

[logo o treści] NIH

Amerykański Krajowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych (NIAID)

LABORATORIA ROCKY MOUNTAIN LABORATORIES

Pracownia Zakażeń Neurologicznych i Odporności

Wydział ds. Odporności Wrodzonej i Patogenezy

Dr Sonja Best

Dyrektor Pracowni Zakażeń Neurologicznych i Odporności

Starszy Pracownik Badawczy

Kierownik Wydziału ds. Odporności Wrodzonej i Patogenezy

Rocky Mountain Laboratories, NIAID/NIH

Hamilton MT USA 59840

Data: 9 sierpnia 2022 r.

Sprawozdanie dotyczące rozprawy doktorskiej autorstwa:

Magdaleny Nizioł

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Przegląd:

Prolidaza (PEPD) jest wszechobecną proteazą, ale jest wyjątkowa, ponieważ jej aktywność enzymatyczna jest wysoce specyficzna dla dipeptydów zawierających prolinę (Pro) lub hydroksyprolinę (HyP). Uznaje się, że PEPD odgrywa ważną rolę w homeostazie komórkowej, a polimorfizmy genetyczne są przyczyną chorób u ludzi rozpoznawanych klinicznie przez imidodipeptydurię, przewlekłe rany skóry, zwłaszcza kończyn dolnych, oraz wpływ na odporność, w tym zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne. Zidentyfikowano specyficzne defekty funkcji komórkowych i metabolizmu kolagenu związane z utratą ekspresji PEPD, ale pozostają krytyczne pytania, w tym rola (role) wydzielanej PEPD, a także zależne od enzymów i niezależne od enzymów funkcje PEPD w sygnalizacji komórkowej.

Obecna praca bada hipotezę, że interakcja zewnątrzkomórkowej PEPD z naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGFR) jest ważnym wyznacznikiem proliferacji i migracji komórek, a zatem jest bezpośrednim motorem gojenia się ran. Główne ustalenia są następujące:

903 S. 4th St., Hamilton, MT 59840

Tel. 406-375-9694

Faks: 406-375-9620

E-mail: SBEST@niaid.nih.gov


Robert Filipowicz

- a) W warunkach mechanicznego uszkodzenia komórek i zależnej od IL-1b stymulacji w skórze, hodowla keratynocytów unieśmiertelnionych przez HaCaT została wykorzystana do określenia roli traktowania zewnątrzkomórkowego z PEPD. Po zdrapaniu monowarstwy komórkowej, proliferacja modelu keratynocytów wzrosła z dodatkiem PEPD, chociaż nie w sposób zależny od dawki.
- b) Inhibitor PI3K LY294002 hamował indukowaną przez PEPD regulację w górę markerów proliferacji komórkowej, PI3K, Akt i mTOR oraz zmniejszał proliferację komórek, wykazując, że PI3K jest efektem wydzielanej sygnalizacji zależnej od PEPD.
- c) PEPD symulował biosyntezę kolagenu w sposób zależny od stężenia w komórkach nieuszkodzonych, ale efekt ten był większy w modelu rany. Co ciekawe, traktowanie pozakomórkową PEPD zmniejszyło podstawową ekspresję NF-kB, który jest znanym inhibitorem biosyntezy kolagenu.
- d) Co ciekawe, traktowanie pozakomórkową PEPD nie wpłynęło na proliferację komórek HaCaT w warunkach podstawowych, ale miało wpływ w warunkach traktowania przy użyciu IL-1b. Zbadano wpływ na proliferację komórek i białka cyklu komórkowego i stwierdzono, że traktowanie przy użyciu PEPD indukowało fosforylację EGFR, Akt i STAT3.
- e) Podczas gdy stan zapalny wpływał na proliferację komórek, migracja komórek wydawała się być najbardziej spójnym fenotypem. Obejmowało to obniżenie ekspresji E-kadheryny i metaloproteazy, z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji HIF-1, TGFBR, COX-2 i N-kadheryny.
- f) Mutanty PEPD badano w kontekście proliferacji komórek. Mutacją o najbardziej wyraźnym fenotypie była rekombinowana PEPD zawierająca mutację G448R, która nie indukowała proliferacji komórek HaCaT nawet w obecności IL-1b.

Ocena:

Praca jest w dużej mierze dobrze zakończona, a interpretacje są jasne i podkreślają interesujące role PEPD w proliferacji keratynocytów jako głównej komórki bariery nabłonkowej w warunkach stanu zapalnego. Praca zawiera 1 artykuł przeglądowy i 2 artykuły recenzowane, za które należy uzupełnić autorów. Obecne odkrycia sugerują możliwości przyszłych prac, w tym w jaki sposób IL-1b zwiększa pozytywne role zewnątrzkomórkowej PEPD w odpowiedziach komórkowych oraz w jaki sposób sygnalizacja zależna od PEPD integruje się z dodatkowymi szlakami, w tym odpowiedziami zależnymi od HIF1a.

Zalecenia:

Praca doktorska jest do zaakceptowania z niewielkimi poprawkami zasugerowanymi poniżej:

Konkretne uwagi i wyjaśnienia do rozważenia przez autorkę:

Tekst:

Używanie IL-1b było stosowane przez cały czas, ale uzasadnienie tego warunku eksperymentalnego nie jest jasne. Proszę podać silniejsze uzasadnienie IL1b jako warunku, który należy badać w kontekście

LABORATORIA ROCKY MOUNTAIN LABORATORIES

903 S. 4th Street. Hamilton. MT 59840



Robert Filipowicz

gojenia się ran, z informacjami na stronie 24. LPS dodano jako dodatkowy bodziec na stronie 25; proszę również dodać informacje, dlaczego wybrano ten bodziec.

Strona 26: nie jest jasne, dlaczego zastosowano inhibitor gefitynib – proszę uzasadnić.

Strona 29, pierwszy wiersz: Stwierdzenie, że gefitynib zniósł zależną od PEPD sygnalizację EGFR, nie jest całkowicie dokładne. Wydaje się, że EGFR i AKT są potencjalnie regulowane w górę nawet w obecności inhibitora, co sugeruje, że stwierdzenie odzwierciedlające zmniejszenie odpowiedzi może być bardziej odpowiednie.

Ilustracje:

Strona 24/25: efekt dodania PEPD (plus IL-1b i/lub LPS) na żywotność komórek HaCaT i wytwarzanie IL-6 powinien być ukazany jako podstawowa walidacja modelu.

Ilustracja 5: czy autorka dysponuje zdjęciami modelu zamykania rany lub proliferacji komórek? Byłoby to tutaj dobrą ilustracją.

Ilustracja 6 i Ilustracja 10: wzrosty określonych markerów należy określić ilościowo w wielu eksperymentach z użyciem densytometrii i uwzględnić w postaci wykresów dla tych ilustracji.

Ilustracja 15: Traktowanie komórek rekombinowaną PEPD zawierającą mutację G448R nie indukuje proliferacji komórek, ale stwierdza się, że ten i inne mutanty stymulują aktywację/fosforylację białek sygnałowych poniżej EGFR. Jednakże nie uwzględniono żadnej kontroli niestymulowanych komórek w celu oceny stopnia aktywacji. Ponadto, jak to możliwe, że kaskady sygnalizacyjne są nienaruszone, ale proliferacja komórek jest pozornie oddzielona od tej transdukcji sygnału po zewnątrzkomórkowym traktowaniu PEPD jako bodźcem? Należy przedstawić dane dotyczące proliferacji komórkowej w odpowiedzi na stymulację rekombinowaną PEPD typu dzikiego i mutantami.

Powyższe wnioski upoważniają mnie do wystąpienia do Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Magdaleny Nizioł do dalszych etapów rozprawy doktorskiej.

Podpis [podpis nieczytelny]

Dr Sonja Best

sbest@niaid.nih.gov

LABORATORIA ROCKY MOUNTAIN LABORATORIES
903 S. 4th Street, Hamilton, MT 59840

Ja, Robert Filipowicz, tłumacz przysięgły języka angielskiego wpisany na listę tłumaczy przysięgłych Ministra Sprawiedliwości pod numerem TP/1166/05, stwierdzam zgodność powyższego tłumaczenia z oryginałem dokumentu.

Białystok, dn. 18.08.2022

Rep. 1896 / 2022



