

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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ B, jak i fosforylacji podjednostki NF- κ B, RelA na Ser536), natomiast wpływ szoku 15 i 30 minutowego jest stosunkowo nikły. Godzinny szok termiczny prowadzi do istotnych zmian konformacyjnych białka IKK α (oraz w mniejszym stopniu IKK β) zmniejszając frakcję rozpuszczalnego białka (do ok 40% dla IKK α) Efekt ten jest jednak zbyt słaby by wyjaśnić istotny spadek aktywacji NF- κ 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

obserwowany jest dla łagodniejszego szoku termicznego (41 C°) gdy stymulacja cytokiną następuje bezpośrednio po szoku.

3. Charakteryzacja ekspresji 4 genów zależnych od NF- κ B (w zależności od czasu między szokiem termicznym a stymulacją TNF lub IL1. Analiza pokazuje obniżoną ekspresję, która wraca do poziomu bez szoku termicznego dla stymulacji TNF i IL1 4 godziny po szoku termicznym.

Po tych rezultatach Autorka wysuwa 3 robocze hipotezy wytłumaczenia obserwowanego wyciszenia odpowiedzi na TNF i IL1 przez szok termiczny: (1) szok termiczny powoduje inhibicję receptorów TNF i IL1, (2) szok termiczny powoduje zmiany konformacyjne kompleksu IKK, (3) szok termiczny powoduje aktywację HSF1 i HSR (to wiadomo) które interferują z sygnalizacją NF- κ B.

1. Analiza internalizacji fluorescencyjnie znakowanych IL1 i TNF pokazała, że dynamika aktywacji receptorów TNFR i IL1R jest niezależna od wcześniejszego szoku termicznego.
2. Analiza wpływu temperatury szoku termicznego na konformacje kinaz IKK α i IKK β , pokazała obniżenie frakcji form rozpuszczalnych obu kinaz dla temperatury 43 C° (i brak wpływu niższych temperatur). Frakcja form rozpuszczalnych wraca do stanu wyjściowego 4 godzin po szoku termicznym. Zdaniem Autorki mechanizm ten może być zatem wystarczający dla wytłumaczenia wyciszenia sygnalizacji IL1 powracającej po czterech godzinach do poziomu bez szoku, ale nie dla TNF (tu argumentacja nie jest dla mnie przekonująca, w szczególności w kontekście punktu 3),
3. Aby zweryfikować 3 hipotezę Autorka porównuje wpływ szoku termicznego dla komórek MCF7 z wyciszonym białkiem HSF1 (metodą siRNA) oraz komórek MCF7 z scrambled siRNA. Wyniki zdają się sugerować, że wyciszenie białka HSF1 osłabia aktywację NF- κ B poprzez TNF podany 4 godziny po szoku termicznym. W tym przypadku nie zaobserwowano zsynchronizowanego pierwszego pulsu NF- κ B. Efekt ten jest niewidoczny dla stymulacji IL1, co pokazuje że wpływ szoku termicznego na sygnalizację cytokinami TNF i IL1 jest jakościowo inny. W przypadku TNF efekt szoku termicznego może być wzmocniony wyciszeniem białka HSF1 aktywowanego szokiem termicznym.

Podsumowując, praca stanowi wnikliwą analizę doświadczalną wpływu szoku termicznego na aktywację ścieżki NF- κ B przez dwie cytokiny TNF i IL1. Jest logicznie zredagowana, klarownie i starannie napisana. Na uwagę zasługuje fakt samodzielnego wyprowadzenia dwóch linii komórkowych MCF7 i U2OS wyrażających fuzyjne białko RelA-GFP.

Uwagi krytyczne/dyskusyjne

1. W eksperymencie z wyciszeniem HSF1 brakuje mi danych bezpośrednio po szoku termicznym. Dane 4 godziny po szoku (Ryc. 39, scrambled siRNA) w porównaniu z danymi bez siRNA (Ryc. 22) sugerują, że nawet scrambled siRNA istotnie wpływa na odpowiedź. Jest zupełnie prawdopodobne że scrambled siRNA sam wywołuje odpowiedź immunologiczną i w ten sposób osłabia odpowiedź na TNF.
2. W pracy brakuje mi analizy translokacji NF- κ B poprzez WB z frakcjonowaniem na część jądrową i cytoplazmatyczną. Taką analizę trudno zastąpić określeniem fosforylacji Ser536 RelA, jako że fosforylacja RelA nie jest jednoznacznym markerem jądrowej translokacji. Natomiast badania przyżyciowe wprawdzie określają czasowy profil jądrowego NF- κ B w pojedynczych komórkach, ale po pierwsze prowadzone są na linii transfekowanej co może zmieniać jej wrażliwość, a po drugie kwantyfikacja zdjęć mikroskopowych jest raczej jakościowa niż ilościowa (stąd jak rozumiem arbitrary units).

3. Szkoda, że analiza ekspresji genów została przeprowadzona tylko dla jednego punktu czasowego 90 min po stymulacji cytokiną. W kontekście większej liczby pulsów NF- κ B po łagodnym szoku termicznym 41 C°, oraz 4 godziny po silnym szoku termicznym 43 C° można podejrzewać silniejszą ekspresję dla dłuższych czasów po stymulacji cytokiną (4, 6 h).
4. Cała dyskusja podporządkowana jest terapii antynowotworowej, brakuje mi odniesienia do obrony immunologicznej. Zdaje sobie sprawę, że w Centrum Onkologii rak jest większym zmartwieniem niż grypa, niemniej jednak NF- κ B aktywowane jest bezpośrednio w odpowiedzi na LPS bądź wirusowe dsRNA, lub pośrednio w odpowiedzi na cytokiny (TNF oraz IL1) wydzielane przez makrofagi stymulowane LPS. Bardzo często silnym infekcjom towarzyszy gorączka i w tym kontekście zróżnicowanie odpowiedzi w zależności od temperatury szoku 41/42 versus 43 C°, wydaje się bardzo istotne. Przeprowadzone badania mogą sugerować że łagodny szok termiczny 41 C° wzmacnia odpowiedź immunologiczną (bądź pozostawia ją na tym samym poziomie – bardzo interesujący byłby RT PCR genów zależnych od NF- κ B po 4-6 godzinach od stymulacji cytokiną) a silny 43 C° ją osłabia.

Reasumując, przedstawiona rozprawa doktorska świadczy o dużej wiedzy i biegłości doświadczalnej Autorki w zakresie biologii medycznej. **W oparciu lekturę pracy oraz powstałej dzięki niej publikacji w Plos Computational Biology, 2018 wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej do publicznej obrony.** Sugeruję również wyróżnienie pracy, choć oczywiście ostateczny wniosek łatwiej będzie sformułować po ustosunkowaniu się Autorki do uwag krytycznych/dyskusyjnych oraz po obronie pracy.

Tomasz Ligasiewicz