

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Jennifer Mytych
pt.: "Poszukiwanie nowych właściwości białka klotho w zwalczaniu zakażeń
bakteryjnych"

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Jennifer Mytych została wykonana w Katedrze Fizjologii i Rozrodu Zwierząt Pozawydziałowego Instytutu Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Koziorowskiego oraz promotora pomocniczego – dr Marii Romerowicz-Misielak. Na rozprawę doktorską składają się trzy – niżej wyszczególnione – prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 10,575, a punktacja wg MNiSW – 95. Oto publikacje Doktorantki, wchodzące w skład dorobku naukowego przedłożonego w ramach ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych.

1. **Mytych, J.**, Romerowicz-Misielak M., Koziorowski M. 2017. Long-term culture with lipopolysaccharide induces dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects in THP-1 monocytes. *Toxicol. in Vitro*; 42, 1-9.
2. **Mytych J.**, Romerowicz-Misielak M., Koziorowski M. 2017. Klotho protects human monocytes from LPS-induced immune impairment associated with immuno-senescence-like phenotype. *Mol. Cell Endocrinol.*; doi: 10.1016/j.mce.2017.05.003.
3. **Mytych J.**, Wos, I., Solek, P., Koziorowski, M. 2017. Protective role of klotho protein on epithelial cells upon co-culture with activated or senescent monocytes. *Exp. Cell Res.*; 350, 358-367.

We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest również autorem korespondencyjnym. Badania przedstawione w tych pracach były finansowane ze środków budżetowych na naukę jako projekt badawczy w ramach programu MNiSW pod nazwą "Diamentowy Grant". Rozprawa doktorska mgr inż. Jennifer Mytych, oprócz kopii ww. publikacji, zawiera *Autoreferat*, obejmujący: *Streszczenia* pracy w języku polskim i angielskim, dane dotyczące wykształcenia i zatrudnienia (jako asystent naukowy w Katedrze Fizjologii i Rozrodu Zwierząt Pozawydziałowego Instytutu Biotechnologii UR, wykaz publikacji stanowiących Jej osiągnięcie badawcze, a następnie – merytoryczne *Wprowadzenie* do podjętego problemu badawczego, *Założenia i cele pracy* oraz *Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy* i spis cytowanej *Literatury*, a wcześniej – *Wykaz stosowanych skrótów*. Ponadto, Doktorantka przedstawia pozostałe własne osiągnięcia naukowo-badawcze; spis publikacji naukowych i doniesień konferencyjnych, odbyte staże naukowe oraz uczestnictwo w projektach badawczych, jak również oświadczenia mówiące o procentowym wkładzie Doktorantki w powstanie prezentowanych prac, które zostały potwierdzone przez współautorów.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oceniana rozprawa doktorska jest poświęcona wyjaśnieniu roli białka klotho w regulacji funkcjonowania monocytów, które pełnią ważną rolę w zwalczaniu patogenów bakteryjnych. Wykazują one zdolność przemieszczania się w kierunku ogniska zapalnego (chemotaksji) oraz rozpoznawania konserwatywnych wzorców na powierzchni patogenów (ang. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP) przy pomocy specyficznych receptorów (ang. *pattern recognition receptors*, PRR). Powyższa interakcja uruchamia proces fagocytozy, prowadzący do unieszkodliwienia patogenów oraz enzymatycznej degradacji antygenów do pojedynczych peptydów, które mogą być prezentowane limfocytom Th za pośrednictwem białek głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) klasy II. Aktywacja monocytów prowadzi także do wzmożonej sekrecji cytokin prozapalnych, które są niezbędne do wszczęcia i rozwoju skutecznej reakcji zapalnej. Jednakże, po zniszczeniu patogenów, zmienia się profil wydzielanych cytokin i dochodzi do uruchomienia reakcji przeciwzapalnej, w wyniku której aktywowane monocyty ulegają apoptozie. Zmiany w fenotypie i funkcjonowaniu monocytów, zachodzące podczas rozwoju a następnie wygaszania reakcji zapalnej, mają duże znaczenie dla zachowania równowagi w działaniu układu immunologicznego. Mechanizmy regulujące sposób i zakres zaangażowania monocytów w reakcję zapalną są złożone i nie do końca poznane. Wydaje się, że istotnym elementem tego mechanizmu może być białko klotho, wykazujące m.in. właściwości przeciwzapalne. Białko to jest kodowane przez gen *Klotho* (KL), który został zidentyfikowany u myszy w roku 1997, a jego inaktywacja spowodowała wystąpienie zmian charakterystycznych dla procesu starzenia. Wyróżnia się dwie formy białka klotho – transbłonową i sekrecyjną. Forma transbłonowa funkcjonuje jako koreceptor czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF23) i bierze udział w regulacji homeostazy fosforanowej oraz metabolizmu witaminy D. Z kolei forma sekrecyjna funkcjonuje jako czynnik humoralny o różnorodnym wpływie na procesy wewnątrzkomórkowe; m.in. reguluje aktywność kanałów jonowych, transporterów błonowych, homeostazę jonów wapnia, moduluje aktywację receptorów czynników wzrostowych i działanie szlaku insuliny/insulinopodobnego czynnika wzrostu. Właściwości przeciwzapalne białka klotho m.in. wynikają z jego hamującego oddziaływania na ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF-κB oraz cząsteczek adhezyjnych na powierzchni monocytów, jak również z blokowania aktywacji receptora czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*, TNFα). Zatem, problem badawczy podjęty w pracach stanowiących rozprawę doktorską mgr inż. J. Mytych jest aktualny, niezwykle atrakcyjny i bardzo ważny z poznawczego, jak również medycznego punktu widzenia, ponieważ dotyczy uwarunkowań prawidłowego przebiegu reakcji zapalnej, którego zaburzenie może prowadzić do poważnych komplikacji zdrowotnych. W ramach pracy doktorskiej, Doktorantka wyznaczyła sobie następujące, ogólnie sformułowane, cele badawcze:

- określenie możliwości inicjacji procesu przedwczesnego starzenia w komórkach monocytarnych w wyniku działania antygenów bakteryjnych;
- określenie efektów oddziaływania aktywnych i podlegających procesowi przedwczesnego starzenia monocytów na komórki epitelialne;
- określenie roli białka klotho w powyższych procesach.

Powyższe cele zostały doprecyzowane w załączonych publikacjach, które stanowią rozprawę doktorską. W pierwszej z nich, Doktorantka zmierzała do określenia wewnątrzkomórkowych

mechanizmów odpowiedzi monocytów linii komórkowej THP-1 (ludzka linia białaczki monocytarnej) na stymulację lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS), stosowanym w różnych stężeniach (0.5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 168 godzin), z uwzględnieniem wskazania możliwości aktywacji szlaku przedwczesnego starzenia komórkowego (immunosenescencji). Celem kolejnej pracy było sprawdzenie czy białko klotho, posiadające przeciwstarzeniowe i przeciwzapalne właściwości, może zabezpieczać monocyty przed indukcją immunosenescencji. Celem kolejnej pracy, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, było zbadanie wpływu monocytów, aktywowanych i podlegających procesowi immunosenescencji na komórki nienależące bezpośrednio do układu immunologicznego, tj. komórki epitelialne HeLa, z uwzględnieniem roli białka klotho w tym oddziaływaniu. Realizacja tak ambitnych zadań badawczych wymagała bardzo dobrego przygotowania metodycznego. W przeprowadzonych badaniach, Doktorantka wykorzystwała liczne, złożone i pracochłonne procedury doświadczalne, m.in. takie jak: hodowle *in vitro* badanych komórek (THP-1, HL-60 oraz THP-1 w kokulturze z HeLa), transfekcja badanych komórek (THP-1, HL-60 i HeLa) plazmidami z genem białka klotho, analiza ekspresji wielu genów przy użyciu techniki Real-Time PCR, oznaczanie białek przy pomocy Western-blot lub testu ELISA, analiza reaktywnych form tlenu (ROS) oraz tlenku azotu (NO), oznaczanie stężenia jonów Ca^{2+} i Zn^{2+} , ocena występowania fagocytozy i fragmentacji DNA. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzenie indukcji ekspresji białka klotho przy użyciu dwóch metod; transfekcji komórek plazmidami niosącymi gen jego formy sekrecyjnej lub membranowej oraz chemicznej stymulacji za pomocą związków kalcytriolu (aktywnej formy witaminy D3) i kandesartanu (antagonisty receptora angiotensyny II). Ważna dla opisu zmian zachodzących w monocytach (THP-1) była analiza wielu czynników powiązanych z ich funkcjonowaniem, poza wcześniej wspomnianymi m.in. takich jak: czynnik transkrypcyjny NF- κB , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, białka p16, 21 i 27, insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I) i jego receptor (IGF-IR β), metaloproteinaza macierzowa 2 (MMP-2), antyapoptotyczne białko Bcl2 i kaspaza 3, białka wiążące telomery – TRF1 i TRF2 (zaangażowane w ochronę DNA i telomerów) oraz MHC II, CD86 i CD 62.

Przeprowadzenie powyższych badań m.in. pozwoliło wykazać, że:

- 1) długotrwała (7-dniowa) ekspozycja monocytów (THP-1) *in vitro* na działanie LPS wywołuje w nich różne zmiany, zależnie od stężenia tego antygeny bakteryjnego w medium inkubacyjnym;
 - a) niskie dawki LPS ($\leq 5 \mu\text{g/ml}$) wywołują stres oksydacyjny, aktywację szlaku – zależnego od białka p21 – odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response*, DDR), nieodwracalne zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 i rozwój tak zwanego fenotypu sekrecyjnego monocytów THP-1, związanego z procesem starzenia (ang. *senescence associated secretory phenotype*, SASP), który charakteryzuje się aktywacją czynnika NF- κB i zwiększoną syntezą cytokin prozapalnych oraz ekspresją metaloproteinazy macierzowej 2 (MMP-2),
 - b) z kolei, wysokie dawki LPS ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$) wywołują apoptozę poprzez uruchomienie szlaku wewnątrzpochoďnego (w wyniku uszkodzenia mitochondriów) jak i zewnątrzpochoďnego (poprzez stymulację receptorów śmierci), aktywację szlaku odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA (DDR) zależną od białka p21, mediowaną przez ROS i TNF α oraz różnicowanie monocytów do makrofagów;

- 2) doświadczalnie podwyższona ekspresja białka klotho w monocytach THP-1 traktowanych LPS powoduje obniżenie poziomu ROS/RNS i syntezy cytokin prozapalnych, a wzrost sekrecji cytokiny przeciwzapalnej – IL-10, a także zmniejszenie stopnia uszkodzenia DNA, co umożliwia im podjęcie prawidłowych funkcji;
- 3) kokultura aktywowanych jak i przedwcześnie starzejących się monocytów z komórkami epitelialnymi HeLa prowadzi do inicjacji procesu starzenia w komórkach HeLa, który m.in. objawia się występowaniem w nich zaburzeń równowagi redoks i zwiększoną generacją ROS, aktywacją czynnika NF- κ B, pojawieniem się uszkodzeń DNA oraz aktywacją szlaków indukowanych przez uszkodzenia DNA, zależnych od białek p16, p21 i p27, jak również blokowaniem cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Z kolei indukcja ekspresji białka klotho w komórkach HeLa zabezpiecza je przed kaskadą niekorzystnych zmian wywołanych przez obecne w kokulturze aktywowane lub przedwcześnie starzejące się monocyty.

Co ciekawe, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy efektami indukowanej ekspresji sekrecyjnej i membranowej formy białka klotho w badanych komórkach. Autorka wysuwa – moim zdaniem uzasadnioną – sugestię, że w przypadku komórek epitelialnych może to być spowodowane ich zwiększoną aktywnością proteolityczną (obecność proteaz ADAM), w wyniku której następuje rozkład części zewnątrzkomórkowej formy błonowej tego białka. Pragnę dodać, iż bardzo pozytywnie oceniam syntetyczne i przejrzyste przedstawienie w *Autoreferacie* poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Jennifer Mytych.

Reasumując, na szczególne wyróżnienie w ocenianej rozprawie doktorskiej zasługuje wykazanie właściwości ochronnych białka klotho na poziomie komórkowym w stosunku do monocytów podlegających procesowi przedwczesnego starzenia jak i w stosunku do innych komórek (ściśle współpracujących z układem odpornościowym) – narażonych na niekorzystne oddziaływanie monocytów podlegających takim zmianom. Przedstawione przez Doktorantkę wyniki wskazują potencjalne kierunki dalszych poszukiwań, zmierzających do przeciwdziałania zaburzeniom reakcji odpornościowych powstających na tle niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu monocytów pod wpływem antygenów bakteryjnych.

UWAGI I PYTANIA

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Jennifer Mytych były wcześniej pozytywnie ocenione przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje wysoko notowanych czasopism naukowych. Z pewnością przeszły one bardzo skrupulatnie prowadzony proces wydawniczy. W związku z tym nie mam uwag krytycznych do ich formy i treści. Pozwolę sobie jednak na kilka uwag/pytań dotyczących opracowania *Autoreferatu* lub ogólnie tematu rozprawy.

1. W *Autoreferacie* przedstawiono założenia i cele pracy (str. 13). W tej części *Autoreferatu* powinna być także uwzględniona hipoteza badawcza.
2. Wskazane byłoby dokonać zbiorczego podsumowania badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej i przedstawionych w formie trzech, tematycznie ze sobą powiązanych publikacji. Być może pozwoliłoby to na sformułowanie dodatkowych wniosków.
3. W przeprowadzonych badaniach wykazano ekspresję mRNA i białka klotho w monocytach linii komórkowej THP-1. Czy znany jest poziom ekspresji tego

mRNA/białka w monocytach krwi krążącej człowieka lub zwierząt. Jeśli tak, czy podlega on zmianom związanym z wiekiem?

4. U ludzi i zwierząt procesy starzenia organizmu ulegają przyspieszeniu po wypełnieniu funkcji rozrodczych, co wiąże się z znacznym obniżeniem produkcji steroidów płciowych. Co Pani sądzi o potencjalnym wpływie tych hormonów na ekspresję genu *Kloto* w komórkach organizmu?

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Jennifer Mytych, na którą składają się trzy prace opublikowane w czasopismach o wysokim sumarycznym współczynniku oddziaływania (IF = 10,575) i wysokiej punktacji MNiSW (95), zawiera liczne i bardzo wartościowe wyniki badań, które wnoszą nowe informacje na temat możliwości oddziaływania białka klotho na funkcjonowanie monocytów ekspozowanych na działanie antygenów bakteryjnych, jak również na interakcje monocytów (zachodzące w takich warunkach) z komórkami nienależącymi do układu odpornościowego. Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują kierunki dalszych badań nad możliwością korygowania zaburzeń w przebiegu reakcji odpornościowych wywołanych niekorzystnymi zmianami w funkcjonowaniu monocytów. Przeprowadzenie przez Doktorantkę tak kompleksowych i rozległych badań wymagało od Niej nie tylko dużego zaangażowania w pracę laboratoryjną, ale również dobrego zapoznania się z obszernym piśmiennictwem z zakresu podjętej problematyki badawczej. Na podstawie lektury prac przedstawionych jako rozprawa doktorska, jestem przekonany o wysokich kompetencjach badawczych Doktorantki. W przekonaniu tym dodatkowo utwierdza mnie Jej dorobek publikacyjny, który obejmuje 9 prac naukowych i 8 doniesień konferencyjnych oraz udział w realizacji trzech projektów badawczych, w tym pełnienie funkcji kierownika jednego z nich, jak również odbycie dwóch krótkoterminowych staży w zagranicznych placówkach badawczych.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **"Poszukiwanie nowych właściwości białka klotho w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych"** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Jennifer Mytych do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy ocenianej rozprawy, prężność przedstawionych w niej badań i opublikowanie prac wchodzących w jej skład w wysoko notowanych czasopismach naukowych, przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie pracy.

Olsztyn 20.09.2017 r.



Stanisław Okrasa