

Bydgoszcz, 30 listopada 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Sałkowskiej,

na stopień doktora nauk medycznych, pt.:

"IDENTYFIKACJA NOWYCH MARKERÓW GENETYCZNYCH KOMÓREK TH17 CZŁOWIEKA"

wykonanej w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, pod

promotorstwem dr. hab. Marcina Ratajewskiego, prof. IBM PAN.

Recenzja została przygotowana w oparciu o pismo Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 31 lipca 2023 roku wraz z załącznikami

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę klasyczną, 126-stronicowej monografii w twardej oprawie. Składa się z części zasadniczej o układzie typowym dla eksperymentalnych opracowań prac badawczych zawierającej wszystkie niezbędne elementy tj. stronę tytułową, spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo obejmujące 285 pozycji literaturowych. Sposób przygotowania, układ pracy i jej forma nie budzą żadnych zastrzeżeń, są bardzo przejrzyste i wygodne dla czytelnika.

Pomimo, że subpopulacja limfocytów pomocniczych produkujących i wydzielających interleukinę 17 (IL-17) odkryta została blisko 20 lat temu, nadal pozostaje jedną z bardziej enigmatycznych i trudnych do charakterystyki funkcjonalnej. Wynika to między innymi z faktu, że markery, na podstawie których dokonywana jest identyfikacja tej subpopulacji, cechują się niską specyficznością, ponieważ obecne są również w innych typach komórek. Poszukiwanie zatem nowych, bardziej specyficznych markerów komórek Th17 jest zdecydowanie tematem ciągle aktualnym. Co do oryginalności i walorów poznawczych ocenianej rozprawy doktorskiej nie można więc mieć wątpliwości. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania polegającego na identyfikacji genów, których ekspresja podlega zmianom w trakcie różnicowania limfocytów Th17 z dziewiczych komórek CD4+ izolowanych z krwi obwodowej człowieka oraz znalezienia takich,

których ekspresja jest specyficzna dla komórek Th17, w porównaniu z innymi limfocytami: Th1, Th2 i Treg. Zaproponowała w tym celu kompleksowe podejście eksperymentalne z użyciem nowoczesnych narzędzi badawczych: m.in. identyfikacji genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG) w komórkach CD4+ naiwnych i różnicowanych w kierunku limfocytów Th17 metodą sekwencjonowania RNA, porównanie ekspresji wyselekcjonowanych genów i ich produktów w ludzkich komórkach Th1, Th2, Th17 i Treg, jak również związanych z tym zmian epigenetycznych w postaci metylacji i acetylacji histonów.

Doktorantka wprowadza czytelnika w badany temat w obszernym wstępie teoretycznym, stanowiącym wyczerpujący przegląd doniesień literaturowych. Autorka wykazała się erudycją, komunikatywnością oraz zdolnością syntetycznego przekazu treści. Rozpoczyna od ogólnego opisu funkcji limfocytów, a następnie przechodzi do szczegółowej charakterystyki komórek Th17 oraz produkowanych przez nie cytokin i chemokin. W dalszej części omawia czynniki transkrypcyjne charakterystyczne dla tej subpopulacji oraz krótko charakteryzuje inne subpopulacje limfocytów CD4+ (Treg, Th1, Th2, Tfh, Th22 i Th9). Po podsumowaniu funkcji limfocytów Th17 Autorka przechodzi do omówienia roli limfocytów Th17 w patogenezie wybranych chorób autoimmunologicznych (tocznia rumieniowatego układowego, reumatoidalnego zapalenia stawów i stwardnienia rozsianego) oraz chorób nowotworowych.

W podsumowaniu oceny tej części pracy pragnę stwierdzić, że została ona opracowana poprawnie pod względem merytorycznym i w satysfakcjonującym stopniu prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr Anny Sałkowskiej. W kilku miejscach zabrakło może zilustrowania opisywanych treści choćby prostymi rycinami, które znacząco poprawiłyby jasność przekazu (jak choćby niełatwych do opisu procesów różnicowania komórek w kierunku limfocytów Th17). Umieszczenie podrozdziału 1.8.4 Choroby nowotworowe w rozdziale dotyczącym chorób autoimmunologicznych, traktuję jako pomyłkę redakcyjną.

Część doświadczalna obejmująca 45 stron napisana jest dokładnie i z uwzględnieniem kolejnych etapów pracy eksperymentalnej, od zaplanowania badania przez rzetelny opis metod badawczych i uzyskanych wyników do dyskusji i sformułowania wniosków. Opis metod badawczych jest obszerny i wystarczający do rzetelnej oceny sposobu prowadzenia badań, świadczy też o dużej biegłości Doktorantki w obszarze części eksperymentalnej pracy badawczej. Na szczególne uznanie zasługuje dbałość w zakresie monitorowania jakości i czystości preparatów RNA używanych do dalszych analiz. Nie znalazłem informacji o tym jakie były kryteria doboru genów referencyjnych oraz czy, a jeśli tak, to w jaki sposób oceniano czystość komórek po poszczególnych etapach izolacji/różnicowania/ekspansji? Dlaczego na żadnym z etapów nie

dokonano charakterystyki fenotypowej komórek metoda cytometrii przepływowej? W jednym miejscu (str. 52) znajduję co prawda stwierdzenie „postępowanie pozwoliło na uzyskanie wysokiej czystości komórek CD4+”, brak jednak jakichkolwiek dodatkowych informacji na ten temat. W kilku miejscach Doktorantka posługuje się wyłącznie objętością dodawanych/używanych roztworów, co bez podania ich stężenia jest informacją w zasadzie bezużyteczną. Ponadto nie zawsze jest jasne, czy podane stężenia cytokin, chemokin czy przeciwciał są stężeniami końcowymi w roztworze, czy stężeniami w używanych odczynnikach.

W liczącym 22 strony opisie wyników Doktorantka szczegółowo przedstawiła rezultaty badań, zaczynając od analiz mających na celu identyfikację genów o zróżnicowanej ekspresji w naiwnych i różnicowanych do Th17 komórkach CD4+. Za pomocą oceny stężenia wydzielanej cytokiny Th17 oraz ekspresji genów *RORγT*, *IL17A* i *IL17F* potwierdziła prawidłowe zróżnicowanie komórek w kierunku limfocytów Th17 co uprawniało do przeprowadzenia opartej na sekwencjonowaniu RNA analizy DEG. Po zmapowaniu sekwencji do genomu referencyjnego wytypowała ponad 2000 genów, które w kolejnym kroku poddała analizie ontologicznej. Nie jest zaskoczeniem, że najliczniej reprezentowane były (liczone w setkach) geny kodujące białka powiązane z procesami różnicowania komórek, z procesami zachodzącymi w układzie odpornościowym, odpowiedzią immunologiczną i regulacją procesów układu odpornościowego. W tym momencie dochodzimy do etapu eksperymentalnego, który wymagał będzie dodatkowych wyjaśnień ze strony Doktorantki, mianowicie identyfikacji genów specyficznych dla limfocytów Th17, odróżniających je od limfocytów Th1, Th2 i Treg. Nie jest jasne w oparciu o jakie kryteria „spośród genów zaangażowanych w regulację procesów biologicznych, wyodrębniono kilkadziesiąt genów specyficznych dla komórek Th17, których ekspresja została dodatkowo zweryfikowana za pomocą techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym”. Czy na tym etapie można mówić o genach specyficznych dla komórek Th17 skoro dopiero ich szukamy? W dalszym etapie w wyizolowanych subpopulacjach, oczywiście po potwierdzeniu prawidłowego różnicowania w oparciu o profil wydzielanych cytokin i ekspresję sygnaturowych czynników transkrypcyjnych, oznaczono następnie ekspresję 32 genów, i tu również nie wiadomo jakie były kryteria ich wyboru. Nie wiadomo ponadto jakich starterów użyto do analizy większości genów przedstawionych w Tabeli 5. Na podstawie analizy przesiewowej w komórkach pozyskanych od dwóch dawców wytypowano trzy geny które cechowały się wysoką ekspresją w populacji Th17 u obu z nich: *APOD*, *C1QL1* i *CTSL*, a następnie stwierdzono wysoką ich ekspresję w komórkach od kolejnych dziewięciu dawców. W kolejnym kroku Doktorantka potwierdziła, że w ślad za wyższą

ekspresją genów, to właśnie komórki Th17 produkowały i wydzielały najwięcej białek APOD, C1QL1 i CTSL spośród przebadanych czterech subpopulacji limfocytów T.

W ostatnim etapie prac eksperymentalnych Doktorantka dokonała oceny powiązań pomiędzy wybranymi modyfikacjami histonów (H3K4me3, H2BK12ac i H3K27me2/3) a regionami promotorowymi wytypowanych genów metodą immunoprecypitacji chromatyny i RT-PCR. Pozwoliło to na zaobserwowanie w komórkach Th17 największego stopnia acetylacji histonu H2B w pozycji lizyny 12 w przypadku promotorów genów *APOD*, *C1QL1* i *CTSL*.

Po opisie wyników Autorka zamieściła blisko dziewięciostronicową dyskusję, w której umiejętnie prezentuje własne wyniki w kontekście doniesień innych badaczy. Doktorantka doskonale zdaje sobie sprawę z niedoskonałości i ograniczeń badanych modeli i rozważnie je dyskutuje. W mojej ocenie przedstawione wysokiej jakości wyniki upoważniły Doktorantkę do wyciągnięcia, przedstawionych w Rozdziale 4, syntetycznych wniosków. Bez wątplenia geny *APOD*, *C1QL1* i *CTSL* i/lub ich białkowe produkty mają duży potencjał w charakterze funkcjonalnych markerów odróżniających limfocyty Th17 od komórek Th1, Th2 i Treg. Odkrycie to wzmocnione jest identyfikacją wspólnego mechanizmu epigenetycznego mogącego regulować ekspresję wytypowanych genów.

Z recenzenckiego obowiązku przedstawiam również listę drobniejszych uchybień zauważonych w ocenianej rozprawie:

- Autorka zamiennie i niekonsekwentnie stosuje: polską i angielską terminologię, jak również miesza różne konwencje wyrażania stężeń roztworów.
- Autorka niepoprawnie stosuje kropkę jako znak dziesiętny.
- Na str. 55 podano kryterium czystości preparatów RNA A260/A230 w przedziale 1,8-2,0 – powinno być chyba trochę wyższe.
- Tytuł podrozdziału 2.3.7 „Oznaczanie stężenia cytokin” wydaje się nieprecyzyjny, gdyż nie wszystkie oznaczane białka są cytokinami.
- W rozdziale 2.3.12. „Analiza statystyczna” brakuje tu informacji o przytoczonym m.in. na rycinie 9. i w tabeli 4 dokładnym teście Fishera. Nie mogę również zgodzić się ze stwierdzeniem, że test rang Friedmana porównuje średnie.
- W spisie treści brak jest podrozdziału 2.4.3.
- Rycina 14 przedstawia stężenia białek w supernatantach, a nie w komórkach

- Sposób prezentacji istotności różnic na rycinach mógłby być czytelniejszy. Zgodnie z aktualnymi trendami należałoby podawać każdorazowo wartość p, a nie tylko oznaczać istotne różnice symbolami.

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko. Chciałbym, aby stawiane w prezentowanej recenzji pytania oraz przedstawione uwagi nie zostały odebrane jako głos krytyczny, lecz by stały się elementem w dyskusji naukowej z Doktorantką.

Rozprawa doktorska mgr Anny Sałkowskiej jest wartościowa badawczo, ma niewątpliwe walory poznawcze oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt opublikowania znaczącej części wyników w pracy, która ukazała się w Cells (Cells 2020, 9, 1611; doi:10.3390/cells9071611), a w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Trochę niezrozumiałym wydaje się brak tej pracy w spisie piśmiennictwa zwłaszcza, że część rycin została z niej wprost zaczerpnięta. Licencja Uznanie Autorstwa (CC BY) zobowiązuje do zamieszczenia stosownego cytowania, nawet, jeśli jest to praca własna. Pozostaje również mieć nadzieję, że pozostałe wyniki również doczekają się wartościowych publikacji, bo w pełni na to zasługują.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz 1789 z późn. zm.). Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr Anny Sałkowskiej w dyscyplinie nauki medyczne a jej autorka udowodniła umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Anny Sałkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Daniel Gackowski
profesor UMK