, wieloautorskich tego typu narracja jest oczywista, gdyż wskazuje na udział każdego z autorów w powstaniu pracy, przebieg czy realizację badań, to w przypadku rozprawy doktorskiej, dokumentującą zresztą warsztat młodego naukowca, skłaniałbym się do formy pierwszej osoby, względnie formy bezosobowej – wytypowano, przeanalizowano, wyciągnięto wnioski... Nie umknęło mi jednocześnie czytając pracę bardzo rzetelne, szczerze wskazanie przez Doktorantkę osób, które uczestniczyły w badaniach, pomagały w analizach czy udostępniły swoje wyniki lub warsztat naukowy. Dlatego powyższa uwaga ma bardziej wymiar redakcyjny, jako że w sposób oczywisty wyniki analizowane były przez cały zespół. Niemniej zachęcam na kolejnych etapach kariery naukowej do odwagi w formułowaniu twierdzeń i konkluzji. Z pewnością dużą zaletą pracy jest mnogość technik analitycznych użytych do weryfikacji stawianych hipotez. Należy zaznaczyć, że choć wysokoprzepustowe techniki są już powszechnie używane, a dostępne odczynniki i aparaty zapewniają coraz bardziej powtarzalne i dogłębne, wysokorozdzielcze wyniki, to taki warsztat badawczy na tym etapie kariery naukowej z pewnością zaprocentuje i zasługuje na uznanie. Na wyróżnienie zasługują także przygotowane przez Autorkę ryciny ilustrujące mechanizmy odpowiedzi komórkowej na wzorce molekularne (tzw. PAMPs oraz DAMPs) oraz inne. Dodałbym może do nich jedynie legendę, przedstawiającą poszczególne elementy graficzne zawarte na rycinie. Uważam ponadto, że cenne byłoby zestawienie istniejących danych literaturowych i



pokazanie ich w tabeli nt. poznanych mechanizmów odpowiedzi komórkowej na dany wirus lub wykazanie wpływu konkretnych patogenów na funkcjonowanie ścieżki JAK/STAT.

Z obowiązku recenzenta, zwracam także uwagę na drobne błędy redakcyjne, np. str. 10 - IFNARG1 - powinno być IFNRG1; str. 15 - w podrozdziale 1.3.1. JAKs, powinna pojawić się informacja o kinazie JAK2 i JAK3 (a nie JAK1 i JAK3), uzupełniających rodzinę tych białek obok JAK1 i TYK2; strona 49 - W pracy Autorka często posługuje się akronimem KO - od angielskiego knock-out. W większości przypadków zachowuje pisownię z kropkami, choć nie zawsze, stąd proponuję ujednoczenie i pozostanie przy formie KO. Spis literatury został przygotowany chaotycznie, w niektórych pozycjach pojawiają się numery DOI, w innych odniesienia do strony portalu NCBI, w jeszcze innych brakuje danych zeszytowych i numerów stron dla publikacji sprzed kilku lat. Rzecz jasna uwagi te nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Podsumowując uważam, że przedstawiona praca doktorska ma wysoką wartość merytoryczną, udokumentowaną cennymi wynikami, które powinny znaleźć odzwierciedlenie w oryginalnej publikacji naukowej. Ponadto została napisana przystępnie, fachowym językiem o bardzo dobrej konstrukcji stylistycznej.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Hanny Nowickiej spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Hanny Nowickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

KIEROWNIK KATEDRY



dr hab. Piotr Pawlak