



Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Skalniaka

Tytuł pracy: " MCPIP1 contributes to MG-132 toxicity by the inhibition of constitutive NF- κ B"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska opisuje badania charakteryzujące kilka istotnych właściwości genu *ZC3H12A*, odkrytego stosunkowo niedawno (lata 2006-2008) i równolegle przez dwa zespoły; jednym z nich był zespół, w którym pracuje doktorant Łukasz Skalniak. Dotychczasowe badania, w których znaczącą rolę odegrał doktorant i zespół, w którym pracuje, doprowadziły do zgromadzenia zdumiewająco szybko obszernej wiedzy o funkcji białka MCPIP1 i mechanizmie regulacji genu *ZC3H12A*. Obecnie nie ma wątpliwości, że białko MCPIP1 jest białkiem wielofunkcyjnym i wpływa na poziom ekspresji licznych genów poprzez szereg mechanizmów, co prowadzi do konkluzji wyrażone w ubiegłorocznej pracy przeglądowej, której doktorant jest współautorem, a także w rozdziałach „Wstęp” i „Dyskusja” rozprawy doktorskiej, że białko MCPIP1 należy, przy obecnym stanie wiedzy, uznać za główny przełącznik, tzw. „master-switch”, modulujący przebieg procesu zapalnego.

Wykryciu nowego genu, zwłaszcza, jeśli koduje białko o zdecydowanym wpływie na poziom aktywności licznych genów, nieodłącznie towarzyszy pytanie o mechanizm regulacji jego ekspresji. Ponadto rozpoczynają się prace, których celem jest zbadanie czy i jaką rolę może pełnić dany gen/białko w procesach innych niż jedynie proces, któremu początkowo poświęca się najwięcej uwagi. Ponieważ, jak wykazano, aktywność genu kodującego białko MCPIP1 ulega w określonych warunkach pobudzeniu w komórkach HeLa wywodzących się z raka szyjki macicy i w komórkach HepG2 wywodzących się z raka wątroby, zatem pojawiła się konieczność wyjaśnienia, czy białko to może również modulować fenotyp komórek nowotworowych i wpływać na przebieg procesu nowotworowego.

Rozprawa doktorska mgr. Łukasza Skalniaka mieści się w zakresie wymienionej wyżej problematyki, a w szczególności dotyczy poszukiwaniu sekwencji regulatorowych sterujących ekspresją genu *ZC3H12A* w komórkach HeLa i HepG2 w warunkach ekspozycji komórek na interleukinę 1 β , oraz zbadaniu jaki wpływ wywiera zahamowanie aktywności proteasomu na ekspresję genu *ZC3H12A* na poziomie transkrypcji i translacji. Praca składa z dwóch komplementarnych części. Pierwsza część, jakkolwiek bardzo rozbudowana, jest w zasadzie wstępem i przygotowaniem do podjęcia badań zasadniczych przedstawionych w drugiej części rozprawy, a których cel wyrażony jest w tytule pracy doktorskiej.

Przesłanką do rozpoczęcia badań opisanych w pierwszej części pracy były obserwacje wskazujące, że głównym czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję genu *ZC3H12A* w wyniku stymulacji komórek IL-1 β jest NF- κ B. Potwierdzenie, że tak może być w istocie doktorant uzyskał wykazując, że w porównaniu z komórkami kontrolnymi stopień aktywacji genu *ZC3H12A* w modyfikowanych genetycznie komórkach HepG2 eksprymujących konstytutywnie aktywny inhibitor czynnika transkrypcji NF- κ B był znacząco niższy.

Posługując się analizą *in silico* wykrył w genie *ZC3H12A* region, w którym znajdują się sekwencje DNA o potencjalnej zdolności wiązania czynnika NF- κ B. Następnie

skonstruował transgeny, w których gen wskaźnikowy kodujący lucyferazę ligował z fragmentami zawierającymi znane lub domniemane sekwencje regulatorowe „cis” genu *ZC3H12A*. Otrzymane konstrukty wykorzystał do wykonania analizy funkcjonalnej potwierdzając doświadczalnie, że wskazane sekwencje DNA, znajdujące się w drugim intronie genu *ZC3H12A* (w odległości około 2600-2900 pz. od miejsca inicjacji transkrypcji), mają istotnie właściwość wzmacniania transkrypcji genu w warunkach stymulacji komórek HepG2 IL-1 β . Właściwość wiązania czynnika NF-kB przez każdą z czterech zidentyfikowanych sekwencji doktorant wykazał stosując technikę opóźnienia migracji żelowej (EMSA), a funkcjonalność wiązania się czynnika NF-kB z każdym z tych miejsc doktorant potwierdził stosując analizę mutacyjną.

Wynik ten, łącznie z wynikiem innych badań wykonanych przez kolegów z Zakładu Biochemii ukazuje, że stymulowana IL-1beta transkrypcja genu kodującego białko MCP1P znajduje się pod kontrolą elementów regulacyjnych „cis” znajdujących się zarówno przed miejscem inicjacji transkrypcji, jak i w znacznej odległości za nim, ułożonych wewnątrzgenowo, oraz elementów regulacyjnych „trans” aktywowanych przez odmienne ścieżki przekazywania sygnału.

W jednej z ważniejszych prac dotyczących charakteryzowania właściwości białka MCP1P opublikowanej przez Lianga i wsp. w 2008 roku wykazano, że obecność tego białka osłabia efekt stymulacji aktywności promotora TNF w makrofagach traktowanych lipopolisacharydem, przy czym szereg przesłanek wskazywało, że MCP1P hamuje proces aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-kB. Powyższa obserwacja, w kontekście wykrycia że NF-kB jest ważnym aktywatorem transkrypcji genu *ZC3H12A*, skłoniła doktoranta do wyjaśnienia, czy poziom ekspresji genu *ZC3H12A* może być modulowany przez jego produkt (białko MCP1P), a więc czy w przypadku stymulowania komórek HepG2 IL-1 β może ekspresja genu *ZC3H12A* być regulowana poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego.

W celu weryfikacji tej hipotezy doktorant najpierw wykonał analizę EMSA z użyciem oligonukleotydu zawierającego kontrolną sekwencję DNA wiążącą czynnik NF-kB oraz lizatów otrzymanych z komórek HepG2, w których zwiększał lub obniżał poziom białka MCP1P odpowiednio poprzez transfekcję wektorem kodującym gen *ZC3H12A* lub traktowanie właściwym siRNA. Doświadczenie to wykazało jednoznacznie, że również w badanym przez doktoranta układzie białko MCP1P ma właściwość obniżania poziomu/stężenia kompleksów czynnika transkrypcyjnego NF-kB z rozpoznawaną przez niego sekwencją DNA zarówno w komórkach niestymulowanych, jak i stymulowanych IL-1 β .

Wynik powyższego doświadczenia implikował, że poziom transkryptów także innych genów (doktorant wybrał geny *IKBA* i *TNF*), których aktywność jest silnie pobudzana przez NF-kB w wyniku stymulacji IL-1 β powinien znacząco zmieniać się w zależności od komórkowego stężenia/poziomu białka MCP1P. Wykonanie odpowiednich badań na komórkach HepG2 z nadekspresją białka MCP1P oraz na komórkach, w których doktorant wytłumił ekspresję genu MCP1P metodą interferencji RNA, potwierdziło negatywny wpływ białka MCP1P na poziom transkryptów wybranych genów.

Aby wyjaśnić mechanizm obniżania przez MCP1P poziomu kompleksów NF-kB z sekwencjami regulatorowymi DNA doktorant założył, że efekt ten może być związany z aktywnością obecnej w białku MCP1P dwufunkcyjnej domeny PIN/DUB. Założenie to okazało się słuszne i zostało potwierdzone przez doktoranta poprzez wykazanie, że białko

MCPIP1 pozbawione domeny PIN/DUB, w przeciwieństwie do białka prawidłowego, nie powoduje obniżenia poziomu ekspresji genu wskaźnikowego SEAP znajdującego się pod kontrolą czynnika NF- κ B w komórkach HeLa stymulowanych IL-1 β (w tekście znajduje się informacja, że doświadczenie wykonano także na komórkach HepG2, ale wynik doświadczenia nie jest na rycinie 9 pokazany).

Jednocześnie doktorant wykazał, stosując analizę EMSA, że zwiększanie poziomu białka MCPIP1 w komórkach HeLa powoduje obniżanie poziomu kompleksu tworzonego przez oligonukleotyd zawierający miejsca wiązania NF- κ B ze zmutowaną, konstytutywnie wiążącą się z regulatorową sekwencją DNA podjednostki p65 czynnika NF- κ B. Wynik ten interpretuje doktorant jako wyraz blokowania lub osłabiania przez białko MCPIP1 oddziaływania czynnika NF- κ B z regulatorowymi sekwencjami DNA.

Ostatnim aspektem badanym w pierwszej części pracy doktorskiej była próba określenia, które etapy ścieżki aktywacji czynnika NF- κ B są blokowane przez białko MCPIP1. Wyniki prawidłowo zaprojektowanego doświadczenia wykonanego na komórkach HepG2 nie przyniosły jednak rozstrzygnięcia, ponieważ nie pojawiły się istotne różnice ani w stopniu degradacji inhibitorowego białka I κ B α , ani fosforylacji podjednostki p65, czy translokacji czynnika NF- κ B do jądra komórkowego pomiędzy stymulowanymi IL-1 β komórkami kontrolnymi oraz komórkami z wymuszoną nadekspresją białka MCPIP1. Próba zrozumienia tego dość zaskakującego efektu jest przedmiotem bieżących badań. Doktorant w rozdziale „Dyskusja” ujawnia, że wstępne dane dają podstawę do spekulacji, że MCPIP1 może hamować aktywację czynnika NF- κ B dopiero na terenie jądra komórkowego poprzez interakcję z bliżej niezidentyfikowanym jeszcze białkiem biorącym udział w końcowej fazie procesu aktywacji NF- κ B.

W drugiej, głównej części pracy, doktorant stara się wyjaśnić mechanizm wzrostu poziomu białka MCPIP1 w sytuacji, gdy proteasomalna degradacja białek blokowana jest inhibitorem proteasomu MG-132. Przesłanką do podjęcia przez mgr. Łukasza Skalniaka badań opisanych w tej części pracy doktorskiej były dane z piśmiennictwa wskazujące, że w komórkach HeLa stymulowanych IL-1 β białko MCPIP1 po osiągnięciu stosunkowo wysokiego stężenia ulega szybkiej degradacji zależnej od ubikwitynacji i proteasomów. Ta obserwacja implikowała, że zablokowanie funkcji proteasomów powinno być czynnikiem stabilizującym MCPIP1 także w komórkach niestymulowanych.

Jednocześnie, wiedząc, że transkrypcja genu kodującego MCPIP1 zależy od NF- κ B, a aktywność tego czynnika jest blokowana przez inhibitory proteasomu (na skutek wzrostu stabilności białka inhibitorowego I κ B α), można było oczekiwać, że po zadziałaniu inhibitora proteasomu na komórki ekspresujące MCPIP1 poziom transkryptów genu *ZC3H12A* zmniejszy się. Kiedy doktorant inkubował kontrolne, niestymulowane IL-1 β komórki HeLa i HepG2 w pożywce zawierającej MG-132, obserwował znaczny wzrost poziomu białka MCPIP1, przy czym efekt ten był silniej wyrażony w komórkach HepG2. Stosując standardowy test na określanie czasu półtrwania białek doktorant wykazał, że w badanych komórkach MCPIP1 jest białkiem stabilnym, zatem przyczyną wzrostu poziomu tego białka w komórkach traktowanych MG-132, nie było zahamowanie aktywności proteolitycznej proteasomów. Na podstawie powyższej obserwacji doktorant założył, a następnie udowodnił, że wzrost poziomu MCPIP1 w badanych komórkach traktowanych MG-132 spowodowany jest pobudzeniem transkrypcji genu *ZC3H12A*, w następstwie czego wzrasta poziom mRNA genu oraz poziom produktu translacji tego mRNA czyli białka MCPIP1.

Starając się wyjaśnić mechanizm pobudzenia transkrypcji genu *ZC3H12A* w badanych komórkach przez MG-132 doktorant – biorąc pod uwagę złożoność regionu regulatorowego genu *ZC3H12A*, a także dane z piśmiennictwa wskazujące, że aktywacja transkrypcji niektórych genów pod wpływem inhibitorów proteasomu może zależeć od kilku ścieżek sygnałowych – blokował w komórkach HepG2 właściwymi inhibitorami szereg kluczowych aktywności, a następnie po traktowaniu komórek MG-132 przez 6 godzin (krótki czas ekspozycji na toksynę) badał zmiany w poziomie białka MCPIP1. Wynikiem doświadczenia było wykazanie, że zahamowanie aktywności ERK1/2 i kinazy p38 ogranicza wzrost poziomu białka MCPIP wywołany inkubacją komórek w obecności MG-132, natomiast taki efekt nie pojawiał się w przypadku stosowania inhibitora aktywności kinazy JNK i inhibitora kinazy fosforylującej inhibitorowe białko IκBα. Wynik doświadczenia wskazał, że za pobudzenie procesu transkrypcji genu *ZC3H12A* i wzrost poziomu białka MCPIP1 w komórkach HepG2 traktowanych inhibitorem proteasomu MG-132 odpowiedzialne są raczej sekwencje regulatorowe „cis” zlokalizowane przed genem, a nie wewnątrzgenowe sekwencje oddziałujące z czynnikiem NF-κB.

Na podstawie danych z piśmiennictwa można było jednak spodziewać się, że dłuższa inkubacja komórek z inhibitorem proteasomu (powyżej 6 godzin) może powodować degradację inhibitorowego białka IκBα, a tym samym uaktywnić czynnik transkrypcyjny NF-κB, co z kolei prowadziłoby do dalszego wzrostu poziomu białka MCPIP1. Istotnie, doktorant wykazał, że dłuższe (od 8 do 24 godzin) ekspozowanie komórek HeLa na MG-132 powodowało całkowity zanik IκBα. Zatem można było oczekiwać, że w warunkach wyeliminowania IκBα w komórkach poddanych dłuższemu działaniu MG-132 nastąpi wzrost aktywności czynnika NF-κB, tym bardziej, że w odrębnym doświadczeniu doktorant wykazał, że podjednostka p65 czynnika NF-κB ulega w warunkach doświadczenia aktywującej fosforylacji. Aby to sprawdzić, doktorant transfekował komórki wektorem ekspresyjnym, w którym gen wskaźnikowy SEAP włączył pod kontrolę fragmentu DNA zawierającego 4 uprzednio zidentyfikowane, uważane za element enhancerowy genu kodującego białko MCPIP1, sekwencje wiążące NF-κB, a następnie transfekowane komórki traktował MG-132. Wynik doświadczenia był jednak przeciwny do oczekiwanego, bowiem traktowanie komórek inhibitorem proteasomu MG-132 powodowało obniżanie się poziomu ekspresji transgenu.

Zatem zablokowanie, czy też raczej znaczne ograniczenie w komórkach HeLa funkcji proteasomu, powoduje wzrost poziomu białka MCPIP1 oraz degradację białka inhibitorowego IκBα, ale mimo to nie dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcji NF-κB. Przyczynę nieaktywności czynnika NF-κB doktorant upatruje w białku MCPIP, ponieważ wytłumienie ekspresji genu kodującego to białko powodowało wzrost aktywności wymienionych powyżej transgenów, w których gen wskaźnikowy znajduje się pod kontrolą czynnika transkrypcji NF-κB. Ostatecznie jednak, pytanie o mechanizm aktywacji genu MCPIP1 w komórkach HeLa poddanych działaniu MG-132 pozostaje nadal pytaniem otwartym.

Końcowym, niezwykle interesującym i ważnym elementem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie właściwości cytotoksycznych białka MCPIP1. To, że MCPIP1 wywiera na komórki efekt toksyczny nie było co prawda spostrzeżeniem nowym i zjawisko to opisano w szeregu pracach, niemniej, konieczne i oczywiste było zbadanie, w jakim stopniu nadekspresja MCPIP wpływa toksycznie na komórki HeLa i HepG2 będące przedmiotem badań doktoranta.

Wysoki poziom MCPIP1 wywołany transfekcją komórek wektorem zawierającym gen MCPIP1 pod kontrolą silnego, konstytywnie aktywnego promotora CMV okazał się nietoksyczny dla komórek HepG2, natomiast znacząco obniżał żywotność komórek HeLa. Toksyczny wpływ białka MCPIP1 na komórki HeLa doktorant potwierdził wykazując, że wytlumienie endogennej ekspresji genu *ZC3H12A* metodą interferencji RNA zwiększało ich przeżywalność w warunkach ekspozycji na MG-132. Wynik doświadczenia wskazywał, że ponieważ białko MCPIP1 jest dla komórek HeLa toksyczne, zatem zwiększanie przez MG-132 poziomu tego białka, jest istotną składową mechanizmu cytotoksycznego działania tego inhibitora proteasomu.

Opisane nieco wyżej doświadczenia sugerują, że współdziałanie MG-132 i białka MCPIP1 w efekcie cytotoksycznym wobec komórek HeLa najprawdopodobniej wynika stąd, że wzrost poziomu białka MCPIP1 indukowany ekspozycją komórek na MG-132 hamuje aktywność czynnika NF- κ B. Trudno jednak na razie bardziej szczegółowo opisać na gruncie molekularnym dalszy ciąg zdarzeń prowadzący do śmierci komórek.

Streszczone powyżej badania prowadzą doktoranta do dwóch zasadniczych wniosków wyrażonych w rozdziale „Wnioski i perspektywy”.

Pierwszy wynika z obserwacji, że region regulatorowy genu kodującego białko MCPIP1 zawiera sekwencje DNA rozpoznawane przez czynnik transkrypcji NF- κ B, a jednocześnie białko MCPIP1 jest inhibitorem czynnika transkrypcji NF- κ B. Na tej podstawie można sądzić, że czynniki zwiększające poziom transkrypcji genu kodującego MCPIP1 (niekoniecznie poprzez oddziaływanie NF- κ B, z sekwencjami regulatorowymi obecnymi w drugim intronie, ale także i te wykorzystujące inne sekwencje regulatorowe „cis”) mogą jednocześnie powodować represję transkrypcji tego genu. Innymi słowy silna odpowiedź na poziomie transkrypcji na czynniki aktywujące gen *ZC3H12A* jest, lub może być, w wyniku istnienia pętli negatywnego sprzężenia zwrotnego, czasowa.

Drugi wniosek wynika z badań zmian poziomu ekspresji genu i poziomu MCPIP1 oraz cytotoksycznych właściwości tego białka w komórkach, w których hamowana jest aktywność proteasomów. Na podstawie wyników badań doktorant sądzi, że o ile wzrost aktywności transkrypcyjnej genu kodującego MCPIP1 w sytuacji dysfunkcji proteasomów może być zjawiskiem uniwersalnym, to obserwowany cytotoksyczny efekt zwiększonego poziomu białka MCPIP1 wydaje się objawiać jedynie w stosunku do niektórych rodzajów komórek.

Oba wnioski dają mgr. Łukaszowi Skalniakowi podstawę do zaproponowania możliwego wykorzystania wiedzy uzyskanej w wyniku badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej do potencjalnych (ale raczej odległych) zastosowań praktycznych. Można istotnie sądzić, że w określonych stanach patologicznych, w tym także w odniesieniu do procesu nowotworowego, w których wytlumienie aktywności czynnika transkrypcji NF- κ B byłoby celowe usiłować podnosić poziom białka MCPIP1, aby ograniczać ekspresję tych genów, których produkty przyczyniają się do progresji choroby. Oczywiście, należy mieć na uwadze, że obecnie istnieje szereg innych metod tłumienia ekspresji genów i proponowana przez doktoranta strategia może być rozpatrywana raczej jako terapeutyczne działanie uzupełniające.

Praca doktorska mgr Łukasza Skalniaka ma standardową strukturę, ogólnie przyjętą dla rozpraw doktorskich i zawiera następujące rozdziały: „Spis treści” (3 strony); „Wykaz stosowanych skrótów” (3 strony); „Wstęp” (23 strony); „Cel pracy” (1 strona); „Materiały i metody” (14 stron); „Wyniki” (30 stron); „Dyskusja” (16 stron); „Wnioski i perspektywy” (1 strona); „Streszczenie” w języku angielskim (2 strony); „Streszczenie” w języku polskim (2 strony) oraz „Spis piśmiennictwa” (8 stron, 145 cytowań).

Praca napisana jest w języku angielskim, na tyle na ile mogę ocenić, bardzo poprawnym. Kilka drobnych i w gruncie rzeczy niezbyt istotnych, zauważonych przez mnie pomyłek to: brak w kilku wyrazach właściwych końcówek czasowników i liczby mnogiej rzeczownika (np., str. 12, str 13, 23), użycie litery y zamiast i (np. rybo... zamiast ribo...: np. str 23 i 27) oraz użycie rely (str.10) zamiast relies. Wydaje mi się również, że zamiast „basing” (str 10 i 21) powinno się użyć raczej „based”, a także zamiast „primers utilized” (str 33). powinno być raczej „primers used”.

Rozprawa doktorska mgr. Łukasza Skalniaka została wykonana z zastosowaniem rozbudowanej i złożonej metodyki i przygotowana na podstawie niezwykle obszernego materiału doświadczalnego. Mimo to, udało się doktorantowi przedstawić wyniki swoich złożonych i wielowątkowych badań bardzo czytelnie i w sposób dla recenzenta zrozumiały. Bez wątpienia na precyzję i jasność wypowiedzi wpłynął fakt, że większość wyników badań opisanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w dwóch pracach oryginalnych w czasopiśmie FEBS Journal (IF=3,8). Opublikowanie badań w tak renomowanym czasopiśmie, a więc także przejście ich przez solidny proces recenzyjny powoduje, że moja opinia jest już raczej formalnością.

Istotnie, trudno jest mieć zastrzeżenia do merytorycznej i metodycznej strony przedstawionej rozprawy doktorskiej. Ponadto w rozdziale „Dyskusja” oraz w rozdziale „Wnioski i perspektywy” doktorant ustosunkował się krytycznie do wyników własnej pracy konfrontując je z wynikami innych badaczy, ukazując także i wyjaśniając potencjalnym czytelnikom i recenzentom szereg problemów, co do których mogłyby pojawić się zapytania. Muszę wyrazić uznanie zarówno do naukowej, merytorycznej wartości pracy, jak i do sposobu jej zredagowania. Ponadto należy podkreślić profesjonalność doktoranta, rozległą wiedzę z zakresu przedmiotu badań, sprawność w posługiwaniu się licznymi, trudnymi metodami biologii molekularnej oraz jego krytyczny stosunek do wyników własnych badań.

Bez wątpienia, wyniki pracy doktorskiej mgr Łukasza Skalniaka kierują uwagę na konieczność prowadzenia rozleglejszych badań w celu poznawania funkcji białka MCPIP1 w komórkach nowotworowych. Szczególne znaczenie ma wyjaśnienie w jakim stopniu najważniejszy wynik badań doktoranta, a mianowicie wykazanie, że białko MCPIP1 może wzmacniać cytotoksyczne działanie MG-132, można odnieść do innych inhibitorów proteasomu, a w szczególności inhibitorów nowszej generacji (wykazujących mniejszą toksyczność ogólną), w tym inhibitorów mogących wykazywać pewną swoistość w stosunku do immunoproteasomów. Wyjaśnienie tego zagadnienia jest podstawą do realnego myślenia o potencjalnym terapeutycznym wykorzystaniu wykazanego przez doktoranta efektu.

Należy pamiętać, że obserwacje doktoranta poczynione zostały na komórkach HeLa i HepG2, a więc na komórkach nie wywodzących się z chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, w leczeniu których stosowane są obecnie inhibitory proteasomu. Ponieważ badania nad zastosowaniem inhibitorów proteasomu do leczenia innych nowotworów (których mikrośrodowisko zawiera najczęściej komponentę zapalną) znajdują się w zasadzie początkowej fazie badań klinicznych, zatem uwzględniając że białko MCPIP1 jest

modulatorem procesu zapalnego i jednocześnie mogłoby wzmacniać przeciwnowotworowe działanie inhibitorów proteasomu, otwiera się przed doktorantem i zainteresowanymi problematyką zainicjowaną przez doktoranta i zespół, w którym pracuje, niemal nieograniczone pole badań.

Nie mając istotnych zastrzeżeń do merytorycznej i metodycznej strony pracy doktorskiej mam jedynie drobne uwagi, a także chciałbym prosić doktoranta o wyjaśnienie kilku drobnych wątpliwości.

Strona tytułowa, także w tekście. Czy istnieje wymóg, aby przy: „Uniwersytet Jagielloński” dodawać Kraków. Ponadto: tytuł dr przy dr hab. w przypadku promotora jest napisany małą literą.

Str. 9, drugie zdanie: “Soon it became clear that NF- κ B presence is not restricted to B cells but that its DNA-binding properties are tightly regulated by NF- κ B inhibitor proteins”. Zdanie nie jest zbyt jasne, Tak jak gdyby wypadł jakiś fragment tekstu.

Str. 14. Czy rzeczywiście można sądzić, że rola ubikwityny jest pasywna?

Str 14. Odnośnie ligaz ubikwityny. Są ich raczej setki niż dziesiątki.

Str 37. Nie zauważyłem aby podana była wydajność transfekcji komórek siRNA. Nie wszędzie też, gdzie byłoby to istotne, zamieszczone są dane ilościowe dotyczące stopnia wytłumienia ekspresji genu kodującego MCPIP1 na poziomie mRNA i białka?

Str.37. Dwie cząsteczki siRNA były toksyczne dla komórek HeLa, ale nie wpływały na poziom MCPIP1. Czy wiadomo dlaczego były toksyczne?

Str 39. Przy opisie procedury wirowania bardziej informatywne jest podawanie g lub typu wirówki zamiast RCF.

Str. 49. Transfekcja komórek HepG2 stymulowanych IL-1 β . Poziom ekspresji transgenów znajdujących pod kontrolą fragmentów DNA poprzedzających miejsce inicjacji transkrypcji genu *ZC3H12A* nie różnił się od aktywności wektora pozbawionego sekwencji promotorowych. Czym istotnym różniły się warunki doświadczenia wykonanego w pracy doktorskiej od doświadczeń opisanych w pracy [Kasza i wsp. 2010], w której wykazano istnienie sekwencji regulatorowych w krótkim fragmencie DNA poprzedzającym miejsce inicjacji transkrypcji badanego genu?

Str. 57-58. Dlaczego na rycinie 9 pokazano efekt, jaki wywiera białko MCPIP1 pozbawione domeny PIN/DUB jedynie dla komórek HeLa, chociaż w głównym tekście jest informacja, że badano także komórki HepG2. Z drugiej strony, na rycinie 10, dokumentującej wynik doświadczenia merytorycznie łączącego się z doświadczeniem pokazanym na rycinie 9, pokazane są tylko wyniki otrzymane dla komórek HepG2.

Str.69. Komórki Hela po transfekcji siRNA hodowano 72 godziny. Czy transfekcja była jednorazowa czy powtórzona?

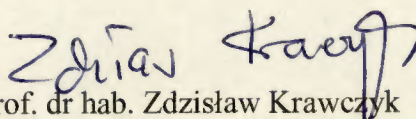
Str.89. Piąta linia od dołu: „MCPIPI significantly protects HeLa cells from death triggered by MG-132....”; natomiast 16 linia od dołu: “....down-regulation of MCPIP1 expression by siRNA provided a significant protection of HeLa cells against MG-132 toxicity...”. Chyba sprzeczność.

„Dyskusja” . W tym rozdziale mógłby się znaleźć (aczkolwiek niekoniecznie) chociaż niewielki fragment omawiający MCPIP1 i proteasomy w kontekście patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych.

Podsumowanie oceny.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Łukasza Skalniaka jest pracą o wyjątkowej wartości merytorycznej. Należy podkreślić, że badania opisane w pracy doktorskiej rozpoczęto niedługo po wykryciu genu *ZC3H12A*, a więc w czasie kiedy danych o mechanizmie ekspresji tego genu było niewiele, a także równie niewiele było wiadomo o zróżnicowanej komórkowo ekspresji tego genu. Wyniki badań opisanych w pracy doktorskiej i przedstawione środowisku naukowemu we wspomnianych wyżej publikacjach, stanowią niezaprzeczalnie ważne poszerzenie wiedzy o właściwościach genu i białka MCPIP1. Ponieważ praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim wyszczególnione w ustawie o zmianie ustawy o stopniach naukowych, wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktoranta Łukasza Skalniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką naukową wartość badań oraz to, że większość danych opisanych w pracy doktorskiej została opublikowana w dwóch pracach oryginalnych, w czasopiśmie zaliczanych do czasopism renomowanych, a najważniejsze wnioski zawarte zostały także w opublikowanej w anglojęzycznym czasopiśmie pracy przeglądowej, której doktorant jest współautorem, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Gliwice, 16 maja, 2013.


Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk