



Prof. dr hab. Magdalena Klink
Instytut Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk
Lodowa 106, 93-232 Łódź

Łódź, dn. 04.04.2022

OCENA

**rozprawy doktorskiej lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej zatytułowanej
„Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za
polaryzację neutrofilów w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych i trudno
poddających się leczeniu”**

Neutrofile mają zdolność wędrowania w kierunku czynnika chemotaktycznego, adherują do śródbłonna naczyń, migrują z krążenia do tkanek objętych procesem zapalnym, rozpoznają i fagocytują opsonizowane cząsteczki, niszczą patogeny oraz uwalniają sieci NET i szereg cytokin i chemokin. Dzięki swojej wzmożonej aktywności biorą też czynny udział w nasilaniu zapalenia i w uszkodzeniu komórek i tkanek. Po spełnieniu funkcji neutrofile ulegają apoptozie i zostają sfagocytowane przez makrofagi i komórki dendrytyczne. Jednakże, opisane powyżej klasyczne podejście do neutrofilli jako komórek bójczych i pro-zapalnych od dawno nie wyczerpuje ich wielorakiej aktywności. Fagocyty te są aktywne transkrypcyjnie, mogą zmieniać ekspresję cząsteczek błonowych i repertuar produkowanych cytokin/chemokin, a w konsekwencji są w stanie wykonywać odmienne funkcje, w zależności od tkanek w których się znajdują i/lub czynników które na nie działają. Sugeruje się, iż neutrofile nie są populacją jednorodną, a ich aktywność może być wielowymiarowa jak chociażby w niektórych chorobach autoimmunologicznych, czy też w chorobie nowotworowej. Pan Profesor Przemysław Lewkowicz, promotor niniejszej dysertacji, od wielu lat bada aktywności neutrofilów. Szereg artykułów Jego autorstwa pokazuje, iż granulocyty obojętne po zadziałaniu odpowiednich stymulatorów polaryzują w kierunku komórek o aktywności supresorowej. Jest to niezwykle ciekawe i nowatorskie podejście do neutrofilów, które przez dziesięciolecia wiązano tylko z funkcją pro-zapalną.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. dent. Pani Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej jest kontynuacją wieloletnich badań Profesora Lewkowicza i dobrze wpisuje się w nurt poszukiwań mechanizmów warunkujących supresorową aktywność neutrofilów. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania wyłonienia promotorów genów odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilów z fenotypu zapalnego do przeciwzapalnego. Ponieważ kluczowym elementem odpowiedzialnym za transkrypcje genów w neutrofilach jest jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa

B (NFκB) szczegółowej analizie poddano zmiany zachodzące w obrębie tego kompleksu białek. Badania oparte były na dwóch modelach, co jest niewątpliwą zaletą tej pracy. Pierwszy dotyczył neutrofilów izolowanych z krwi obwodowej osób zdrowych i stymulowanych *in vitro* czynnikami imitującymi różne fazy zapalenia, czyli TNF-α, LPS i IL-10. W drugim modelu Doktorantka badała neutrofile izolowane od pacjentów cierpiących na: zapalenie rdzenia i nerwów wzrokowych (NMOSD) lub sepsę lub zapalenie przyzębia, w których to jednostkach chorobowych neutrofile są stymulowane odpowiednio TNF-α, LPS i IL-10. Wybór stanów patologicznych odzwierciedlających model stymulacji neutrofilów *in vitro* uważam za trafny i w pełni uzasadniony. Realizacja ambitnego planu badawczego możliwa była dzięki wieloosrodkowej współpracy Doktorantki i Promotora.

Rozprawa doktorska, licząca 110 stron, została przygotowana w postaci monografii o tradycyjnym układzie tekstu dla prac przyrodniczych. We wstępie Doktorantka opisała wybrane aktywności i cechy neutrofilów jakie obserwuje się w zapaleniu o podłożu infekcyjnym i nie infekcyjnym oraz wybrane funkcje tych fagocytów, które uruchamiane są podczas eliminacji patogenów. W rozdziale tym znalazły się również podrozdziały dedykowane trzem stanom patologicznym, które były przedmiotem badań czyli zapaleniu rdzenia i nerwów wzrokowych, sepsie oraz zapaleniu przyzębia. Z przykrością stwierdzam, że wstęp jest napisany w sposób mało dojrzały. Zawarte w nim informacje są raczej powierzchowne i niejednokrotnie wydają się przypadkowe. W szczególności podrozdziały o receptorach Toll podobnych jak i o cytokinach i chemokinach opisują oba te zagadnienia w telegraficznym skrócie i praktycznie nie wnoszą żadnych istotnych informacji do całego wstępu o neutrofilach. Ponadto, Doktorantka napisała, że TLR przekazuje sygnały za pomocą Myd88, co jest bardzo nieprecyzyjne gdyż powszechne są również ścieżki sygnałowe niezależne od tego białka adaptorowego. Mam również zastrzeżenia co do tytułów podrozdziałów i zawartych w nich treści. W podrozdziale 3.2 „Rola neutrofilii” znalazł się opis wytwarzania przez te komórki reaktywnych form tlenu i uwalniania sieci NET. Doktorantka napomknęła również o przewlekłej chorobie ziarniniakowej, co jest dla mnie niezrozumiałe po co w kontekście całej rozprawy doktorskiej. Tym bardziej, że kilka zdań tekstu nie jest popartych żadną pozycją literatury. Również akapit na stronie 10 dotyczący immunofagocytozy i oksydazy NADPH nie ma adekwatnego odnośnika piśmiennictwa. Natomiast w podrozdziale 3.3 „Mechanizmy prowadzące do neutralizacji patogenów” obie powyższe aktywności fagocytów, kluczowe dla ich funkcji bójczej, zostały pominięte, natomiast opisano pobieżnie apoptozę, aktywność NFκB, oraz modyfikacje histonów. Szczególnie podrozdział o apoptozie budzi moje zastrzeżenia gdyż wiele jest w nim skrótów myślowych, natomiast brak jasno przedstawionych dwóch ścieżek (egzo- i endogennej) inicjacji zaprogramowanej śmierci komórki. Aktywacja szlaku sygnałowego NFκB w neutrofilach jest kluczowym elementem niniejszej rozprawy doktorskiej. Dlatego też we Wstępie temat ten

powinien być opisany zdecydowanie bardzo szczegółowo z uwzględnieniem trzech szlaków aktywacji, ich konsekwencji dla komórki zarówno na poziomie aktywacji genów jak i jej aktywności biologicznej. Bardzo zabrakło również schematu przedstawiającego szlak sygnałowy NFκB, co niewątpliwie byłoby idealnym wprowadzeniem do opisywanych wyników dotyczących białek Rel. Zwracam również uwagę, iż rozdziałowi Wstęp brakuje staranności w napisaniu oraz precyzyjności w nazewnictwie opisywanych zjawisk, które są niezbędne w naukach biologicznych i medycznych. Brak wyjaśnienia skrótów wszystkich cytokin i chemokin, a także Treg, SCF, Th17, LTB4, C5a, C6 itd. Ponadto, pisząc o TNF, które konkretnie białko Doktorantka miała na myśli? Czytając rozdział Wstęp zainteresowała mnie informacja, iż zaburzenie równowagi między wytwarzaniem ROS, a mechanizmami antyoksydacyjnymi jest podłożem wielu chorób w tym AIDS. Proszę Panią Małgorzatę Kulińską-Michalską o przybliżenie mi tego zagadnienia. Proszę również o wyjaśnienie różnic pomiędzy chorobą NMO, a chorobą NMOSD.

W następnym rozdziale, Cel i Założenie pracy, Doktorantka szczegółowo wyjaśniła jakie grupy pacjentów były badane. Natomiast sam cel, czyli co w neutrofilach było badane i dlaczego został opisany dość enigmatycznie i dopiero kolejne rozdziały nakreśliły jakie były założenia niniejszej pracy. Uważam, że wypunktowanie celi szczegółowych, które nader często stosuje się w monografiach jest dobrą praktyką i ułatwia późniejsze śledzenie wyników.

Materiały i Metody, zostały opisane bardzo skrótowo. Doktorantka błędnie określiła model neutrofilów izolowanych od pacjentów jako *in vivo* zamiast *ex vivo*. Stosowanie angielskich skrótów „h” i „rt” w pracy w języku polskim nie powinno mieć miejsca. Proszę również o przedstawienie na obronie metod oceny wybuchu tlenowego, fagocytozy i ekspresji cząsteczek adhezyjnych, gdyż zamieszczone opisy budzą moje wątpliwości. Na podkreślenie i szczególną pochwałę zasługuje natomiast szeroki wachlarz stosowanych metod z zakresu biologii molekularnej takich jak mikroskopia konfokalna, immunoprecypitacja chromatyny, przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie jak również bardzo ostatnio modne analizy bioinformatyczne. Zdaję sobie sprawę, że Doktorantka współpracowała z różnymi ośrodkami badawczymi. Niemniej jednak uważam, zakres badań szczególnie w przypadku lekarza jest imponujący.

Wyniki opisano na 24 stronach i zaprezentowano na 12 rycinach i w 4 tabelach. Z przykrością stwierdzam, że ryciny są nieczytelne ze względu na ich bardzo mały rozmiar. Wielka szkoda, że tak interesujące i niezwykle ważne wyniki nie zostały odpowiednio wyeksponowane. Ponadto, nie rozumiem dlaczego wykresy i tabele są opisane w języku angielskim skoro monografia jest napisana po polsku. Zdaję sobie sprawę, że intencją Doktorantki było opracowanie wyników na potrzeby publikacji, jednak forma rozprawy doktorskiej w postaci monografii to nie jest publikacja w czasopiśmie i jej przygotowanie rządzi się innymi prawami. Można było z powiedzeniem

przedstawić złożone ryciny na dwóch stronach. Moja druga uwaga do większości rycin dotyczy braku adnotacji czy obserwowane różnice w badanych aspektach neutrofilii stymulowanych IL-10 różniły się statystycznie od stymulowanych LPS czy TNF- α . Natomiast, bardzo podoba mi się rozbudowany opis pod rycinami często zawierający interpretację wyników, co w przejrzysty sposób reasumuje uzyskane dane. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż cały rozdział napisany jest dojrzałe i czyta się go z przyjemnością. Uzyskane wyniki opisane są syntetycznie, ze zwróceniem uwagi na najważniejsze rezultaty. Mam jeszcze jedną uwagę. Termin „ekspresja mRNA” nie jest poprawny. Określenie ekspresja dotyczy genów, natomiast w przypadku mRNA oznaczany jest jego poziom.

W pierwszym etapie badań Doktorantka oceniła aktywność funkcjonalną neutrofilii osób zdrowych stymulowanych czynnikami imitującymi poszczególne etapy zapalenia. Oczywiście neutrofile pobudzone LPS i TNF- α , wykazywały cechy komórek pro-zapalnych w zakresie produkcji RFT, cytokin, chemokin, zdolności do fagocytozy, oraz ekspresji cząstek adhezyjnych. Natomiast co bardzo ciekawe, neutrofile stymulowane immunosupresyjną IL-10 mimo iż były w stanie apoptozy uwalniały cytokiny i chemokiny o działaniu chemotaktycznym i wyciszającym stan zapalny, ale również pro-zapalnych. Otrzymane wyniki jasno pokazują jak niezwykle plastycznymi komórkami są te fagocyty.

W kolejnym etapie badań Doktorantka postanowiła prześledzić zmiany zachodzące w obrębie aktywacji NF κ B i po-translacyjnej modyfikacji histonu H3K4me3, które to elementy aktywacji genów są kluczowe w indukcji polaryzacji neutrofilów. Najwięcej uwagi podczas analizy wyników i ich interpretacji Pani Małgorzata Kulińska-Michalska poświęciła odpowiedzi neutrofilów na stymulację IL-10, co jest oczywiście zgodne z głównym celem rozprawy doktorskiej odnoszącej się do supresorowej aktywności tych fagocytów. Na podstawie mikroskopii konfokalnej Doktorantka wykazała, że w neutrofilach stymulowanych IL-10 dochodziło do przemieszczania podjednostki RelA wskazującego na aktywację alternatywnego szlaku NF κ B oraz do modyfikacji histonu H3 polegającej na trójmetylacji w regionie K4. Te ciekawe wyniki stały się inspiracją do dalszych badań, w których Pani Małgorzata Kulińska-Michalska postanowiła przeprowadzić analizę bioinformatyczną genów pozycjonowanych przez histon H3K4me3, w neutrofilach poddanych działaniu IL-10, TNF- α i LPS. W tym miejscu chcę pogratulować Doktorantce umiejętności przeprowadzenia złożonych analiz bioinformatycznych i statystycznych. Udało się odnaleźć po kilkanaście genów targetowych wysoce swoistych dla neutrofilów pobudzanych poszczególnymi czynnikami. Co ciekawe, analizy wykazały, iż w przypadku stymulacji fagocytów IL-10 uruchamiane były geny związane z alternatywną ścieżką aktywacji NF κ B, co potwierdziło słuszność wcześniejszej obserwacji mikroskopowej, że właśnie ten szlak sygnałowy jest aktywowany w

neutrofilach pod wpływem cytokiny immunosupresyjnej. Dalsza analiza dziesiątków genów pozycjonowanych przez histon H3K4me3 wykazała, że w neutrofilach stymulowanych IL-10 nie odnotowano odczytów w obrębie genów białek BCL2 hamujących apoptozę, co natomiast obserwowano w przypadku stymulacji komórek TNF- α i LPS. Te dane są również zgodne z wcześniejszymi wynikami badań immunocytochemicznych wskazującymi na apoptotyczny charakter neutrofilów pobudzanych IL-10.

Ostatni etap pracy doktorskiej miał na celu zestawienie wyników badań neutrofilów izolowanych od osób zdrowych i stymulowanych *in vitro* z danymi otrzymanymi z wykorzystaniem fagocytów osób chorych na wybrane jednostki chorobowe. Analizy porównawcze obu modeli pokazały wysoką liniową korelację w zakresie produkcji cytokin/chemokin oraz przemieszczania się podjednostki RelA NF κ B i ekspresji histonu H3K4me3 pomiędzy neutrofilami stymulowanymi LPS, TNF- α lub IL-10, a tymi izolowanymi od chorych odpowiednio z sepsą, NMOSD, oraz zapaleniem przyzębia. W dalszych badaniach, Doktorantka stosując analizę ChiP-Seq histonu H3K4me3 wykazała, że neutrofile otrzymywane od pacjentów wszystkich trzech jednostek chorobowych charakteryzowały się pozycjonowaniem genów targetowych poprzez modyfikację tego histonu w dwóch najważniejszych procesach „neutrophil activity” oraz „cytokine”. Pogłębione analizy pokazały również, że w przypadku neutrofilów izolowanych od pacjentów z chorobami przyzębia uruchamiana jest alternatywna ścieżka aktywacji NF κ B. Ten niezwykle ważny wynik jaki uzyskała Doktorantka potwierdza Jej uprzednio otrzymane wyniki i jasno wskazuje, że alternatywna droga aktywacji NF κ B jest charakterystyczna dla neutrofilów polaryzujących w kierunku komórek supresorowych. Niezależnie od moich uwag, z przekonaniem stwierdzam, że zamieszczone w rozprawie doktorskiej wyniki są bardzo interesujące, wartościowe i stanowią cenny wkład w coraz lepsze poznanie wielofunkcyjności neutrofilów.

Dyskusję czyta się z przyjemnością jest ona syntetyczna, ale napisana dojrzałe. Doktorantka w sposób krytyczny odniosła się do uzyskanych wyników i celnie je zinterpretowała na tle dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Kluczowy wynik pokazujący aktywację NF κ B w neutrofilach stymulowanych IL-10 oraz pozycjonowanie genów związanych z tym czynnikiem transkrypcyjnym został omówione w sposób wyczerpujący i dobrze przedyskutowany.

Rozprawę kończą 4 wnioski i podsumowanie. Wnioski są moim zdaniem nie do końca trafione. Szczególnie punkt 4 jest bardzo ogólnikowy i mam wątpliwości czy przedstawione w pracy rezultaty są podstawą do wysnuwania hipotezy o terapii celowanej. Natomiast rozdział Podsumowanie opatrzony graficzną interpretacją wyników jest świetnym uzupełnieniem rozprawy i w sposób przejrzysty wskazuje czytelnikowi postawione hipotezy badawcze i uzyskane wyniki wraz z ich interpretacją.

Streszczenie w języku polskim i angielskim w pełni oddaje charakter pracy chociaż oba streszczenie nie są tożsame. Na bibliografię składają się prace w większości prace opublikowane w ostatnich 10-15 latach.

Ocena końcowa

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska reprezentuje wysoki poziom naukowy i warsztatowy. Stanowi bardzo cenny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych zachodzących w neutrofilach umożliwiających ich polaryzację. Uzyskane wyniki badań mają dużą wartość poznawczą i nie mam zastrzeżeń co do ich wartości naukowej. Moje wątpliwości i uwagi, które zawarłam w recenzji dotyczą sposobu napisania Wstępu, Materiałów i Metod oraz przygotowania rycin. Chcę również podkreślić, że Doktoranta, która jest lekarzem dentystą i może się pochwalić dorobkiem naukowym w skład którego wchodzi pięć prac związanych wykonywanym przez nią zawodem. Jest też współautorką publikacji związanej z tematyką doktoratu, która ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* o IF=7.561. Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Dlatego też wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej
Instytutu Biologii Medycznej PAN

Prof. dr hab. Magdalena Klink