

Bydgoszcz, 15.05.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Martyny Wojtali** pt.

„Zmiany statusu metylacji reszt lizynowych białek determinowane aktywnością metylotransferazy G9a i lizyno-specyficznej demetylazy 1 jako modulator funkcji komórek śródbłonka naczyniowego.”

wykonanej w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr. hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl publikacji dotyczących wpływu procesów metylacji i demetylacji białek warunkowanych aktywnością metylotransferazy G9a i lizyno-specyficznej demetylazy 1 (LSD1) na zmiany struktury chromatyny i funkcje śródbłonka naczyniowego.

Choroby naczyniowo-sercowe determinowane nadciśnieniem tętniczym, zmianami miażdżycowymi, powikłaniami cukrzycy oraz choroby nowotworowe cechuje jedna wspólna cecha, duża śmiertelność. W chorobach tych, uważanych za epidemie XXI wieku, kluczową rolę odgrywają procesy zapalne determinowane interakcjami komórek układu immunologicznego z śródbłonkiem naczyń. Wobec powyższego, temat pracy doktorskiej jest bardzo aktualny, a zastosowane modele badawcze wskazują na dużą nowatorskość przeprowadzonych badań.

Praca doktorska przygotowana bardzo starannie, poza standardowymi elementami typu spis treści, skróty, literatura, streszczenie, zawiera informacje o projektach, z których finansowano badania oraz dość obszerne wprowadzenie do tematyki badawczej. Następnie sprecyzowano cele i omówiono zastosowane modele badawcze. Omówienie poszczególnych publikacji wchodzących w skład cyklu zakończono podsumowaniem i wnioskami. Do rozprawy załączono oświadczenie dotyczące udziału poszczególnych autorów w badaniach oraz informacje o całkowitym dorobku naukowym Doktorantki. Układ rozprawy doktorskiej oceniam bardzo pozytywnie.

Wprowadzenie teoretyczne wykonane zostało w oparciu o 134 pozycje literaturowe, dobrze dobrane, obejmujące informacje z badań przeprowadzonych w ostatnich kilku latach. Dyskusja wyników badań własnych to kolejne pozycje literaturowe, po kilkadziesiąt w każdej z opublikowanych prac, oraz dodatkowa 135 pozycja.

Po wprowadzeniu teoretycznym dotyczącym procesów epigenetycznych, z naciskiem na modyfikacje potranslacyjne białek i dokładniejszym scharakteryzowaniu dwóch głównych „bohaterów” rozprawy – metylotransferazy G9a i lizynospecyficznej demetylazy 1 oraz informacjach o biologii śródbłonka sformułowano Cele pracy.

Szczegółowe cele: 1. określenie roli metylotransferazy G9a w regulacji kondensacji chromatyny, potencjału proliferacyjnego komórek śródbłonka i utrzymaniu homeostazy redoks, 2. identyfikacja wpływu procesu demetylacji, warunkowanej aktywnością LSD1 na kształtowanie architektury chromatyny oraz regulację proliferacji komórek śródbłonka, 3. zdefiniowanie roli lizyno-specyficznej demetylazy 1 w regulacji odpowiedzi zapalnej śródbłonka, zrealizowano w oparciu o badania na komórkach śródbłonka naczyniowego pochodzenia mikronaczyniowego (HMEC-1) oraz żylnego (HUVECs). Oryginalnym podejściem było równoległe zastosowanie dwóch modeli badawczych, farmakologicznego z zastosowaniem inhibitorów badanych białek oraz transkrypcyjnego polegającego na wyciszaniu ekspresji. Pozwoliło to na obserwacje niespecyficzność stosowanych inhibitorów w modelu farmakologicznym oraz niepełną represję genów w modelu transkrypcyjnym.

Część eksperymentalna oraz omówienie wyników została zawarta w 3 pracach eksperymentalnych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym poprzedzonych publikacją przeglądu literaturowego dotyczącego funkcjonowania śródbłonka naczyniowego modulowanego przez składniki diety przez pryzmat zjawisk epigenetycznych. Łączna punktacja zamieszczonych publikacji wg. MEN to 450 punktów i łączny IF = 18,867. Zamieszczone w rozprawie prace były cytowane łącznie już 38 razy. Doktorantka obszernie omówiła zawarte w poszczególnych pracach tezy, procedur badawcze, wyniki oraz wnioski z nich wynikające. Prace badawcze stanowiące cykl prezentowanej rozprawy doktorskiej zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez zespoły redakcyjne i niezależnych recenzentów prestiżowych czasopism naukowych, co potwierdza, że podjęte badania były prawidłowo zaplanowane i właściwie zrealizowane.

Do najciekawszych efektów przeprowadzonych badań niewątpliwie należą obserwacje dotyczące oddziaływania G9a HMT na metylację i przebudowę chromatyny oraz proliferację śródbłonka i komórkowe procesy redoks. W publikacji nr 2. stwierdzono wpływ G9a HMT na progresję cyklu komórkowego śródbłonka oraz wykazano że aktywność metylotransferazy G9a jest kluczowa w angiogenezie *in vitro*. Hamowanie aktywności metylotransferazy G9a zmniejszało produkcję RFT oraz podnosiło zdolności antyoksydacyjne komórek. W kolejnych pracach (3 i 4) poświęconych lizyno-specyficznej demetylacji 1, wykazano jej wpływ na organizację chromatyny, regulację cyklu komórkowego poprzez regulację aktywacji kinazy Chk1, wpływ na stabilność genetyczną komórek śródbłonka poprzez udział w aktywacji białek naprawy DNA. Dodatkowo, LSD1 moduluje odpowiedź prozapalną śródbłonka na endotoksynę bakteryjną LPS. Aktywacja transkrypcji genów prozapalnych zależna od czynnika transkrypcyjnego NFκB wspierana jest przez LSD1.

W oparciu o przeprowadzone badania sformułowano dwa podstawowe wnioski:

- *Oba badane białka, metylotransferaza G9a oraz lizyno-specyficzna demetylaza 1, należące do grup enzymów o przeciwstawnym działaniu, zaangażowane są w modulowanie fundamentalnych procesów komórkowych śródbłonka. Ich antagonistyczne działanie, niezbędne w przypadku progresji cyklu komórkowego, podkreśla możliwość terapeutycznego wykorzystania obu białek w ograniczaniu dysfunkcji śródbłonka naczyniowego.*
- *Prozapalny charakter LSD1 daje przesłanki ku manipulacji aktywnością enzymu w celu zapobiegania chorobom układu krążenia w ich wczesnej fazie, tj. na etapie aktywacji śródbłonka. We wspomnianych patologiach hamowanie aktywności LSD1 mogłoby przyczynić*

się do ograniczenia reakcji zapalnej i przywrócenia fizjologicznego profilu aktywności endothelium.

Są one odpowiedzią na postawione pytania w celach pracy, ale i wskazują na potencjalne zastosowanie wyników badań w praktyce. Dają podstawę do wdrażania nowych rozwiązań terapeutycznych w chorobach związanych z dysfunkcją śródbłonna naczyń krwionośnych. Wpisuje się to w nurt badań dotyczących modulowania procesów zapalnych w takich jednostkach chorobowych jak miażdżyca, choroba niedokrwienna serca czy nowotwory.

Bardzo istotnym podjętym w pracy problemem jest powiązanie stresu oksydacyjnego, procesów prowadzących do niestabilności genetycznej z mechanizmami epigenetycznymi, których udział w patomechanizmie różnych chorób, szczególnie „cywilizacyjnych” stał się faktem.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie wiele mogłem tu zdziałać. Rozprawa napisana ładnym językiem z zachowaniem dobrego stylu, czyta się z przyjemnością. Tylko na stronie 91 drobny błąd w ostatnim zdaniu dotyczy frazy ...*zatem może być ona aspirować do celu...*

Z innych nieścisłości chciałbym wskazać zdanie ze str.25 ... *Utlenione LDLs sprzyjają także przekształceniu makrofagów do komórek piankowatych, które przylegając do ściany naczynia, stanowią pierwszy etap w tworzeniu się blaszki miażdżycowej...* Przyleganie do ściany naczynia różnych komórek jest naturalną konsekwencją zmian w uszkodzonym śródbłonie i często towarzyszy inicjacji procesu zapalnego. Monocyty krążące we krwi, nawet obciążone oksy-LDL nadal będą monocytami dopóty dopóki nie opuszczą światła naczynia. Zmiana miażdżycowa rozpoczyna się od uszkodzenia śródbłonna ale toczy się w ścianie naczynia, pierwotnie pod śródbłonkiem.

Sprowokowany tą nieścisłością chciałbym dopytać Doktorantkę, czy zna cele terapeutyczne przeciwzapalne w przebiegu miażdżycy. Jakie związki znalazły zastosowanie?

We wstępie poruszono temat modyfikacji epigenetycznych w DNA w postaci metylacji cytozyny. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić znaczenie tej modyfikacji w regulacji ekspresji genów i powiązać to z tematyką dotyczącą swojej pracy?

Analizując przedstawione publikacje oraz określone udziały poszczególnych autorów w ich powstanie, należy stwierdzić, że Doktorantka opanowała bardzo dobrze warsztat metodyczny, począwszy od podstawowych technik laboratoryjnych poprzez techniki immunochemiczne aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Wieloautorskie prace, w których mgr Martyna Wojtala jest wiodącym autorem, wskazują na umiejętności Doktorantki współpracy w zespołach badawczych, co niewątpliwie świadczy o Jej dojrzałości naukowej. W skład całkowitego dorobku naukowego Doktorantki wchodzi dodatkowo 5 artykułów w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz udział w dwóch konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i 14 o zasięgu krajowym. Należy podkreślić, że mgr Wojtala swoje doświadczenie wzbogaciła również w zakresie realizacji projektów badawczych. Była kierownikiem projektu Preludium, wykonawcą w dwóch projektach Pani Promotor oraz otrzymała trzykrotnie dotację celową na dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów

doktoranckich. Jest to doświadczenie, którym mogą się pochwalić nie wszyscy naukowcy ze znacznie dłuższym stażem.

Podsumowując, w oparciu o ocenę zbioru prac stanowiących osiągnięcie naukowe, przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz dorobku naukowego stwierdzam, że mgr Martyna Wojtala spełnia wymogi dotyczące ubiegania się o nadanie stopnia doktora określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Martyny Wojtali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Martyny Wojtali.

Jako uzasadnienie pragnę podkreślić bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej oraz fakt, że wyniki badań przeprowadzonych w doktoracie w całości zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Nowatorskość badań oraz ich rangę podkreślają cytowania tych prac przez innych autorów. Na dzień dzisiejszy jest to już wg. bazy Scopus 42 cytowania. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wykonane zostały przy użyciu wyrafinowanych technik biologii molekularnej, które są powszechnie akceptowane przez naukowców zajmujących się tą tematyką. Sformułowane wnioski z przeprowadzonych badań wskazują na wysoki potencjał zastosowania uzyskanych informacji w opracowywaniu strategii terapeutycznych dla chorób przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyń krwionośnych.

KIEROWNIK
Katedra Biochemii Klinicznej

dr hab. Marek Foksiński, prof. UMK