



Wrocław 23 listopada 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Jennifer Mytych

"Poszukiwanie nowych właściwości białka klotho w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych"

Monocyty, makrofagi oraz granulocyty obojętnochłonne są pierwszą linią obrony organizmu przeciwko patogenom lub obcym komórkom. Powstające w szpiku kostnym monocyty trafiają do krwioobiegu, gdzie pełnią swoją funkcję przez kilka dni. Biorą one udział w odpowiedzi immunologicznej, usuwają patogeny i ich pozostałości na drodze fagocytozy, jak również uczestniczą w procesach zapalnych. Monocyty pobierają, degradowują, a następnie prezentują antygeny limfocytom T oraz limfocytom B. Ponadto komórki te są prekursorami makrofagów i komórek dendrytycznych.

W rozpoznaniu czynników patogennych przez komórki układu immunologicznego, w tym monocyty biorą udział białko CD14 oraz receptory z grupy *Toll-like* (TLR, Toll-like receptor). Jednym z ligandów silnie aktywującym komórki układu odpornościowego jest lipopolisacharyd bakteryjny (LPS). Lipopolisacharyd jest składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Ta endotoksyna posiada bardzo silne właściwości prozapalne i immunogenne. LPS po związaniu się z błonowymi receptorami aktywuje szereg wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałnych. Ich efektem jest wydzielanie przez komórki różnorodnych cytokin, chemokin oraz innych cząsteczek. W przypadku ludzi nawet nanogramowe ilości LPS mogą wywołać objawy chorobowe (ból mięśni, gorączka, dreszcze, nudności). Nadmierna aktywacja komórek przez LPS (w przypadku ciężkich zakażeń) może prowadzić do zaburzenia odpowiedzi zapalnej. Nasilone wytwarzanie chemokin, cytokin, prostaglandyn i reaktywnych form tlenu może prowadzić do sepsy i szoku septycznego.

Wpływ LPS oraz innych czynników prozapalnych na komórki układu odpornościowego jest złożony. Zależy on zarówno od ich stężenia jak i czasu ekspozycji. W przypadku monocytów długotrwała ekspozycja na bakteryjne antygeny indukuje populacje o zmienionym fenotypie, wskazującym na indukowaną senescencję. Badania prowadzone przez mgr inż. Jennifer Mytych pod kierownictwem prof. dr hab. Marka Koziorowskiego oraz dr Marii Romerowicz-Misielak miały na celu zrozumienie zjawiska przedwczesnego starzenia się monocytów pod wpływem LPS. Dodatkowo doktorantka postanowiła zbadać jak aktywowane monocyty oddziałują z innymi komórkami, jak również rolę białka klotho w tych procesach. Uważa się, że białko to może modulować pracę układu immunologicznego.

Przedstawiony do recenzji autoreferat składa się trzech artykułów naukowych poprzedzonych wprowadzeniem przybliżającym czytelnikowi tematykę badań oraz komentarzami do osiągnięć opisanych w załączonych pracach. We wprowadzeniu doktorantka pokrótce przedstawia informacje

o aktywności biologicznej monocytów, oddziaływaniu z innymi komórkami oraz białku klotho. Publikacje będące podstawą rozprawy zostały zamieszczone w recenzowanych zagranicznych czasopismach o dobrym współczynniku wpływu (IF powyżej 3). Artykuły będące podstawą rozprawy są ze sobą tematycznie powiązane i układają się w logiczną całość.

Do najważniejszych osiągnięć mgr inż. Jennifer Mytych zaliczam:

1. Wykazanie, że odpowiedź komórkowa monocytów na LPS jest zależna od stężenia endotoksyny. Przy wysokich stężeniach LPS, autorka pracy zaobserwowała zwiększone stężenie reaktywnych form tlenu co przekładało się na zachwianie równowagi redoks oraz równowagi wapniowo-cynkowej w monocytach linii THP-1. Wynikiem stresu oksydacyjnego była również aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, sekrecja TNF α , uszkodzenia w obrębie telomerowego DNA, zablokowanie cyklu komórkowego oraz zmiany strukturalno-funkcjonalne jąder komórkowych. Skumulowane efekty działania LPS doprowadziły do uruchomienia procesów apoptozy. Takie działanie endotoksyny mgr inż. Jennifer Mytych określa jako efekt cytotoksyczny.
2. Stwierdzenie, że przy stężeniach LPS poniżej 5 μ g/ml aktywacja endotoksyną prowadzi do powstania w komórkach THP-1 fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem. Część z obserwowanych zmian w funkcjonowaniu komórki jest identyczna jak dla wysokich stężeń LPS, jednak autorka pracy nie zaobserwowała uszkodzeń w obrębie DNA a jedynie zmiany na poziomie jąder komórkowych. Co ciekawe, monocyty utraciły swoje własności fagocytarne. Zmiany komórkowe będące następstwem długotrwałej ekspozycji na niskie stężenia LPS zostały określone przez doktorantkę jako efekt cytostatyczny.
3. Zidentyfikowanie TNF α jako czynnika definiującego losy monocytów poddanych różnym stężeniom LPS.
4. Otrzymanie stabilnych transfektantów komórek THP-1 nadprodukujących membranową oraz sekrecyjną postać białka klotho.
5. Wykazanie, że białko klotho zabezpiecza komórki THP-1 poddane działaniu LPS przez stresem oksydacyjnym. W komórkach nie dochodzi do aktywacji szlaku NF- κ B oraz indukcji fenotypu sekrecyjnego, a poziom uszkodzeń DNA jest mniejszy w stosunku do komórek kontrolnych.
6. Zaobserwowanie, że monocyty nadprodukujące białko klotho zmniejszają ekspresję cytokin prozapalnych oraz odkrycie, podwyższonej sekrecji przeciwzapalnej interleukiny 10.
7. Potwierdzenie funkcjonalnej aktywności modelowej linii monocytów w obecności białka klotho.
8. Wykazanie, że kalcytriol wywołuje podobne efekty biologiczne jak białko klotho. Obserwowany wpływ na hamowanie immunosenescencji jest jednak mniejszy niż w przypadku białka klotho.
9. Przeprowadzenie badań kokultur monocytów oraz komórek HeLa (w pracy używane jako modelowa linia epitelialna). Za pomocą LPS indukowano aktywację monocytów natomiast z użyciem doksorubicyny wywoływano u nich immunosenescencję. Doktorantka wykazała, że tak traktowane monocyty wywołują szereg zmian w komórkach epitelialnych. Zaobserwowała w nich indukcję procesów starzenia komórkowego oraz aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy.
10. Zaobserwowanie, że nadprodukcja białka klotho przez komórki HeLa zabezpiecza je przed niekorzystnym wpływem aktywowanych lub podlegających immunosenescencji monocytów.

Do doktorantki mam kilka pytań:

Dlaczego w eksperymentach z użyciem modelowych monocytów linii THP-1 używano mikrogramowych (1-20 µg/ml) stężeń LPS. W literaturze można znaleźć dane dla dużo niższych stężeń (Schildberger i wsp., *Mediators of Inflammation*, 2013; Zakharova i wsp., *PLoS One*. 2010; Suzuki i wsp., *Blood*. 2000).

Linia na której prowadzono badania wywodzi się z białaczki monocytarnej. Czy w monocytach izolowanych z krwi można spodziewać się podobnych efektów biologicznych ?

Jakie są stężenia LPS w krwi osób z ciężkimi zakażeniami lub sepsą ?

Jaki może być mechanizm działania wolnego białka klotho (postaci sekrecyjnej) na komórki THP-1 aktywowane LPS ?

Czy białko klotho może wykazywać aktywność wewnątrzkomórkową ?

Dlaczego do analizy IC zastosowano model liniowy, zwyczajowo analiza jest prowadzona za pomocą regresji nieliniowej. Jak wyglądały dopasowania krzywych do danych eksperymentalnych ?

Jednym ze sposobów w jaki aktywowane monocyty THP-1 mogą wpływać na komórki epitelialne jest kontakt bezpośredni. W pracy nie znalazłem dowodu na takie zjawisko. Czy autorka pracy może udowodnić, że do kontaktów bezpośrednich dochodzi pomiędzy tymi komórkami ?

Jakich efektów można się spodziewać, jeśli będzie prowadzona kokultura komórek epitelialnych oraz monocytów z indukowaną za pomocą LPS immunosenescencją. Czy takie eksperymenty prowadzono ?

Jaki wpływ ma LPS na komórki epitelialne, np. HeLa. Czy obecność LPS była sprawdzana w kokulturach komórek HeLa i THP-1 traktowanych wcześniej LPS.

W dołączony do pracy oświadczeniu nr 3 udział w pracach eksperymentalnych mgr inż. Jennifer Mytych wynosi 50 %. Jakie doświadczenia wykonywała ?

Chciałbym również aby szerzej został przedyskutowany związek pomiędzy białkiem klotho a zakażeniami bakteryjnymi w kontekście wyników otrzymanych podczas realizacji pracy.

Podsumowując, pragnę podkreślić bardzo wysoki poziom przedstawionej do oceny pracy. Co warto podkreślić w każdej z publikacji będącej podstawą rozprawy mgr inż. Jennifer Mytych jest autorem korespondencyjnym. Poza publikacjami wchodzącymi w skład autoreferatu, mgr inż. Jennifer Mytych ma olbrzymi dorobek naukowy, jak na obecny etap rozwoju kariery naukowej.

Mgr inż. Jennifer Mytych w swoich badaniach wykorzystwała szeroki wachlarz metod badawczych, dzięki którym otrzymała bardzo ciekawe dane dotyczące wpływu LPS na monocyty oraz udziału w procesach zapalnych białka klotho.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej "Poszukiwanie nowych właściwości białka klotho w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych" jest bardzo wysoka, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Jennifer Mytych przez Radę Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoki poziom przedstawionej pracy oraz opublikowanie jej wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Z poważaniem



Daniel Krowarsch