

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marzena Anna Lewandowska, MBA
Kierownik Zakładu Genetyki i Onkologii Molekularnej
Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów
Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Adrianny Żukowskiej

pt. „Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach *in vitro*, *in vivo*
oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową”.

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem Pani promotor dr hab. inż. Joanny Zeyland, prof. UPP oraz Pani promotor pomocniczej dr hab. Joanny Perły-Kajan, prof. UPP. Praca została częściowo sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach realizacji projektów OPUS 2019/33/B/NZ4/01760 (pt. **Mechanizmy epigenetycznych modyfikacji histonów w hiperhomocysteinemii**) i 2021/43/B/NZ3/01008 (pt. **Mechanizmy zaburzeń wczesnego rozwoju zarodka w hiperhomocysteinemii**).

Zakłócenie mechanizmów epigenetycznych, takich jak metylacja DNA, modyfikacja histonów, mikroRNA (miRNA) czy zmiana konformacji chromatyny mogą prowadzić do chorób autoimmunologicznych, nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych czy neurodegeneracyjnych. Badania nad mechanizmami epigenetycznymi są stosunkowo niedawne w porównaniu z licznymi badaniami skupionymi na genetyce mendelowskiej, a epigenetyczne biomarkery diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne powoli zostają wdrażane do diagnostyki molekularnej człowieka, w tym guzów litych. Aberracje epigenetyczne mogą być odwracalne farmaceutycznie, stąd prowadzone są badania nie tylko nad nowymi biomarkerami epigenetycznymi, ale również nad lekami ukierunkowanymi na specyficzne mechanizmy epigenetyczne zaangażowane w regulację ekspresji genów. Rozwój technologii i badania z wykorzystaniem nowych technik, jak immunoprecypitacji chromatyny z przeciwciałami specyficznymi dla pewnych modyfikacji histonów w połączeniu z technologią mikromacierzy (Chip on Chip) lub sekwencjonowaniem nowej generacji (ChIP –Seq) zrewolucjonizowały możliwości monitorowania globalnych modyfikacji histonów. Jednym, z przykładów są badania podstawowe *SETDB1*, histonowej metylotransferazy, która deponuje trimetylowanie lizyny 9 histonu H3 (H3K9me3), aby transkrypcyjnie tłumić ekspresję genów. Przeprowadzono badania nad związkiem między potranslacyjnymi modyfikacjami histonów, a najczęstszymi wrodzonymi anomaliami (np. wady cewy nerwowej), często badania te były oparte na modelach komórkowych i zwierzęcych. Przykładem zastosowania modelu zwierzęcego w badaniach modyfikacji histonów jest ryba danio pręgowany (ang. Zebrafish), na którym

to modelu wykazano, że nierównowaga modyfikacji histonów odgrywa rolę w procesach karcenogenezy czerniaka. Badania nad mechanizmami epigenetycznymi są poszerzane również o hematologię. W grupie pacjentów z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (DLBCL) – zidentyfikowano u 21.7% pacjentów warianty somatyczne w genie *EZH2*, kodującym histonowo-lizynową N-metylotransferazę. Warianty te mogą prowadzić do niewłaściwej aktywacji genów, promujących podział komórek, a nadmierna ekspresja *EZH2* genu może wyciszać geny supresorowe nowotworu.

O ile profilowanie molekularne mutacji somatycznych, ekspresji genów czy miRNA są popularnymi badaniami w chorobach sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych czy nowotworowych to pojedyncze biomarkery epigenetyczne doczekały już zastosowania w klasyfikacji Nowotworów Ośrodkowego Układu Nerwowego WHO (WHO CNS5): predykcyjna metylacja promotora genu *MGMT* w glejaku wielopostaciowym czy prognostyczna ocena patogennych wariantów w genach kodujących histon H3.3, których obecność jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.

Doktorantka Adrianna Żukowska w swojej pracy doktorskiej na modelach *in vitro* (liniach komórkowych ludzkiego śródbłona HUVEC oraz mysiej neuroblastomy oraz próbkach osocza, mózgu, wątroby i śledziony pochodzących od myszy oraz próbek pacjentów) założyła, że w stanach patologicznych związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny dochodzi do wzrostu poziomu histonów zewnątrzjądrowych i/lub zewnątrzkomórkowych. A korelacja między poziomami zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiną mogą mieć zastosowanie w klinice, jako markery molekularne stanów patologicznych. Doktorantka zmierzyła się z realizacją zagadnienia, w którym połączyła nauki podstawowe, medycynę weterynaryjną i biologię medyczną. O ile badania związane z modyfikacją histonów są rozpowszechnione, to mechanizm uwalniania histonów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i badanie poziomu histonów zewnątrzjądrowych i/lub zewnątrzkomórkowych oraz podwyższonego poziomu homocysteiny, jako potencjalnego biomarkera patofizjologicznego jest nowym, unikalnym zagadnieniem badanym na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu.

Trafność wyboru tematu rozprawy doktorskiej bezpośrednio odzwierciedlają wyżej wspomniane granty badawcze oraz liczne publikacje z tego zakresu Pani dr hab. Joanny Perły-Kajan, prof. UPP promotor pomocniczej oraz praca przeglądowa doktorantki Adrianny Żukowskiej pt. „Histony łącznikowe H1 w chorobach człowieka”. Stwierdzam, że badane zagadnienia przedstawione w rozprawie jest aktualnym tematem badawczym, a wyniki badań przedstawione w rozprawie są pożądane nie tylko w aspekcie naukowym, ale również w kontekście wykorzystania ich potencjału klinicznego dla pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.

Przedstawiona rozprawa zawiera 128 stron wydruku komputerowego z podziałem na 6 głównych rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Praca zawiera czytelny spis treści, wykaz skrótów, streszczenie zarówno w języku polskim, jak i angielskim, wykaz tabel i rycin oraz bibliografię. Rozprawa doktorska zawiera 29 rycin, 20 tabel, a dobór piśmiennictwa i jego aktualność wraz z informacją z baz danych Światowej

Organizacji Zdrowia nie budzi zastrzeżeń poza drobną pisarską omyłką (brak autorów: Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K w 53 pozycji cytowania literatury).

WSTĘP otwiera wyjaśnienie pojęcia epigenetyka, a dalszy opis głównie poświęcony jest szczegółowej charakterystyce histonów oraz modyfikacji histonowych, homocysteinie wraz z opisem patofizjologii wybranych jednostek chorobowych (sercowo-naczyniowych i chorób neurodegeneracyjnych). Jak sama doktorantka zauważa – mechanizm potranslacyjnej modyfikacji histonów i wpływu na rozwój wybranych jednostek chorobowych - nie jest jeszcze w pełni poznany, ale profile epigenetyczne mogą już być wykorzystane, jako biomarkery diagnostyczne lub prognostyczne. Uwaga: Moim zdaniem wstęp byłby ciekawszy i interdyscyplinarny, gdyby doktorantka krótko rozszerzyła ten aspekt diagnostyczno-kliniczny, podając konkretne przykłady zastosowania ich w medycynie. Pozwolę sobie przypomnieć stosowanie już takich biomarkerów w chorobach nowotworowych: metylacja MGMT w glejakach, profil metylacji w raku jelita grubego, zmiany sensu histonu H3.3 lub histonu H3.1 wpływające na regulację epigenetyczną ekspresji genów w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego wieku rozwojowego.

CELE PRACY DOKTORSKIEJ zostały jasno określone w ramach założonego nurtu badań i w oparciu o zreferowane wcześniej przesłanki opisane we wstępie.

MATERIAŁY i METODY są szczegółowo opisane w 6 podrozdziałach. Materiał do badań został pozyskany zarówno z komercyjnie dostępnych linii komórkowych, jak i współpracy pomiędzy Uniwersytetem Przyrodniczym a zwierzętarnią Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu (modele mysie) oraz współpracą z katedrą Chemii Środowiskowej Uniwersytetu Łódzkiego (osocze od pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową). Próby i wybrane metody badawcze zostały prawidłowo wybrane. Uwaga: brak informacji o numerze zgody komisji bioetycznej do prowadzenia badań nad zwierzętami oraz numer zgody komisji bioetycznej do użycia materiału biologicznego od pacjentów (czy wykorzystany został pozostały po badaniach diagnostycznych materiał świeży lub archiwalny, czy od początku były planowane badania prospektywne); proszę doktorantkę o doszczegółowienie informacji podczas publicznej rozprawy i zamieszczeniu numeru zgody komisji bioetycznej w przyszłych publikacjach.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że doktorantka korzystała z różnych modeli badawczych, a co się z tym wiąże – opanowała szeroki zakres metod badawczych na heterogennym materiale (od hodowli linii komórkowych w warunkach stresowych po pozyskiwanie organów po uśmierceniu myszy czy osocze pacjentów). Tutaj swoją pochwałę kieruję również do promotora, promotora pomocniczego oraz kierowników grantów badawczych Opus, którzy umożliwili doktorantce na tak szerokie poszerzanie swojej wiedzy, kompetencji i umiejętności. Doktorantka opanowała metody biologii molekularnej, jak western blot czy dot-blot, metodę immunocytochemiczną i immunoenzymatyczną, korzystała z chromatografii cieczowej HPLC, jak i spektrofotometrii mas. Drobną niedosyt uzurpuje w spektrometrii mas - gdyż wykrycie modyfikacji translacyjnych wykonane było, jako podzlecenie przez laboratorium zewnętrzne w instytucie Biochemii i Biofizyki PAN

w Warszawie. Uczestniczenie w studiach doktoranckich daje szerokie możliwości – staż nie tylko zagranicznych ale i krajowych. Myślę, że doktorantka byłaby jeszcze bardziej bogata w doświadczenie i nowe umiejętności gdyby mogła uczestniczyć w takim stażu w ośrodku zewnętrznym i osobiście wykonywać lub uczyć się a nawet tylko obserwować spektrometrie mas.

Rozdział WYNIKI opisany jest na 30 stronach. Staranna selekcja próbek, podział wyników ze względu na (i) model komórkowy (ii) model myszy i (iii) model ludzki, liczne ryciny, wykresy korelacji, ryciny pozwalają na analizę wyników.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki analizy regresji wielorakiej, które to uznaje za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej: identyfikacja determinant (stężenie homocysteiny i cysteiny oraz wiek) podwyższonego poziomu histonu H1 w osoczu pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową. Uwagi: Aby wyniki łatwiej można było analizować – ryciny powinny być podpisane na każdej stronie albo podzielone na mniejsze zagadnienia – co nie zawsze było spełnione w rozprawie Pani Adrianny Żukowskiej. Oczywiście nie wpływa to merytorycznie na jakość wyników tylko czytelny sposób przedstawienia ich i łatwiejszą analizę (np. rycina 12 – wykresy słupkowe poziomu histonu H1A bez opisu na stronie 131, część zdjęć (C-D) bez opisu – z wykorzystaniem immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej, pozostałe zdjęcia mikroskopowe preparatów (E, F, G) na innej stronie już z opisem. Zabrakło mi dokładnego opisu ryciny 23 z charakterystyką pacjentów. Doszczegółowienie opisu podziału wiekowego, kolorystyki wskazującej na płeć pacjenta ułatwiłoby czytelnikowi merytoryczną analizę wyników. Obecnie - brak możliwości jej samodzielnej analizy bez tabeli 19.

Z przyjemnością czyta się DYSKUSJĘ, w której doktorantka prawidłowo i w sposób ciekawy konfrontuje wyniki własne z literaturą, jednocześnie prezentując dwa schematy: aktywacji inflammasomu NLRP3 przez DAMP oraz histonowe modyfikacje potranslacyjne. Doktorantka porównuje wyniki zmian epigenetycznych i represję transkrypcji w chorobach neurodegeneracyjnych, wskazuje również inne, nie badane przez nią przyczyny patogenyzy chorób neurodegeneracyjnych, jak zmiany w składzie mikrobioty jelitowej prowadzące do stanów zapalnych, osłabienia bariery krew-mózg, co sprzyja neurozapaleniu, uszkodzeniu neuronów i ostatecznie neurodegeneracji. Porównuje wyniki swoich prac na podobnych modelach badawczych, wskazuje dyskusyjność hiperhomocysteinemii, jako czynnik ryzyka i/lub czynnik nawrotu u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową. Z drugiej strony doktorantka podsumowuje wyniki swojej pracy doktorskiej zarówno w sposób graficzny (rycina 29) – obrazowo wskazując na rolę wzajemnego oddziaływania homocysteiny i H1 w napędzaniu stanów zapalnych i chorobowych. Praca jest zakończona 10 prawidłowo sformułowanymi wnioskami, z których w mojej ocenie ostatni ma potencjał zastosowania w klinice.

Tekst rozprawy został napisany poprawnie merytorycznie, logicznie i w sposób bardzo szczegółowy, opisuje nowoczesne metody, ciekawe wyniki przeprowadzone w tak szerokim zakresie różnych modeli badawczych co postrzegam, jako mocną i wyróżniającą się część rozprawy. Z drugiej strony, pozwolę sobie na dodatkowe parę uwag:

- 1) parę drobnych błędów redakcyjnych, jak interpunkcyjne: braki kropki (np. przedostatnie zdanie strona 25/131)
- 2) zminimalizowana lista skrótów, przy dość częstym używaniu skrótów w treści rozprawy, a poza wykazem np. PTM- modyfikacji potranslacyjnych histonów, gdyż bardzo często pojawia się w tekście, tym bardziej że sam skrót pochodzi od anglojęzycznego zwrotu post-translational modifications)
- 3) proponuję zmianę terminologii podrozdziału na stronie 39: „traktowanie komórek”- proponowana zmiana: (i) hodowla komórek w warunkach stresowych lub (ii) prowadzenie hodowli komórek z pożywką zawierającą czynniki stresowe
- 4) duża część rycin jest rozdzielona na 2 strony z brakiem opisu na pierwszej stronie – czytelnik może mieć wrażenie niespójności i braku opisu ryciny. Przykłady: rozdzielona rycina 7 na dwóch stronach; podobnie rycina 13 (część A, zdjęcie membrany z western blot jest do tego małe i na innej stronie niż graficznie przedstawione ilościowe oznaczenie białek i homocysteiny; podobnie rycina 15: membrany 15 A, B i C zbyt małe, ściśnięte – prawie niewidoczny prążek dla kontrolnego GAPDH u myszy WT; podobnie rycina 19 A, B, C vs D, E, F i G; rozdzielanie zdjęcia membran od wykresów i podpisu ryciny sprawia, że duża ilość wyników staje się mało czytelna – na potrzeby publikacji sugeruje scalony układ rycin i większe zdjęcia membran w stosunku do wykresów słupkowych
- 5) proszę o uważność w doborze rycin – strona 131 - zdjęcie komórek kontrolnych - jest czarne, nieczytelne pomimo kolorowego wydruku; agregaty komórkowe na rycinie 21 B i C – widoczne; brak informacji o komórkach kontrolnych, czy to była inna linia komórkowa niż N2A AD traktowana różnymi stężeniami Hcy i HTL? Opis kontroli jest dopiero przy rycinie 22 – kontrole stanowią komórki nietraktowane - czytając opis ryciny 22 dopiero logiczny staje się opis ryciny 21.
- 6) niedosyt - pomimo szerokiego zakresu różnych metod badawczych – gdzie materiał pochodził zarówno z hodowli komórkowej, zwierzętarni czy materiał pobierany od pacjentów – spektrometria mas wykonana była, jako podzlecenie przez laboratorium zewnętrzne w instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Uczestniczenie w studiach doktoranckich daje szerokie możliwości – również staży zagranicznych, jak i krajowych. Myślę że doktorantka byłaby dużo bardziej bogatsza w doświadczenie, nowe umiejętności i kompetencje, gdyby miała możliwość udać się na taki staż i wykonać bądź obserwować wykonanie spektrometria mas dla swoich próbek badawczych. Niemniej jednak powyższe drobne uwagi nie umniejszają tej ciekawej rozprawie doktorskiej, gdzie zastosowano tak szeroki wachlarz modeli i metod badawczych.

Wniosek końcowy:

Temat podjęty przez doktorantkę Adriannę Żukowską w przedłożonej mi rozprawie jest bardzo ciekawy i rzadki, część wyników badań doktorantki ma potencjał aplikacyjny. Z dyskusji rozprawy bezpośrednio nie wynika czy doktorantka planuje kontynuowanie badań w ramach wcześniej wspomnianych grantów z nauk podstawowych czy może wyniki jej doktoratu otworzą nowe ścieżki kariery zawodowej w zakresie medycyny translacyjnej – czego doktorantce, jako recenzent życzę.

Przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr Adrianny Żukowskiej pt. „Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a w szczególności wymienionym w art. 187. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz.1669).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Żukowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

12388

Kierownik IFM - Zakładu Genetyki
i Onkologii Molekularnej
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Marzena A. Lewandowska
diagnosta laboratoryjny
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej

Bydgoszcz, 29 maja 2025 r.