



Dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN
Pracownia Sygnalizacji Komórkowej
Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Łódź, 11 kwietnia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Martyny Wojtali

pt.,,Zmiany statusu metylacji reszt lizynowych białek determinowane aktywnością metylotransferazy G9a i lizyno-specyficznej demetylazy 1 jako modulator funkcji komórek śródbłonna naczyńowego”

Utrzymanie tkankowo-specyficznej ekspresji genów jest procesem złożonym i regulowanym na wielu poziomach. W przypadku transkrypcji zmiana ekspresji genów nie zależy tylko od sekwencji DNA, ale także od modyfikacji epigenetycznych, które determinują dostęp aparatu transkrypcyjnego do genów. Poznane modyfikacje epigenetyczne są ze sobą integralnie połączone i są rezultatem działania różnych grup enzymów (min. metylaz, demetylaz, acetylaz, deacetylaz). W przeciwieństwie do zmian na poziomie genetycznym modyfikacje epigenetyczne są z reguły odwracalne, dlatego mogą być potencjalnym celem działania farmakoterapii i stanowią przedmiot intensywnych badań. Cykl prac składających się na rozprawę Pani mgr Martyny Wojtali niewątpliwie wpisuje się w ten obszar badawczy.

Badania Pani mgr Martyny Wojtali opisane w przedłożonej mi do recenzji rozprawie doktorskiej dotyczą roli jaką pełni status metylacji reszt lizynowych białek w regulacji funkcjonowania komórek śródbłonna. Ze względu na to, że komórki śródbłonna wyściełają wnętrza naczyń krwionośnych i są kluczowym elementem licznych procesów wewnątrznaczyniowych, a ich dysfunkcja związana jest z takimi stanami patologicznymi, jak: miażdżycy, restenoza czy nowotwory wybór modelu eksperymentalnego uważam za słuszny a

zarazem interesujący do realizacji celów badawczych w ramach pracy doktorskiej. Dodatkowo przeprowadzenie badań w kontekście nieopisanych dotychczas aktywności elementów maszynarii epigenetycznej, tj. metylotransferazy histonowej G9a (G9a HMT) oraz lizynospecyficznej demetylazy 1 (LSD1) pozwala na poszerzenie wiedzy na temat wciąż nie do końca poznanych molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłową aktywność komórek śródbłonka. Cele szczegółowe pracy, które obejmowały analizę kluczowych funkcji komórek śródbłonka, min. potencjału proliferacyjnego czy odpowiedzi zapalnej podkreślają wartość zrealizowanej pracy badawczej.

Pracę doktorską Pani mgr Martyny Wojtali stanowi zbiór czterech spójnych tematycznie prac, jednej przeglądowej i trzech eksperymentalnych, o sumarycznym współczynniku IF=18, 67. Kopie publikacji wraz oświadczeniami współautorów zostały włączone do rozprawy doktorskiej. Wszystkie wyniki badań wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w uznanych, międzynarodowych czasopismach, tj. praca przeglądowa została opublikowana w *BioFactors*, a prace eksperymentalne w *Pharmacological Research*, *Cells* oraz *Cellular Physiology and Biochemistry*. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich czterech pracach. Dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają wątpliwości co do jej kluczowej roli w przygotowaniu koncepcji badań oraz wiodącej roli w ich realizacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu do publikacji, co świadczy o tym, że Doktorantka posiada ustawową umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Do cyklu prac dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim. W mojej opinii przedstawiony do oceny zbiór publikacji spełnia formalne wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami).

Omówienie poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poprzedzone jest informacją o finansowaniu badań oraz rozdziałem pt. *Wprowadzenie do tematyki badawczej*. Rozdział ten prezentuje w sposób jasny i zrozumiały aktualny stan wiedzy oraz główne problemy badawcze, zarówno w kontekście epigenetycznym, jaki i biologii komórek śródbłonka. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że Doktorantka przedstawia przedmiot swoich badań w sposób dojrzały i przemyślany opierając się nie tylko na doniesieniach najnowszych, ale również starszych, fundamentalnych dla tego nurtu badań. W spisie 135 pozycji literaturowych zacytowanych w rozprawie znalazły się min. praca pt. „*Mechanisms of angiogenesis*”, która ukazała się w 1997 w czasopiśmie *Nature* (referencja 104 w spisie literatury) czy też praca pt. „*Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes*”, która pochodzi z *Nature*, z roku 2007 (referencja 78

w spisie literatury). Zakończenie tego rozdziału zawiera omówienie przesłanek do sformułowania głównej hipotezy badawczej rozprawy doktorskiej. W następnym rozdziale Doktorantka przedstawia cel pracy, którym było określenie wpływu zmian statusu metylacji reszt lizynowych białek warunkowanych aktywnością metylotransferazy histonowej G9a i lizyno-specyficznej demetylazy 1 na wybrane elementy topografii chromatyny i funkcje śródbłonka naczyńniowego. Przedstawione w dalszej części cele szczegółowe oraz krótki komentarz, czego nie należy się spodziewać w pracy, znacznie ułatwiają ocenę przeprowadzonych badań. W następnym rozdziale Doktorantka opisała materiał i modele badawcze. Do swoich badań wybrała komórki śródbłonka pierwotne izolowane z żyły pępowinowej (z ang. HUVECs) oraz linie komórkową śródbłonka mikronaczyń (z ang. HMEC-1). Oba modele komórek są standardowym modelem stosowanym w badaniach funkcjonalnych śródbłonka *in vitro*. Do analizy aktywności G9a HMT oraz LSD1 doktorantka zaproponowała dwa podejścia eksperymentalne, a mianowicie farmakologiczne blokowanie aktywności za pomocą inhibitorów lub wyciszenie ekspresji enzymów za pomocą shRNA. W mojej ocenie zastosowanie dwóch różnych podejść eksperymentalnych znacznie podnosi wartość naukową otrzymanych wyników. Ponadto do realizacji wszystkich zaplanowanych celów szczegółowych zostało wykorzystane całe spektrum różnorodnych i nowoczesnych technik badawczych wśród, których chciałabym wymienić: 1) metody do oceny ekspresji genów i obecności białek w komórce, takie jak: PCR w czasie rzeczywistym, identyfikacja profili ekspresji genów za pomocą mikromacierzy RNA, Western Immunoblotting, immunocytochemia, cytometria przepływową, mikroskopowa ocena lokalizacji białek w komórce, 2) testy funkcjonalne komórek - ocena przeżywalności, proliferacji i cyklu komórkowego, pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, pomiar produkcji reaktywnych form tlenu, test kometkowy do oceny uszkodzeń DNA oraz 3) podstawowe metody specyficzne do oceny funkcji komórek śródbłonka, jak tworzenie struktur kapilaropodobnych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Taki zestaw metod umożliwił Doktorantce wielowymiarową analizę problemu badawczego oraz dał solidną podstawę do formułowania wniosków końcowych.

Cykl prac stanowiących rozprawę doktorską rozpoczyna praca przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie *BioFactors*, pt. *Modulation of the vascular endothelium functioning by dietary components, the role of epigenetics*. Praca ta w sposób klarowny i spójny wyjaśnia powiązania składników diety z funkcjonowaniem składników maszynarii epigenetycznej w komórkach śródbłonka i świadczy o doskonałej znajomości tematyki badawczej przez Doktorantkę. Ponadto powiązania te zostały zilustrowane w przejrzysty sposób na 3 rycinach, co dodatkowo zwiększa wartość naukową pracy a jednocześnie czyni ją bardziej przystępną dla

niespecjalistów. Lektura tej pracy była też niemałym zaskoczeniem dla mnie, bo uświadomiła mi, że składniki diety mogą bezpośrednio oddziaływać nawet na histony i teraz rozumiem na czym może polegać fenomen popularnej ostatnio diety sirtfood. Najważniejszą jednak częścią rozprawy Pani Martyny Wojtali stanowią oryginalne wyniki przedstawione i przedyskutowane w trzech pracach eksperymentalnych. Do najbardziej wartościowych i oryginalnych wyników uzyskanych podczas realizacji rozprawy doktorskiej i przedstawionych w publikacjach eksperymentalnych cyklu, zaliczyłabym:

1. Potwierdzenie roli G9a HMT w regulacji cyklu komórkowego i stymulacji proliferacji komórek śródbłonka. W szczególności ocenę zaangażowania G9aHMT w regulację ekspresji genów *RBI* i *P21* oraz aktywności białka Chk1 odpowiadających za prawidłowe funkcjonowanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego.
2. Potwierdzenie zaangażowania LSD1 w regulację cyklu komórkowego oraz naprawę uszkodzeń DNA w komórek śródbłonka dużych naczyń i mikronaczyń.
3. Pokazanie roli LSD1 w regulacji odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonka na lipopolisacharyd (LPS). Szczególnie istotna jest analiza zmiany profilu cytokin zależna od LSD1, która wskazuje na zaangażowanie LSD1 w proces rekrutacji i adhezji limfocytów do śródbłonka.
4. Powyższe wyniki sugerują, że zarówno G9aHMT oraz LSD1 może być wykorzystana jako cel terapeutyczny w leczeniu zaburzeń związanych z nadmierną proliferacją komórek śródbłonka i niepożądaną angiogenezą, która może mieć miejsce podczas długotrwałej reakcji zapalnej lub w trakcie rozwoju pierwotnych guzów nowotworowych i przerzutowania komórek rakowych do odległych organów.

Na podstawie powyższego podsumowania wyników stwierdzam, że Doktorantka w sposób oryginalny i nowatorski przeanalizowała i opisała funkcje G9aHMT oraz LSD1 w śródbłonku. Biorąc jednak pod uwagę obowiązki recenzenta związane z krytycznym spojrzeniem na ocenianą rozprawę doktorską chciałabym poddać pod rozwagę Doktorantki następujące uwagi i spostrzeżenia:

1. W wykazie skrótów widać pewną niekonsekwencję, brak jest opisu dla G9a HMT, a rozwinięcie dla LSD-1 zostało zamieszczone.
2. We wprowadzeniu do tematyki badawczej Doktorantka nie uniknęła błędów i uproszczeń, np. używając sformułowań, „ w wyróżnicowanej komórce” (str.8), nie bardzo wiem co to znaczy wyróżnicowany. W opisie modyfikacji potranslacyjnych histonów (str.8) Doktorantka stwierdziła, że „mają one zasadnicze znaczenie w ustawieniu konformacji

chromatyny i wpływają na jej reorganizację”. Moim zdaniem w tym przypadku nie można użyć spójnika „i” bo nie są to równoległe zachodzące zjawiska, ale jedno jest konsekwencją drugiego, czyli reorganizacja chromatyny determinuje ustawienia konformacji chromatyny. Co do sformułowania „imprinting genomowy” (str.12) wydaje mi się, że jest polski odpowiednik nazwy tego zjawiska. Zaliczenie kancerogenezy oraz stanu zapalnego obok chorób autoimmunologicznych czy infekcji wirusowych (str.9) do wielu chorób związanych z modyfikacjami potranslacyjnymi, moim zdaniem jest błędne, kancerogeneza oraz stan zapalny to raczej proces a nie jednostka chorobowa. Nie wiem co Doktorantka miała na myśli pisząc „immunogenna śmierć komórek nowotworowych” (str.13). W ostatnim akapicie na str.15 Doktorantka opisuje w jakich nowotworach zaobserwowano zmianę ekspresji LSD1 i dodaje, że rak to potencjalna jednostka chorobowa, w której można by dla celów terapeutycznych hamować aktywność LSD1. Dlaczego tylko w raku, a nie w białaczce wymienionej w zdaniu poprzedzającym ? Na stronie 18 niezrozumiałe dla mnie jest użycie sformułowania, „ transdukcja dziedziczenia chorób sercowo-naczyniowych” czy w tym wypadku używanie słowa transdukcja analogicznie do transdukcji/przekazywania sygnału komórkowego jest prawidłowe ? Na stronie 21 w opisie modeli badawczych Doktorantka napisała o „namnażaniu wektorów” to żargon laboratoryjny. Plazmidy jak każde DNA mogą być powielane w E.coli. Na stronie 22 w opisie transfekcji HMEC-1 użyto stwierdzenia, „ pusty wektor”. To też jest żargon laboratoryjny. Myślę, że podanie pełnej nazwa wektora zupełnie by wystarczyło. Do tej części mam też pytanie, o sposób oczyszczania plazmidów z bakterii, czy użyto zestawu usuwającego dodatkowo endotoksyny bakteryjne. E.coli jest bakterią Gram ujemną i posiada w swojej ścianie duże ilości LPS. Użycie takiego zestawu może mieć znaczenie w przypadku analizy odpowiedzi zapalnej. Na str.17 użyte zostało niefortunne sformułowanie „angiogeneza rany”, które jest dosłownym tłumaczeniem tytułu z języka angielskiego, a przecież cytowana praca dotyczy analizy angiogenezy w procesach naprawy tkanek za pomocą metody badawczej nazywanej testem gojenia rany (ang. wound healing). Na tej samej stronie Doktorantka zaliczyła błędnie nowotwory do powikłań naczyniowych.

3. Doktorantka wielokrotnie używa we wstępie oraz w omówieniu prac wyrażenia „wysoki poziom ekspresji” (str.12), „zmieniony profil ekspresji” (str.15) itp. Czy doktorantka ma tu na myśli ekspresję genów czy produkty ekspresji genów czyli białka ? Tym bardziej, że część cytowanych prac dotyczy nie tylko analizy ekspresji genu, ale i poziomu białka, np. ref. 53. Brak takiego jasnego opisu i rozgraniczenia zwłaszcza, że jedno i drugie zjawisko jest przedmiotem badań w rozprawie, wprowadza brak jednoznaczności i precyzji w opisie

- przedmiotu badań, jaki i wyników własnych. Nie wiem z czego to wynika, może z braku konsekwencji, bo na str.22 Doktorantka bardzo dobrze rozgraniczyła proces ekspresji genów od produkcji białek, w części dotyczącej metod badawczych, a na str.42 opisała bardzo precyzyjnie geny *RBI IP21* stosując ogólnie przyjęte zasady (duża litera, kursywa)
4. Dlaczego komentarz, dotyczący tego, że zaproponowane badania nie wskazują na konkretne oddziaływania białko-enzym, znalazł się tuż pod celami badawczymi. To raczej asekuracyjne zdanie powinno znaleźć się w dalszej części np. w podsumowaniu. Nie można być aż tak pokornym i skromnym i pomniejszać wartość swojej pracy już na etapie celów badawczych.
 5. W części teoretycznej oraz/lub w opisie badań brakuje mi ważnej informacji dotyczącej opisu modelu badawczego śródbłonna, a mianowicie, że komórki pierwotne HUVEC różnią się od linii HMEC-1 nie tylko tym, że są pierwotne ale, że reprezentują śródbłonek dużych naczyń. Myślę, że podkreślenie tego faktu w pracy jeszcze bardziej wzmocniłoby jej wartość.
 6. W rozprawie wielokrotnie pojawiają się frazy dosłowne tłumaczone z języka angielskiego, które nieco udziwniają tekst w języku polskim, np. ustanowienie krajobrazu epigenetycznego (str.27), aktywność G9a HMT osłabia ekspresję genów *RBI IP21* (str.42), dopełniając obraz (str.42), sprowokował analizy (str.42) podążając za obserwacjami (str.43), dane ...ukazują istotną rolę (str.43), analiza funkcjonalna zidentyfikowanych genów wyłoniła (str.90), oba modele eksperymentalne ujawniają prozapalny charakter lizyno-specyficznej demetylazy 1 (str.91)
 7. Doktorantka nie uniknęła innych nieścisłości, np. na stronie 41 napisała, „Rozregulowanie proliferacji jest cechą charakterystyczną wielu patologii, w tym zaburzeń proliferacji naczyń..” Moim zdaniem rozregulowanie to to samo co zaburzenia. W podsumowaniu wyników na str.61 fragment „ Uzyskane wyniki badań świadczą o niewątpliwym udziale LSD-1 w progresję cyklu komórkowego i naprawę DNA...” powinien brzmieć ; „ Uzyskane wyniki badań świadczą o niewątpliwym zaangażowaniu LSD-1 w progresję cyklu komórkowego i naprawę DNA...”
 8. W rozdziale „Podsumowanie wyników” (str.115) Doktorantka nieprecyzyjnie podsumowała wyniki dotyczące G9a HMT pisząc, że „ G9a pełni rolę stymulatora proliferacji komórek śródbłonna i regulatora cyklu komórkowego za sprawą aktywacji kinazy Chk1 i białek Rb1 oraz p21”. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują, że G9a wpływa na poziom ekspresji genów *RBI i P21*, a nie aktywację białek Rb21 i p21

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej mi rozprawy. Mam nadzieję, że Doktorantka przyjmie je jako cenne wskazówki, przydatne w jej dalszej karierze naukowej. Po lekturze rozprawy mam również kilka pytań, które wynikają przede wszystkim z zainteresowania tematyką badawczą oraz odnoszą się do głównych wniosków przedstawionych przez Doktorantkę w rozprawie.

1. Jeśli badania doktorantki pokazały, że G9a HMT oraz LSD-1 to potencjalne cele terapeutyczne w nowotworach, to proszę Doktorantkę o komentarz co należy zrobić dalej, aby oba enzymy zostały takimi faktycznymi celami terapeutycznymi w stosowanym leczeniu. Czy można je dodać do obecnie stosowanych terapii, aby zwiększyć efektywność leczenia ?
2. Czy stosowanie inhibitorów G9a HMT i LSD-1 będzie tak samo efektywne w stosunku do guza nowotworowego i jego naczyń biorąc pod uwagę fakt, że komórki nowotworowe z mają zwykle zaburzone procesy regulacji epigenetycznej? Czy hipoksja wszechobecna w guzach nowotworowych oraz stanowiąca główny czynnik proangiogeny może w jakikolwiek sposób wpływać na aktywność G9a HMT oraz LSD-1?

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Martyny Wojtali spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Przedmiotem cyklu prac składających się na rozprawę jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W poszczególnych rozdziałach rozprawy Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań. Dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów badań potwierdzają, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. A zatem zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Martyny Wojtali do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

