ICHB PAN
POZNAŃ

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 24.08.2017

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Błaszczyk

Tytuł rozprawy: Characterisation and biological significance of STAT2-dependent but STAT1-independent type I interferon-mediated transcriptional response
(Charakterystyka i biologiczne znaczenie odpowiedzi transkrypcyjnej indukowanej interferonem typu I i zależnej od STAT2, lecz niezależnej od STAT1)

Promotor: Prof. Johannes A.R. Bluyssen

Rozprawa doktorska Pani Magister Katarzyny Błaszczyk poświęcona została badaniom indukowanej przez interferon (IFN), nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Stanowi ona pierwszą reakcję na atak patogenu i często prowadzi do jego całkowitej eliminacji. Stymulowane IFN mechanizmy obronne wyewoluowały u zwierząt dopiero podczas specjacji kręgowców. Oprócz IFN podstawowymi czynnikami zaangażowanymi w ich uruchomienie są: (i) receptory IFN, czyli białka transbłonowe wiążące interferon (ii) połączone z receptorami interferonu kinazy (ang. *Janus kinase*; JAK1, JAK2, TYK2) odpowiedzialne za inicjację procesów wewnątrzkomórkowych (iii) białka STAT1 i STAT2 (ang. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) będące zarówno przekaźnikami sygnału jak i aktywatorami transkrypcji oraz (iv) białko IRF9 (ang. *Interferon Regulatory Factor 9*), które razem z białkami STAT1 i STAT2 tworzy kompleks ISGF3 (ang. *Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) funkcjonujący jako czynnik transkrypcyjny (kompleks STAT1/STAT2/IRF9). Analogicznym czynnikiem transkrypcyjnym, rozpoznającym inną sekwencję w promotorze genów stymulowanych przez IFN, jest białko STAT1 (homodimer STAT1/STAT1).

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03 sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32 e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
www.ibch.poznan.pl

Recenzowana rozprawa stanowi fragment wielowątkowych badań, które od szeregu już lat prowadzone są pod kierunkiem Profesora Johannesa Bluyssena w Zakładzie Genetyki Molekularnej Człowieka na Wydziale Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Spośród niezwykle szerokiego i różnorodnego spektrum procesów oraz czynników zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych składających się u człowieka na tzw. odporność wrodzoną, grupa prof. Bluyssena w sposób szczególny zainteresowana jest mechanizmami obronnymi modulowanymi przez IFN. W przypadku omawianej pracy podstawowym obiektem zainteresowania Doktorantki stała się stymulowana przez interferon typu I (IFNα) reakcja obronna niezależna od białka STAT1. Wcześniejsze doniesienia literaturowe świadczyły bowiem, że obok dwóch znanych już ścieżek tj. zależnej od obu białek STAT, oraz zależnej tylko od białka STAT1, występować może także trzecia ścieżka zależna jedynie od STAT2. Biorąc pod uwagę ogromną złożoność tak zarysowanego zagadnienia, zaprezentowane w pracy badania zostały ograniczone do etapu, podczas którego indukowana jest transkrypcja genów zaangażowanych w zależną od IFNα reakcję obronną.

Ocena formalna rozprawy

Praca napisana została w języku angielskim. Jej formalna strona nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny, co oznacza, że Autorka wyróżniła w niej szereg typowych dla tego typu dzieł rozdziałów, w sumie jest ich aż 16 (Introduction, Objectives and Scope of the Thesis, Methodology, 2fTGH, ST2-U3C vs. 2fTGH, NB4 vs. ST2-U3C and 2fTGH, Discussion, Literature, List of Figures, List of Tables, Important Abbreviations, Acknowledgments, Streszczenie w języku polskim, Supplementary Figures, List of Publications, Funding). Pomimo że zastosowany schemat podziału pracy jest jak już wspomniałem tradycyjny, jednak sposób w jaki jego dokonano budzi nieco wątpliwości. Po pierwsze, „Methodology" (metodologia) to nauka o metodach badań naukowych i o sposobach przeprowadzania analiz oraz oceniania wartości poznawczej poszczególnych dyscyplin naukowych. W tym przypadku właściwsze jest użycie słowa „Methods", czyli metody. Po drugie, opis zastosowanych linii komórkowych chyba lepiej byłoby umieścić w osobnym rozdziale zatytułowanym „Materials" (materiały), wraz z krótkim opisem wszystkich zastosowanych materiałów. Po trzecie, w pracy nie wyodrębniono rozdziału „Results", przez co w spisie treści pojawiają się niewiele mówiące tytuły: 2fTGH, ST2-U3C vs. 2fTGH, NB4 vs. ST2-U3C and 2fTGH, skompilowane z nazw linii komórkowych. Dodatkowo do rozprawy dołączono płytę CD zawierającą materiały uzupełniające. W takie sytuacji warto zamieścić w pracy także i wykaz załączników.

Praca napisana jest starannie, jasno i zwięźle z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Dostrzegłem w niej stosunkowo niewielką liczbę błędów stylistycznych i edytorskich. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, iż zajmujące dużą część rozprawy, rozważania dotyczące analiz bioinformatycznych danych mikromacierzowych oraz danych z masowego sekwencjonowania (NGS) przedstawione zostały w sposób dostępny dla szerokiego grona czytelników. Piszę o tym, gdyż często spotkać można prace z pogranicza biologii i bioinformatyki, których język jest niezwykle hermetyczny, by nie powiedzieć żargonowy.

Niewielkie wątpliwości natury formalnej budzić może sposób w jaki wprowadzane są w rozprawie niektóre skrócone nazwy. Często pojawiają się one dopiero po kilkukrotnym użyciu pełnej nazwy, dodatkowo te same skróty wprowadzane są dwu- lub trzykrotnie co sprawia wrażenie, że poszczególne rozdziały stanowią niezależne prace. Wrażenie to dodatkowo wzmacniają występujące w pracy powtórzenia pewnych fragmentów Wstępu w rozdziałach prezentujących wyniki badań np. początek Rozdziału 4.

Ocena merytoryczna rozprawy

Analiza zawartości merytorycznej pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Błaszczyk pozwala wyróżnić w niej cztery zasadnicze części. Pierwszą z nich jest Wstęp (Rozdział I), w którym Autorka omówiła podstawowe zagadnienia związane z wczesną odpowiedzią immunologiczną indukowaną IFNα. Przedstawiła poszczególne białka zaangażowane w ten proces oraz mechanizmy nim sterujące. Uważam, iż rozdział ten spełnia swoją zasadniczą funkcję, stanowi bowiem bogate źródło informacji koniecznych do zrozumienia zagadnień prezentowanych w dalszej części pracy.

Drugą istotną część rozprawy stanowi rozdział, w którym określone zostały cele oraz zakres badań. Pierwsze przedstawione zostały w 5 punktach. W przypadku dwóch, pierwszego i czwartego, pewne wątpliwości budzić może sposób ich sprecyzowania. Sądzę bowiem, iż celem pracy nie powinna być analiza czy porównanie, lecz raczej wynik, do którego mogą one doprowadzić. Nie bardzo rozumiem także powodów, dla których w rozdziale tym zamieszczone zostało swoiste streszczenie rozprawy. Co więcej, streszczenie to odnosi się do bliżej nieokreślonych rozdziałów nie mających swoich odpowiedników w pracy.

Trzecią i czwartą istotną część pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki badań. Po dokładnym zapoznaniu się z nimi mogę stwierdzić, iż Doktorantka bardzo sprawnie poradziła sobie z realizacją wyznaczonych wcześniej celów.

Aby je osiągnąć wyselekcjonowała trzy linie komórkowe a następnie ustaliła: (i) jak zmienia się w nich poziom akumulacji białek regulujących indukowaną przez IFNα ekspresję genów (STAT1, STAT2 w formie fosforylowanej i niefosforylowanej oraz IRF9), (ii) jakie geny są indukowane przez IFNα, (iii) czy w obrębie promotorów indukowanych genów występują sekwencje wiążące kompleks ISGF3 (motywy ISRE, GAS) lub kompleks STAT2/IRF9 (motyw ISRE) powstający pod nieobecność STAT1, (iv) do jakich genów oraz regionów międzygenowych przyłączają się wymienione wcześniej kompleksy, (v) czy indukowana INFα odpowiedź ma charakter przejściowy czy długotrwały. Analizy ekspresji genów przeprowadzone zostały przy użyciu mikromacierzy a ich wyniki potwierdzone na przykładzie kilku genów metodą qPCR. Miejsca wiązania kompleksów ISGF3 oraz STAT2/IRF9 do chromatyny zidentyfikowano metodą ChIP-Seq. Dane pozyskane w eksperymentach mikromacierzowych oraz ChIP-Seq analizowano z użyciem standardowych metod bioinformatycznych i statystycznych. Uznawano, że gen jest indukowany IFNα jeżeli poziom jego ekspresji zwiększał się co najmniej dwukrotnie. W miejscu tym chciałbym prosić o wyjaśnienie czy co najmniej dwukrotny wzrost obserwowany był we wszystkich powtórzeniach oraz czy wystarczało, że dwukrotny wzrost stwierdzano dla jednego tylko czasu traktowania komórek IFNα. Aby porównać efekty wywoływane przez interferon we wszystkich trzech analizowanych układach, uzyskane wyniki poddano analizom wyższego rzędu (Ontologia Genów, grupowanie hierarchiczne). Niestety w pracy nie znalazłem informacji czy grupowanie hierarchiczne było nadzorowane czy nienadzorowane.

Kluczowym elementem przeprowadzonych badań był właściwy wybór linii komórkowych zastosowanych w analizach indukowanej interferonem odpowiedzi immunologicznej. Jako pierwsza wybrana została linia 2fTGH, szeroko stosowana w badaniach odpowiedzi indukowanej przez interferon typu I. Linia ta wywodzi się z nowotworu złośliwego tkanek miękkich zwanego włókniakomięsakiem. W dalszych badaniach linia ta traktowana była jako referencyjna. Drugą zastosowaną linią komórkową była U3C nie posiadająca funkcjonalnego genu STST1 (KO) i wywodząca się z tej samej linii co 2fTGH. Dodatkowo uzyskano dwa mutanty U3C z podwyższoną ekspresją STAT2. W pierwszym ST2-U3Ca poziom mRNA STAT2 był 30 krotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych a w ST2-U3C wzrastał on aż 60 krotnie. Linii tej użyto by stwierdzić czy pod nieobecność STAT1 indukowane będą geny związane z reakcją na IFNα. Trzecia zastosowana linia komórkowa N4B wywodzi się z białaczki promielocytarnej i charakteryzuje się specyficznym profilem ekspresji genów STAT1, STAT2 i IRF9. W

komórkach tych występuje wysoki poziom STAT1 i STAT2 jednak aktywna, fosforylowana forma STAT2 pojawia się jedynie w pierwszej godzinie indukcji IFNα. Stąd linia ta nadaję się do badań aktywności kompleksu STAT2/IRF9 w obecności STAT1.

W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka ustaliła, że IFNα indukuje ekspresję około 470 genów w komórkach 2fTGH. Potwierdziła, że kompleks ISGF3 łączy się do sekwencji ISRE obecnych w promotorach indukowanych genów. W przypadku większości genów indukcja miała charakter przejściowy. Doktorantka zidentyfikowała jednak również geny ulegające długotrwałej ekspresji. Na tej podstawie założyła, iż istnieją różne mechanizmy indukowanej przez IFNα ekspresji genów. Stosując linie ST2-U3C i ST2-U3Ca stwierdziła, że w komórkach pozbawionych STAT1, IFNα może indukować podobną odpowiedź transkrypcyjną jak w komórkach 2fTGH. Zasugerowała, że odpowiedzialny za to jest kompleks STAT2/IRF9, który wiązał się do tych samych motywów ISRE, co kompleks ISGF3. Co ciekawe, odpowiedź interferonowa indukowana w komórkach ST2-U3C i ST2-U3Ca była opóźniona i miała bardziej długotrwały charakter. Na podstawie powyższych obserwacji Autorka sformułowała hipotezę, zgodnie z którą kompleks STAT2/IRF9 może nie tylko zastępować kompleks ISGF3 ale też pełnić odmienne od niego funkcje. Pogląd ten wydają się potwierdzać analizy ekspresji genów indukowanych przez IFNα w komórkach NB4. Równocześnie jednak wskazują one na istnienie innych mechanizmów regulujących odpowiedź komórki na stymulację interferonem. Przedstawione powyżej rezultaty badań zostały bardzo szeroko i wszechstronnie przedyskutowane w Rozdziale 7. Przedstawiono w nim prawdopodobne modele funkcjonowania oraz regulacji odpowiedzi indukowanej przez INFα i niezależnej od STAT1.

Pod względem metodycznym praca wykonana została bardzo starannie. Poszczególne eksperymenty zostały dobrze zaplanowane z należytą dbałością o wszelkiego typu kontrole. Analizy bioinformatyczne przeprowadzone zostały zgodnie z powszechnie stosowanymi standardami. Za szczególnie istotne wyniki uznałbym dwa: pierwszy ukazujący, że kompleks STAT2/IRF9, podobnie jak kompleks ISGF3, może pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego wiążącego się do sekwencji ISRE obecnej w promotorach genów zaangażowanych we wczesną odpowiedź obronną, oraz drugi dowodzący, iż kompleksy ISGF3 oraz STAT2/IRF9 mogą w odmienny sposób indukować ekspresję genów stymulowanych interferonem. Oczywiście w rozprawie znaleźć można szereg innych ciekawych obserwacji jednak z reguły są one niezwykle trudne do jednoznacznej interpretacji. Należy bowiem pamiętać, że analizowane procesy stanowią ważny, acz stosunkowo niewielki fragment całokształtu

zjawisk składających się na odpowiedź interferonową. Nie ulega zatem wątpliwości, że mechanizmy regulujące tę odpowiedź obejmują wszystkie poziomy procesu ekspresji genów a nie tylko transkrypcję. Stąd większość eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej badań odpowiadając na jedno pytanie zmuszało do zadania kolejnych, często daleko wychodzących poza ramy niniejszej rozprawy. W rezultacie praca zawiera wiele nowych informacji stanowiących fundament, na którym budować można zarówno szereg nowych, interesujących projektów badawczych jak i trudnych do zweryfikowania hipotez prezentowanych w Rozdziale 7.

W tym kontekście chciałbym prosić Autorkę pracy o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- czy kompleks STAT2/IRF9 rzeczywiście reguluje odpowiedź interferonową w warunkach *in vivo*. Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie wydają się wspierać ten pogląd, jednak uzyskano je stosując komórki z nienaturalnie wysoką ekspresją genu STAT2. Czy obserwowany efekt nie był po prostu wymuszony nadmiarem STAT2.
- dlaczego w swojej pracy zdecydowała się wykorzystać mikromacierze. Zastosowanie masowego sekwencjonowania transkryptomu dostarczyłoby więcej informacji np. dotyczących udziału niekodujących RNA (miRNA, lncRNA) lub transkrypcji obszarów międzygenowych, w obrębie których wiążą się czynniki transkrypcyjne ISGF3 oraz STAT2/IRF9.
- czy w pobliżu miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych ISGF3 oraz STAT2/IRF9 do regionów międzygenowych występują sekwencje kodujące lncRNA lub miRNA.

Wnioski końcowe

Wymienione tutaj drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na wysoką ocenę pracy. Stanowi ona zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autorka jest sprawnym i utalentowanym badaczem posiadającym szeroką i ugruntowaną wiedzę. Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr Katarzyny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu.

Marek Figlerowicz