



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Pracownia Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 17.02.2015 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Anny Wójcik
**p.t.: “Czynniki regulujące transformację fibroblastów oskrzelowych
w miofibroblasty u chorych na astmę”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Sanaka
w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJ CM
im. Prof. Andrzeja Szczeklika
oraz
w Zakładzie Biologii Komórki
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Promotor pomocniczy: dr hab. Marta Michalik

Rozprawa doktorska pani mgr Wójcik dotyczy mechanizmów molekularnych transformacji fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty (tzw. procesu FMT) w patogenezie astmy. Astma stanowi poważny i narastający problem zdrowotny społeczeństw wysoko rozwiniętych. Jej podłożem jest przewlekły stan zapalny dolnych dróg oddechowych, który prowadzi do różnorodnych objawów włącznie z zaburzeniami wentylacji. Na poziomie komórkowym i tkankowym w przebiegu astmy stwierdza się znaczną przebudowę drzewa oskrzelowego w porównaniu do osób zdrowych. Przebudowa ta wymaga zmian w stanie zróżnicowania bądź aktywacji wielu typów komórek występujących w oskrzelach, a dokładne mechanizmy tych procesów są intensywnie badane. W ten nurt światowych badań wpisuje się recenzowana rozprawa. Jej celem było scharakteryzowanie transformacji fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty, a w szczególności określenie roli szlaków sygnałowych TGF β , CTGF oraz Wnt w tym procesie. Jej przedmiotem były komórki pobrane od pacjentów z astmą, w porównaniu do komórek osób, u których tę chorobę wykluczono. Zaprezentowane badania dotyczą ważnego problemu naukowego i medycznego, a ich wyniki wnoszą wkład do zrozumienia podłoża astmy na poziomie molekularnym. Jest to zagadnienie bardzo istotne, biorąc pod uwagę głównie objawowe leczenie tej choroby oraz konieczność poszukiwania nowych podejść terapeutycznych.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 113 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp (24 strony) zawiera 7 podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po jednostronicowym przedstawieniu celów pracy następuje opis materiałów i metod (18 stron). Wyniki (19 stron) są podzielone na 4 podrozdziały, a dyskusja liczy 14 stron. Rozprawa kończy się jednostronicowym wykazem wniosków, spisem literatury zawierającym 202 pozycje oraz suplementem w postaci czterech dodatków (A-D, w tym ostatni zawierający spis rysunków i tabel).

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy jest bardzo dobrym, przekrojowym omówieniem zagadnień leżących u podstaw pracy doktorskiej: ogólnej charakterystyki astmy i zachodzącej w jej przebiegu przebudowy drzewa oskrzelowego, cech transformacji fenotypowej fibroblastów w miofibroblasty (FMT) oraz czynników i wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych regulujących ten proces. Wstęp jest oparty na bogatym, często najnowszym, piśmiennictwie. Dobór treści jest właściwy, informacje podane są w sposób spójny i logiczny, a przejrzysty styl jest przyjazny czytelnikowi. Wstęp zawiera trzy rysunki i jedną tabelę. Generalnie wysoko oceniam tę część rozprawy, która dokumentuje dużą wiedzę Autorki w tematyce rozprawy. Mam jednak kilka poniższych pytań lub zastrzeżeń:

Co to jest czynnik EGF-2 (epidermal growth factor type 2) i czym różni się od klasycznego EGF (str. 21)?

Na str. 23 Autorka pisze o białkach macierzy zewnątrzkomórkowej takich jak „domena fibronektyny ED-A”, co jest nieprawidłowe (domena nie jest białkiem). Chodzi prawdopodobnie o wariant splicingowy fibronektyny zawierający domenę ED-A.

W opisie składników szlaku sygnałowego TGF β zabrakło mi sprecyzowania czy poszczególne „izof formy” czy „typy” czynników TGF β i ich receptorów są produktami osobnych genów czy jedynie wariantami danego transkryptu (str. 24).

W części dotyczącej szlaku sygnałowego TGF β , Doktorantka umieszcza białko SARA na błonie komórkowej (str. 32 i Rys. 2), podczas gdy większość autorów opisuje jego lokalizację na błonach wczesnych endosomów. Wynika to z obecności w białku SARA domeny FYVE, odpowiedzialnej za wiązanie fosforanu 3-fosfatydyloinozytolu, który jest wzbogacony w błonach endosomów i nie występuje w znaczących ilościach w błonie komórkowej.

We wstępie i pozostałych częściach rozprawy (spis skrótów, wyniki) używano błędnej nazwy białka Disheveled jako „Dishelved”. Podobnie „heparan sulfate” to nie jak podano siarczan heparyny, ale siarczan heparanu. Poprawna nazwa BMP to bone morphogenetic protein (nie „morphogenic”, co pojawia się w liście skrótów i w tekście).

Cele badawcze pracy (w tym pięć szczegółowych) zostały poprawnie sformułowane.

Materiały i metody zostały opisane w kolejnym rozdziale, liczącym 16 podrozdziałów. Zasadniczo, metody zostały dobrane odpowiednio do założonych celów. Moje zastrzeżenia budzi jednak zastosowana metodyka badań z użyciem RNAi. Po pierwsze, do badań użyto preparatów dwóch różnych producentów: niewyciszającej kontroli negatywnej firmy Santa Cruz i oligonukleotydów skierowanych przeciw mRNA CTGF firmy Sigma-Aldrich. Jest to nieprawidłowe, gdyż różni producenci w różny sposób modyfikują chemicznie swoje preparaty dsRNA, aby zwiększyć ich stabilność w komórce i uchronić przed działaniem komórkowych RNaz. Należy więc zawsze używać odpowiadających sobie kontroli tego samego producenta i z identycznymi modyfikacjami (które najczęściej nie są przez producentów ujawniane). Po drugie, dlaczego w doświadczeniach stosowano 2.5-krotnie więcej siRNA przeciw CTGF niż siRNA kontrolnego? Ilości te muszą być takie same. Nie podano co prawda stężenia końcowego zastosowanych siRNA (zwyczajem jest podawanie takiego stężenia w nM), ale z moich przeliczeń wynika, że użyto bardzo wysokich (ponad 100 nM) stężeń siRNA przeciw CTGF (w dodatku stężenia te były różne dla różnych płytek hodowlanych). Wiadomo, że tak wysokie stężenia mogą wywoływać bardzo znaczące efekty niespecyficzne, tzw. off-target. Z tego względu rekomenduje się stosowanie stężeń jak najniższych, generalnie w zakresie 10 nM. Po trzecie, właśnie z uwagi na efekty niespecyficzne siRNA (występujące nawet w niskich stężeniach) zalecane jest użycie co najmniej dwóch niezależnych sekwencji wyciszających skierowanych przeciw jednemu mRNA. Wydaje się, że w rozprawie użyto wyłącznie jednej sekwencji (która powinna była zostać podana, włącznie z numerem katalogowym producenta). Z tych względów wyniki doświadczeń z użyciem RNAi uważam za obarczone błędami metodycznymi.

Ponadto, w Materiałach i metodach zabrakło na początku odnośnika do Dodatku A, w którym Doktorantka umieściła tabelę ze źródłami używanych odczynników. Rozpoczynając lekturę, czytelnik sądzi więc, że takich informacji nie podano. Podobnie brakuje w kilku miejscach odnośników do Dodatku B ze składami używanych roztworów. Generalnie, nie jest dla mnie jasne dlaczego takie istotne informacje umieszczono w dodatku, a nie w głównym tekście rozprawy. Ponadto, w przypadku przeciwciał komercyjnych dobrym zwyczajem jest podawanie również numerów katalogowych, gdyż niekiedy producenci dysponują kilkoma przeciwciałami dla jednego białka (zwłaszcza w przypadku białek fosforylowanych, np. nie znalazłam informacji jakie fosforylowane reszty Smad2 badano). Bez przytoczenia takiego numeru katalogowego, podawanie stosowanych rozcieńczeń przeciwciał (np. 1:400) jest bezużyteczne.

Pozostałe uwagi do Materiałów i metod są natury techniczno-edytorskiej. W rozdziale III.11.4 dotyczących analiz RT-PCR podano, że „Próbki analizowano w dwóch powtórzeniach”, nie precyzując czy chodzi o powtórzenia techniczne czy biologiczne. W Materiałach i metodach jest kilka nieprawidłowych odniesień do nieistniejących rozdziałów II (np. II.2, II.12). W bardzo licznych przypadkach brakuje spacji pomiędzy liczbą a jej jednostką. Warunki wirowania powinno się podawać w formie wielokrotności wartości g, gdyż liczba obrotów na minutę bez podania typu wirówki i rotora nie jest jednoznaczna. Lipofectamine®2000 jest zastrzeżoną nazwą handlową i nie ulega odmianie ani spolszczonej pisowni (np. „Lipofektaminy®2000”).

Wyniki pracy obejmują 15 rycin, przedstawiając kolejno: wpływ aktywacji szlaków Wnt i TGFβ na proces FMT i poziom CTGF w komórkach fibroblastów oskrzelowych, a

następnie wpływ czynnika CTGF oraz wyciszenia ekspresji jego genu na proces FMT. Ogólnie wysoko oceniam poziom merytoryczny i techniczny zamieszczonych w rozprawie wyników (z wyjątkiem powyższych zastrzeżeń do doświadczeń z użyciem RNAi), a także sposób ich prezentacji. Podstawową zaletą omawianych badań jest wartościowy materiał kliniczny będący ich podstawą (ludzkie fibroblasty oskrzelowe z mikrowycinków bronchoskopowych osób ze stwierdzoną i wykluczoną astmą). Mimo potencjalnie dużej indywidualnej zmienności genetycznej w obu grupach, wyniki uzyskane przez Doktorantkę charakteryzują się dużą spójnością, świadcząc o fundamentalnym charakterze badanych przez Nią procesów. Autorce udało się wykazać znaczące zmiany w fizjologii fibroblastów oskrzelowych astmatyków, m. in. spadek ich zdolności potencjału FMT po aktywacji szlaku Wnt, w przeciwieństwie do komórek osób z grupy kontrolnej. Badania Doktorantki wskazały także na istotną rolę czynnika CTGF w procesie FMT i synergii jego działania z czynnikiem TGF β , występującą z większym nasileniem w komórkach astmatyków niż osób, u których astmę wykluczono. Są to wyniki ciekawe i istotne, które otwierają perspektywy dalszych badań.

Podczas lektury tej części nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

- Na rycinach przedstawiających wyniki analiz RT-PCR (np. Rys. 10-12 i dalsze), nie było dla mnie jasne jakie wartości przedstawiono na osiach Y wykresów. Opisano je jako „krotność zmiany ekspresji (danego genu) w porównaniu do GAPDH”. Pod wykresami zamieszczono tabelki z wartościami $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (w Materiałach i metodach str. 54 stwierdzono: „krotność zmian ekspresji genów = $2^{-\Delta\Delta Ct}$), ale wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ z tabel nie odpowiadają tym przedstawionym na wykresie.

- W całym tekście rozprawy, ale głównie w części Wyniki, zdarzają się formalnie niepoprawne określenia dotyczące „ekspresji białka”. Ekspresja dotyczy nie białka, a genu (którego oficjalna nazwa, często różna od nazwy kodowanego przez niego białka, zwyczajowo pisana jest kursywą). Przykładowo, „ekspresja OB-kadheryny” powinna brzmieć „ekspresja genu kodującego OB-kadherynę” lub „ekspresja *CDH11*”.

- W doświadczeniach z rozdziału IV.1.4 zabrakło mi wyjaśnienia dlaczego do badań wybrano ligand Wnt5a, który znany jest głównie z aktywacji szlaku niekanonicznego, niezależnego od kinazy GSK3 β i β -kateniny? Czy przeprowadzono dodatkowe eksperymenty wskazujące, że w badanych fibroblastach Wnt5a aktywuje szlak kanoniczny, np. wykonując barwienie na obecność β -kateniny w jądrach komórkowych? Kontrola taka wydaje się ważna, aby poprawnie zinterpretować wyniki uzyskane przy użyciu inhibitora GSK3 β .

- Rys. 8: błędna legenda dotycząca α -SMA, której nie badano w przedstawionych doświadczeniach.

- Rys. 17: w legendzie nie opisano co oznaczają zaznaczone na zdjęciach strzałki.

- W podrozdziale IV.4 opisujące doświadczenia z wyciszeniem ekspresji genu CTGF, oprócz moich wcześniejszych zastrzeżeń metodycznych, zabrakło kontroli wydajności działania siRNA. Najlepszą kontrolą byłoby zbadanie poziomu obniżenia białka CTGF metodą Western blot, ewentualnie wykonanie pomiarów poziomu mRNA (obie metody były używane wcześniej w rozprawie). Nie jest również jasne dlaczego doświadczenia były wykonywane wyłącznie na komórkach pobranych od astmatyków, bez porównania do grupy kontrolnej, co robiono we wszystkich innych typach eksperymentów w rozprawie.

Dyskusja jest zredagowana w sposób ciekawy i przejrzysty. Doktorantka w umiejętny sposób skonfrontowała własne wyniki z doniesieniami literaturowymi, wykazując się przy tym dużą wiedzą. Ponadto, trafnie i ostrożnie zinterpretowała swoje rezultaty, unikając powtórzeń z wcześniejszych części i wyciągając poprawne wnioski. W podrozdziale Podsumowanie, Autorka zestawiała zależności pomiędzy badanymi szlakami sygnałowymi również w formie graficznej. Generalnie, bardzo wysoko oceniam Dyskusję i uważam, że jest to bardzo dobrze i dojrzałe napisany rozdział.

Rozdział **Wnioski** kończy rozprawę. Zostały one poprawnie sformułowane. Mój niedosyt budzi jednak wniosek ostatni, który dotyczy potwierdzenia hipotezy o istnieniu różnic epigenetycznych pomiędzy komórkami astmatyków i osób zdrowych (hipoteza ta wspomniana jest również w streszczeniu). Niestety, w rozprawie hipoteza ta nie została omówiona i chciałabym usłyszeć opinię Doktorantki w tej kwestii podczas obrony.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem i stosunkowo starannie, choć zauważyłam sporo błędów literowych, których nie będę wymieniać. Poniżej kilka drobnych niedoskonałości, których warto uniknąć przy przygotowywaniu przyszłych tekstów.

- Brakuje numeracji niektórych stron.
- W anglojęzycznym streszczeniu liczne błędy gramatyczne i stylistyczne.
- „N-terminalny koniec” (str. 38) to tautologia.
- W niektórych miejscach pojawiają się odnośniki do „poniższych rysunków”, które są przedstawione powyżej (np. str. 66).
- „co raz częściej” (str. 88, 89) zamiast „coraz częściej”.
- W spisie literatury są pomyłki w kolejności alfabetycznej, co powoduje, że nie można odnaleźć niektórych pozycji w oczekiwanym miejscu (np. Masur et al 1996 na nieprawidłowej pozycji 160 i pozycja kolejna).

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Anny Wójcik podejmuje istotny problem naukowy z dziedziny biologii komórki, o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Uzyskane wyniki są cennym przyczynkiem do wiedzy przedmiotu i solidną podstawą do dalszych badań w celu zrozumienia podłoża astmy na poziomie komórkowym i molekularnym. Doktorantka wykazała się zdolnością planowania, wykonywania i interpretowania doświadczeń. Moje zastrzeżenia czy uwagi nie umniejszają wartości naukowej rozprawy, a mają być jedynie wskazówkami do planowania przyszłych badań i przedstawiania ich wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Katarzyny Anny Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Mięczyńska