

dr hab. Marek Fol, prof. UŁ  
*Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej*  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Sałkowskiej  
pt. „Identyfikacja nowych markerów genetycznych komórek Th17 człowieka”,  
sporządzona dla Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska to 126-stronicowa monografia przygotowana na podstawie wyników badań eksperymentalnych. Jej struktura jest typowa dla tego typu prac, składają się na nią rozdziały podzielone na mniejsze sekcje, tworzące spójną i logiczną całość.

Tematyka pracy dotyczy obszarów z pogranicza genetyki i immunologii i jest dobrym przykładem interdyscyplinarności badań służących tutaj identyfikacji markerów różnicowania limfocytów dziewiczych CD4<sup>+</sup> w kierunku limfocytów Th17 oraz tych, które charakterystyczne są tylko dla tej grupy komórek. Cele te zostały jasno wyartykułowane w osobnym rozdziale („Cele pracy”, str. 46), a dla ich realizacji zdefiniowano trzy zadania badawcze opierające się o nowoczesne techniki genetyczne: sekwencjonowanie RNA izolowanego z dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i limfocytów Th17 z analizą genów o odmiennej ekspresji; analiza ekspresji wybranych genów i ich produktów w limfocytach Th1, Th2, Th17 i Treg i wreszcie ocena zmian w poziomie metylacji i acetylacji histonów w kontekście zróżnicowanej ekspresji genów charakterystycznej dla wymienionych wcześniej grup limfocytów. W pracy nie odnaleziono, jednakże wyraźnie sformułowanej tezy/hipotezy badawczej. Na podstawie lektury wstępu, a zwłaszcza zagajenia w podrozdziale 2.1. („Cele pracy”) można zidentyfikować pewne nawiązanie do niej bądź określić ją też mianem „domyślnej”, a mianowicie, że istnieją geny, których ekspresja jest charakterystyczna dla procesu różnicowania się limfocytów T

naiwnych w limfocyty Th17. Stąd też wypływają dwa wspomniane wcześniej cele niniejszej pracy. Uzasadnienie podjęcia tego typu badań dostarcza „Wstęp” pracy, w którym poza m. in. zwięźłą charakterystyką kolejnych grup limfocytów T najwięcej miejsca poświęcono właśnie limfocytom Th17 z uwzględnieniem ich funkcji pełnionych w układzie odpornościowym, a także roli w patogenezie chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, czy chorób nowotworowych. Wstęp dostarcza również informacji na temat szeregu cytokin istotnych z punktu widzenia różnicowania dziewiczych limfocytów T do limfocytów Th17 oraz cytokin wytwarzanych przez te ostatnie. Opisanie na początku pierwszej dekady obecnego stulecia limfocyty Th17 partycypują nie tylko w mechanizmach odpornościowych skierowanych przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym, ale również w rozwoju mechanizmów destrukcyjnych o podłożu autoimmunizacyjnym związanym z rozwojem chorób zwyrodnieniowych stawów, stwardnienia rozsianego, łuszczycy, czy nieswoistego zapalenia jelita. Doktorantka, jak najbardziej słusznie konstatuje, że identyfikacja genów i ich produktów, charakterystycznych dla limfocytów Th17, może zatem dostarczyć potencjalnie użytecznych celów terapeutycznych. Uwagi: pojawiają się mało precyzyjne sformułowania, np. str. 11, kiedy Autorka wymienia cytokiny jako element odpowiedzi nabytej niejako w kontraście do odpowiedzi wrodzonej, tymczasem cytokiny wytwarzane są również przez komórki utożsamiane z odpowiedzią pierwotną stąd niekiedy stosuje się nieformalny podział cytokin na te odpowiedzi wrodzonej i odpowiedzi adaptacyjnej; na str. 12 pojawia się stwierdzenie, że odpowiedź odpornościowa, w której uczestniczą limfocyty T określana jest mianem swoistej typu komórkowego, a ta z udziałem limfocytów B – typu humoralnego, jednakże należy pamiętać, że podział ten nie jest aż tak ostry bowiem pomijając limfocyty T cytotoksyczne, limfocyty Th1, za sprawą m. in. wydzielanych cytokin (IL-2, IFN- $\gamma$ ), rzeczywiście oddziałują na odpowiedź komórkową aktywując komórki żerne, głównie monocyty/makrofagi, ale to limfocyty Th2 partycypują przeciwieście w odpowiedzi swoistej typu humoralnego, a z kolei limfocyty B w określonych warunkach mogą pełnić funkcję komórek prezentujących antygen; dalej – czy LPS można określić mianem „produktu szlaków sygnałowych charakterystycznych dla mikroorganizmów” co sugerowałby kontekst wypowiedzi na str. 12; można polemizować czy IFN- $\gamma$  to typowa chemokina (str. 18), co prawda podział cytokin często jest mało precyzyjny i nastrocza wielu kłopotów, ale interferony przyjęło się uznawać za osobną grupę tych immunomodulatorowych biomolekuł. Pewnym kolokwializmem jest stwierdzenie: „zdolność układu immunologicznego do przechowywania informacji o przebytych infekcjach” (str. 11). W pracy należałoby konsekwentnie stosować to samo nazewnictwo w odniesieniu do konkretnych grup komórek, Autorka posługuje się określeniem dziewicze (naiwne limfocyty) T, naiwne/dziewicze komórki T CD4+. Opisuje też pokrótce jak zmieniał się podział limfocytów na przestrzeni lat i jakie kryteria podziału stosowano (str. 13). Czy uwzględniono



w pracy najnowszy podział obowiązujący od 2013 roku, gdzie wśród limfocytów pomocniczych (Th) wyróżniono grupę limfocytów Th0 (określaną jako naiwne limfocyty TCD4+), a oprócz tego jako osobą subpopulację – limfocyty Tn (naiwne) o fenotypie  $T\alpha/\beta CD4+$  i  $T\alpha/\beta CD8+$ ? Można domyśleć się, że za każdym razem, kiedy Doktorantka pisze o limfocytach naiwnych CD4+ ma na myśli limfocyty Th0. Dużą pomocą w zrozumieniu skomplikowanych procesów różnicowania się limfocytów T służyłaby odpowiednia grafika. Przy okazji nazewnictwa, przyjęło się stosowanie w nomenklaturze polskojęzycznej nazwy limfocyt, a nie komórka T, co jest anglicyzmem niekiedy przenoszonym do rodzimego nazewnictwa. Sugeruje się ponadto stosowanie nazwy „układ odpornościowy” zamiast „układ immunologiczny”, analogicznie: „odpowiedź odpornościowa” zamiast „odpowiedź immunologiczna”; a także stosowanie określenia „choroby autoimmunizacyjne” zamiast „choroby autoimmunologiczne”. Często obie formy nazewnictwa używane są wymiennie jako nazwy synonimiczne, nie mniej właściwą formą jest ta pierwsza. Wskazaniem byłoby zachowanie większej konsekwencji i precyzji w nazewnictwie określającym czynniki transkrypcyjne (rozdział 1.5.), Autorka jak najbardziej prawidłowo dzieli je na ogólne i specyficzne, po czym wprowadza dodatkowe określenia, np. dominujący, główny.

Poszczególne eksperymenty zostały zaprojektowane w sposób przemyślany i całkowicie adekwatny do postawionych zadań. W podrozdziale 2.2. („Materiały”) skrupulatnie wymieniono najistotniejsze media, odczynniki i zestawy komercyjne niezbędne do przeprowadzenia doświadczeń. Z jakiegoś/jakiś powodu/-ów nie zamieszczono w tym zestawieniu krwi żyłnej obwodowej/kożuszków leukocytarно-platekowych, bądź samych limfocytów T, które były z tych źródeł izolowane, a przecież to podstawowy/wyjściowy materiał. To właśnie od izolacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej służących następnie otrzymaniu limfocytów T CD4+ Dyplomantka rozpoczyna kolejny podrozdział poświęcony metodyce pracy (str. 50). Co należy rozumieć przez określenie „ludzkie odczynniki Th1 i Th2” (str. 51) i „ludzkie odczynniki Th2 1, 2, 3 i 4” (str. 52)? Jaki fenotyp posiadały limfocyty CD4+ podlegające różnicowaniu do Th1, Th2, Th17? *Gros* metod, co zupełnie rozumiałe, stanowią te bezpośrednio bądź pośrednio związane z genetyką. Poszczególne techniki opisano wystarczająco obszernie i klarownie, a otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej (w niektórych eksperymentach liczba n wynosi 3, jak ta stosunkowo niewielka liczebność przekłada się na wiarygodność wyników (moc testu)?

Wyniki zaprezentowano w oddzielnym rozdziale (str. 69-90) podzielonym na szereg mniejszych sekcji prezentujących w logicznym układzie kolejne dane. Sekcje te zawierają liczne, czytelnie zaprojektowane ryciny (na które składają się wykresy, diagramy, skany) oraz tabele. Opatrzono są one stosownymi komentarzami pozwalającymi lepiej zrozumieć prezentowane treści.

Po upewnieniu się, że zastosowany proces różnicowania limfocytów dziewiczych CD4+ faktycznie doprowadzał do pojawienia się limfocytów Th17 i po sprawdzeniu jakości otrzymywanego RNA, Doktorantka przystąpiła do zasadniczych badań dostarczających najbardziej wartościowych danych związanych z wytypowaniem genów, poddaniu ich analizie funkcjonalnej, identyfikacją genów charakterystycznych dla limfocytów Th17, czy wreszcie analizą zmian epigenetycznych towarzyszących zmianom ekspresji wyselekcjonowanych genów w różnych grupach limfocytów T. Uwagi: pożądanym byłoby jasne określenie grup kontrolnych, o których mowa odnośnie analizy jakościowej RNA (str. 71) oraz grupy badanej i kontrolnej użytych do wytypowania 2000 genów o istotnie statystycznych różnicach w poziomie ekspresji (str. 73), przy czym Autorka raz posługuje się określeniem grupa badana, po czym pisze o grupach badanych i o jakich różnych warunkach eksperymentalnych jest mowa, które mogły na tę ekspresję wpływać? Czy mówiąc o genach/ich produktach związanych z regulacją procesów układu odpornościowego Autorka miała na myśli regulację procesów odpornościowych? Pomysłowym i trafnym rozwiązaniem jest umieszczenie pewnego rodzaju teoretycznego wprowadzenia w każdej z sekcji wynikowej, które pozwala lepiej zrozumieć, szczególnie czytelnikowi nie specjalizującemu się w danym obszarze badawczym, prezentowane treści. O ile w artykułach doświadczalnych/oryginalnych taka formuła jest już od dawna niezalecana, o tyle w monografii naukowej nadal pełni niezwykle przydatną i użyteczną rolę. Za przykład takiego rozwiązania mogą służyć podrozdziały 2.4.3. i 2.4.4. W pierwszym z nich zaprezentowano efekty badań związanych z identyfikacją poszczególnych subpopulacji limfocytów T w oparciu o poziom ekspresji najbardziej charakterystycznych dla nich czynników transkrypcyjnych: ROR $\gamma$ T dla Th17, TBX21 dla Th1, GATA3 dla Th2 i FoxP3 dla Treg w odniesieniu do wybranych genów metabolizmu podstawowego, tzw. *housekeeping genes* (HKG): *HPRT1*, *HMBS* i *RPL13A*. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić za jakie istotne życiowo procesy geny te odpowiadają i czym kierowała się w wyborze tych właśnie trzech? Następnie, po przeprowadzeniu niezbędnych analiz, wytypowano trzy geny, których ekspresja była najwyższa w komórkach limfocytów Th17, w porównaniu do innych badanych subpopulacji limfocytów T, a mianowicie geny: *APOD*, *C1QL1* i *CTSL*. Kodują one białka (kolejno: apolipoproteinę D, białko z podrodziny C1Q-podobnych w rodzinie białek dopełniacza C1Q-spokrewnionych i katepsynę L) podlegające sekrecji z komórki, a zastosowane techniki, zarówno Western blot, jak i immunoenzymatycznej ELISA, potwierdziło specyficzność/wzmożoną ekspresję wytypowanych białek w odniesieniu do limfocytów Th17. Autorka jak najbardziej słusznie wnioskuje (str. 100), że owe trzy geny mogą stanowić ważne markery odróżniające limfocyty Th17 od limfocytów Th1, Th2 czy Treg. Dodatkowych cennych danych dostarczyły wyniki badań nad zmianami epigenetycznymi (podrozdział 2.4.4.), przy czym techniki służące uzyskaniu tych danych powinny być wyraźniej nazwane lub ujęte



w osobną sekcję w podrozdziale „Metody”. Na podstawie danych z analiz epigenetycznych w *loci* zidentyfikowanych genów Doktorantka odnotowuje najwyższy poziom acetylacji histonu H2B w pozycji lizyny 12 w obrębie ich promotorów, w komórkach limfocytów Th17 i wnioskuje dalej, że może być to związane z wysokim poziomem ekspresji tych genów w tych właśnie limfocytach i może wskazywać na wspólny mechanizm epigenetyczny regulujący aktywność tych genów. Czy Doktorantka uważa, że dla potrzeby prowadzonych analiz z zakresu metylacji mogłoby być użytecznym zastosowanie techniki RRBS (*Reduced representation bisulfite sequencing*)? Te i pozostałe wnioski ujęto w bardzo syntetyczny sposób i zamieszczono w osobnym rozdziale pracy (str. 100). Uwaga: nie ma potrzeby dosłownego tłumaczenia nazw anglojęzycznych określonych białek, kiedy nie posiadają one utrwalonego nazewnictwa polskojęzycznego, w tej sytuacji lepiej posługiwać się nazwami oryginalnymi lub opisowymi (C1QL1, str. 93).

Rezultaty badań zostały przedyskutowane w oddzielnym rozdziale (str. 91-100). Rozdział ten, co trzeba przyznać – napisany bardzo sprawnie, wartkim językiem, nie zawierający powtórzeń treści już wcześniej omawianych, to jednak w ocenie recenzenta został nieco przetładowany informacjami, które z powodzeniem mogłyby się znaleźć we wstępnych częściach pracy. Mowa tu o szczegółowej charakterystyce apolipoproteiny D, białka C1QL1 i katepsynie L, czyli produktach genów, których wzmożoną ekspresją odnotowano jako charakterystyczną dla komórek limfocytów Th17. Umiejętne przeplatanie swoich badań i ich interpretacji z badaniami już wcześniej opublikowanymi i teorią powinno stanowić rdzeń tego rozdziału pracy. Wszystkie te elementy odnajdujemy w „Dyskusji” chociaż w proporcjach, które mogłyby ulec pewnej korekcie. Bardzo cennym elementem każdej dyskusji jest również krytyczne spojrzenie rozumiane jako ocena potencjalnych wad, np. zwiększenie liczności prób badanych, standaryzacja/eliminacja zmiennych które mogłyby oddziaływać na efekt końcowy, wybór alternatywnych/uzupełniających narzędzi badawczych. W opinii recenzenta uwzględnienie tych wątków w dyskusji byłoby jej dodatkowym atutem.


Pracę dopełniają: bardzo skrupulatnie przygotowany i obszerny wykaz skrótów, wykaz piśmiennictwa obejmujący aż 285 prawidłowo dobranych i cytowanych pozycji literaturowych i dwupółstronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, napisane w sposób syntetyczny, odpowiednio eksponujące poszczególne elementy pracy.

Podsumowując, będąca przedmiotem oceny praca doktorska została przygotowana w sposób bardzo rzetelny i profesjonalny. Dostarcza danych będących cennym uzupełnieniem informacji na temat sygnatury molekularnej limfocytów Th17, które mogą okazać się cenną wskazówką dla identyfikacji procesów zapalnych inicjowanych lub zachodzących z udziałem tej grupy limfocytów, bądź umożliwiających w przyszłości określenie celów terapeutycznych w chorobach, w przebiegu

których udział limfocytów Th17 jest znaczący/kluczowy. Doktorantka posługuje się obszernym i zróżnicowanym zestawem zaawansowanych technik badawczych, a uzyskane wyniki prezentuje w sposób przemyślany i syntetyczny. W oparciu o nie, umiejętnie formułuje wnioski by wreszcie spójną kłamrą dyskusji skonfrontować teoretyczno-empiryczne dane literaturowe z wynikami własnych badań. Obszerna baza źródłowa świadczyć może o dużej wiedzy Doktorantki z zakresu omawianych zagadnień i sprawnym poruszaniu się w tym obszarze. Praca odznacza się transparentnym stylem, logicznym układem i z dużą starannością przygotowaną warstwą edycyjną. Zawarte w recenzji uwagi mają najczęściej charakter polemiki i nie wpływają na wysoką ocenę pracy.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i występuję z wnioskiem do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Anny Sałkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę oryginalność podjętego problemu badawczego, poprawność rozwiązań metodologicznych, umiejętność formułowania adekwatnych do otrzymanych wyników i wyważonych wniosków oraz możliwą wartość aplikacyjną, a nadto formalną poprawność pracy i wysoki poziom edytorski wnioskuję o stosowne wyróżnienie niniejszej pracy.

  
.....  
dr hab. Marek Fol, prof. UŁ