

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt., „Wpływ inhibicji deiminaz peptydyloargininowych oraz wyciszenia genu *PAD4* na wybrane funkcje komórek śródbłonna oraz parametry epigenomu”

wykonanej przez mgr Oskara Ciesielskiego

pod kierunkiem dr hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ

w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Instytutu Biofizyki, Uniwersytetu Łódzkiego

1

Zmiany epigenetyczne (metylacja DNA, modyfikacje białek histonowych czy interferencja RNA), obok najważniejszej informacji zapisanej w sekwencji DNA, regulują ekspresję genów. Mechanizmy epigenetyczne odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu stabilności ekspresji genów, określają czy dane geny powinny być włączone lub wyłączone, co jest niezbędne do budowy i funkcjonowania różnorodnych tkanek w organizmie. Opisano, że modyfikacje potranslacyjne histonów, nie tylko regulują ekspresję genów, ale mogą także wiązać się z aktywacją niektórych szlaków sygnałowych, kiedy zmienione białka histonowe jako aktywne cząstki są uwalniane z komórek pod wpływem uszkodzenia lub śmierci komórki.

Modyfikacje biochemiczne na szlaku ekspresji genu są wynikiem działania różnych enzymów, w tym metylaz, demetylaz, acetylaz, deacetylaz, kinaz, fosfataz czy deiminaz, które regulują procesy metylacji, acetylacji, fosforylacji czy cytrulinacji białek histonowych, wpływają na strukturę chromatyny i modyfikacje DNA. Metylacja jest najbardziej znaną modyfikacją, a jej rolę opisano w patogenezie różnego typu chorób. Zaburzenia homeostazy w aktywności enzymów metylujących DNA, a także enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje potranslacyjne białek histonowych są podstawą transformacji nowotworowej. Do często opisywanych modyfikacji należy acetylacja, która jest procesem odwracalnym, zaangażowanym w utrzymanie homeostazy organizmu, choć odpowiada także za proliferację komórek nowotworowych, mobilność, potencjał metastatyczny oraz oporność na chemioterapię. Fosforylacja prowadzi do wzmożonej ekspresji genów przez rozluźnienie struktury chromatyny, a zaburzenia w fosforylacji białek są obserwowane w wielu stanach patologicznych. Ze względu na duże znaczenie zmian epigenetycznych wynikających z metylacji, fosforylacji czy acetylacji w występowaniu i przebiegu chorób poszukuje się możliwości terapeutycznych z zastosowaniem związków modyfikujących te procesy.

Najmniej poznana jest cytrulinacja (deiminacja), modyfikacja potranslacyjna białek polegająca na zmianie argininy do niestandardowego aminokwasu cytruliny, reakcja ta jest katalizowana przez enzymy zależne od Ca^{2+} peptydyloargininowe deiminazy (ang. *peptidylarginine deiminases*, PADs). Wykazano, że cytrulinacja znacząco zmienia strukturę, stabilność i funkcję białek, przez co wpływa na przebieg procesów fizjologicznych i patologicznych, w tym ekspresję genów, reakcje zapalne czy metastazę. Zwiększoną ekspresję i/lub aktywność PADs, ze szczególną rolą wybranych izoform deiminaz (PAD1 – PAD4, PAD6), zaobserwowano w reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu

rozszanym, w chorobach neurodegeneracyjnych czy nowotworowych. Najbardziej znacząca deiminaza, PAD4, odgrywa rolę w procesie nowotworzenia poprzez wpływ na ekspresję p53, oraz jest silnie powiązana z patogenezą miażdżycy naczyń krwionośnych przez modulowanie funkcji chemokin czy powstawania neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (ang. *Neutrophil Extracellular Traps*, NETs). Ze względu na znaczenie fizjologiczne czy rolę w stanach patologicznych cytrulinacji, prowadzi się badania nad opracowaniem skutecznych inhibitorów PADs. Z grupy dotychczas opisanych inhibitorów, najlepsze wyniki uzyskano dla pochodnych haloacetamidyny: CL-amidyna (CLA) i F-amidyna (FA), dla których zakres IC₅₀ wynosi 1,9 – 22 µM i które wykazują aktywność wobec PAD4 w układach in vitro i in vivo. Inhibitor drugiej generacji, BB-CL-amidyna (BB-CLA), również z grupy inhibitorów nieselektywnych wobec izoform PADs, wykazuje się dłuższym czasem półtrwania w osoczu, lepszą dostępnością komórkową oraz jego działanie opisano w wielu mysich modelach chorób. Opracowano także inhibitory specyficzne wobec PAD2 czy PAD4, jednak trwają badania nad nowymi związkami o wyższej specyficzności i możliwości zastosowania w leczeniu chorób, szczególnie o podłożu autoimmunologicznym czy nowotworowych.

Śródbłonek naczyniowy, rozszany organ endokrynnny, pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Substancje wydzielane przez komórki śródbłonnka działają lokalnie lub na odległość, regulują czynność układu krążenia, odpowiadają za przepuszczalność ściany naczyniowej, determinują jej strukturę i przebudowę oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Śródbłonek jest częścią układu hemostazy oraz reguluje procesy zapalne. Dysfunkcja śródbłonnka wiąże się z rozwojem i przebiegiem wielu chorób (miażdżycy, choroby sercowo-naczyniowej), ma również znaczenie w przerzutowości nowotworowej, stłuszczeniu wątroby, chorobach neurodegeneracyjnych i innych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Oskara Ciesielskiego dotyczy analizy znaczenia deiminaz peptydyloargininowych (ang. *peptidylarginine deiminases*, PADs) oraz cytrulinacji białek w regulacji funkcji komórek śródbłonnka. Hipoteza badawcza pracy dotycząca roli aktywności PADs i cytrulinacji białek w regulacji funkcji śródbłonnka, została zweryfikowana na podstawie przeprowadzonych badań. Tematyka pracy jest nowatorska, a uzyskane wyniki dobrze uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat udziału deiminaz peptydyloargininowych w funkcjonowaniu i epigenetycznej regulacji działania komórek śródbłonnka.

W pracy założone cele były realizowane na modelu komórek śródbłonnka naczyniowego z użyciem linii ludzkich prawidłowych komórek izolowanych z żyły pępowinowej (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) oraz unieśmiertelnionej linii ludzkich komórek śródbłonnka mikrowaskularnego (ang. *Human Microvascular Endothelial Cells*, HMEC-1) z zastosowaniem licznych dobrze dobranych metod. W pierwszym etapie pracy wykazano obecność dwóch izoform deiminaz peptydyloargininowych: PAD2 i PAD4 oraz cytrulinowanej formy histonu H3 (H3cit) w obu badanych typach śródbłonnka. Wyniki te pozwoliły na kontynuowanie badań z zastosowaniem 3 wybranych inhibitorów PADs: CL-amidyny (CLA), i F-amidyny (FA) i BB-CL-amidyny (BB-CLA). Po ocenie cytotoksyczności tych związków wobec HUVEC i HMEC-1, w dalszych analizach stosowano inhibitory w stężeniach bezpiecznych dla komórek. Najsilniej działającym cytotoksycznie związkiem okazał się BB-CLA, dla którego obliczono IC₅₀. CLA i FA nie powodowały istotnych spadków

przeżywalności, choć jak widać na Rys.V.2. F-amidyna istotnie obniżała przeżywalność HMEC-1 w zakresie stężeń od ok. 2 do 10 μ M bez znaczącego efektu dla HUVEC. Wyniki z testów proliferacji są raczej spójne z wynikami z testów przeżywalności, silne istotne hamowanie jest jedynie dla BB-CLA. Czy można wyjaśnić większą wrażliwość HMEC-1 na działanie FA czy raczej ta obserwacja to przypadek? Jaki mógłby być potencjalny mechanizm cytotoksycznego działania BB-CLA? Próbą odpowiedzi na to pytanie było badanie roli zahamowania aktywności PADs w odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny. Wyniki badania pokazały, że BB-CLA jak i CLA i FA nie wywoływały istotnych zmian w produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach czy nie powodowały uszkodzeń DNA, pomimo potencjalnych możliwości wiązania do DNA określonych w analizach *in silico*. Jednocześnie, badane inhibitory PADs wykazały aktywność protekcyjną przed działaniem nadtlenu wodoru (poprawiają przeżywalność HMEC-1, chronią przed uszkodzeniami DNA).

3

Dalsze analizy wykazały, że badane inhibitory PADs nie mają wpływu na cykl komórkowy, pomimo modyfikowania ekspresji wybranych cyklin. Badania potencjału angiogenego inhibitorów pokazały, że zarówno BB-CLA jak i CLA i FA istotnie zmniejszają migrację obu typów komórek śródbłónka oraz istotnie wpływają na organizację i parametry morfologiczne sieci kapilarnych, przy czym efekt hamowania tworzenia sieci pseudonaczyń przez FA był silniejszy dla HMEC-1 (istotny statystycznie) niż dla HUVEC (nieistotny statystycznie) w porównaniu do kontroli. Próba wyjaśnienia podstaw molekularnych hamującego działania badanych inhibitorów na etapy angiogenezy obejmowała ocenę profilu wydzielniczo-transkrypcyjnego ważnych regulatorów angiogenezy. Wnioski z tej części badania nie są jednoznaczne, choć Doktorant w dyskusji wyników za najważniejsze wskazuje zmiany w ekspresji i wydzielaniu VEGFA oraz PEDF wpływające na obniżenie potencjału angiogenego śródbłónka pod wpływem inhibitorów PADs. Ważną obserwacją jest wpływ inhibicji PADs na potencjał angiogeny śródbłónka poprzez hamowanie aktywacji szlaku PI3K/Akt na poziomie aktywacji kinazy Akt. Obniżenie fosforylacji Akt zostało także potwierdzone w modelu komórek HMEC-1 z wyciszoną ekspresją PAD4 KD. Zastosowanie modelu HMEC-1 PAD4 KD jest bardzo dobrym uzupełnieniem i potwierdzeniem do wyników uzyskanych z inhibitorami PADs, których efekty działania zostały zweryfikowane w niniejszej pracy poprzez ocenę poziomu cytrulinacji histonów w śródbłónku. W ostatniej części pracy opisane są obserwacje, które wskazują na istnienie potencjalnych pośrednich interakcji pomiędzy cytrulinacją i innymi potranslacyjnymi modyfikacjami histonów w śródbłónku.

Obserwacje i wyniki opisane w rozprawie doktorskiej mgr Oskara Ciesielskiego są wartościowe dla poznania zjawiska potranslacyjnej modyfikacji - cytrulinacji w komórkach śródbłónka. Opracowanie modelu śródbłónka z wyciszoną ekspresją PAD4 (HMEC-1 PAD4 KD) jest nowatorskim narzędziem do badania roli deiminaz i cytrulinacji. Wyniki uzyskane dla HMEC-1 PAD4 KD są zbieżne z zastosowanym modelem farmakologicznym. Uzyskane wyniki Doktorant szczegółowo i merytorycznie omawia w odniesieniu do badań opisanych przez innych autorów wskazując jednocześnie na potrzebę dalszych analiz i eksperymentów. Badania opisane przez Doktoranta bardzo dobrze wpisują się w profil tematyczny jednostki badawczej, w której została zrealizowana rozprawa doktorska, są także efektem współpracy międzynarodowej. Na uwagę zasługuje rozdział pracy „Uwagi końcowe i przyszłe kierunki badań”, w którym Doktorant podkreśla znaczenie wyników

własnych oraz określa potencjalne kierunki dalszych badań, także z udziałem własnym w ramach projektu Preludium 23 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

W niniejszej pracy, ocena wpływu zahamowania PADs na funkcje śródbłonna początkowa była prowadzona na modelu komórek prawidłowych HUVEC i komórek nieśmiertelnych HMEC-1, natomiast kolejne eksperymenty były jedynie na linii HMEC-1. Badania obecności poszczególnych izoform PADs czy cytrulinacji histonu H3 pokazały porównywalne poziomy tych markerów w obu typach komórek. Inne testy (przeżywalność, tworzenie sieci pseudonaczyń) nie dają tak jednoznacznych wyników. Czy zatem zawsze jest uzasadnione stosowanie linii nieśmiertelnych czy nawet nowotworowych do poszukiwania mechanizmów zjawisk biologicznych, w tym oceny potranslacyjnych modyfikacji i późniejsze odnoszenie uzyskanych wyników do tego co dzieje się w organizmie?

Z obowiązku recenzenta zwracam także uwagę na analizę statystyczną wyników. Zgodnie z opisem na str. 53 pracy oraz informacjami podanymi w legendzie wykresów, w analizie statystycznej zastosowano testy ANOVA, Dunnetta i t Studenta. Nie ma jednak informacji o sprawdzeniu założeń do stosowania tych testów. Ponadto, wskazana byłaby ostrożność do stosowania testów parametrycznych przy liczbie 3 niezależnych powtórzeń. Zwiększenie liczby powtórzeń poprawia moc testu.

Praca doktorska mgr O. Ciesielskiego obejmuje 2 części: 1) rozprawę, 2) tematyczny zbiór publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Pod względem edytorskim rozprawa doktorska przygotowana została bardzo starannie, z logicznym ułożeniem kolejnych rozdziałów pracy, bibliografią, przejrzystym spisem skrótów stosowanych w pracy, spisem rysunków i tabel. Praca napisana jest językiem naukowym, w oparciu o dobrze dobrane i aktualne piśmiennictwo (bibliografia obejmuje 312 cytowanych źródeł). Wstęp teoretyczny zawiera liczne rysunki, schematy oraz tabele, które stanowiąc wzbogacają tekst. Legendy do wykresów i tabel zawierają potrzebne informacje, poza nielicznymi przypadkami (Rys. I.12 – brak wyjaśnienia skrótów TF i TR; str. 30 – odwołanie w tekście do Rys. I.16, jest I.1; niedokładny opis A i B na Rys. V.3). W tekście zdarzają się nieliczne literówki i niefortunne sformułowania (np. powstanie aktywnego centrum aktywnego str.11 lub „komórki traktowane były badanymi stężeniami inhibitorów” zamiast „badanymi inhibitorami w stężeniach” str. 38), co nie wpływa na właściwe zrozumienie treści.

Druga część pracy doktorskiej zawiera dwie spójne tematycznie publikacje, w których mgr O. Ciesielski jest pierwszym autorem z wkładem autorskim szacowanym na 55% (publikacja przeglądowa w Cell Mol Life Sci IF 6,2 za 2023; MNiSW 140) i 70% (publikacja badawcza w Cell Physiol Biochem IF 2,5 za 2023; MNiSW 140). Publikacja przeglądowa zawiera szerokie omówienie zjawiska cytrulinacji w chorobach zapalnych i autoimmunologicznych, poprzedzone wyjaśnieniem podstaw reakcji cytrulinacji. Natomiast druga publikacja opisuje wyniki badań nad rolą hamowania deiminaz peptydyloargininowych (PADs) w aktywności angiogennej komórek śródbłonna. Obie publikacje zostały przygotowane w ramach współpracy międzynarodowej.

Inne uwagi, które nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy:

- skrót TF został w pracy użyty do wyjaśnienia po pierwsze czynnika tkankowego (ang. *tissue factor*), po drugie czynników transkrypcyjnych (ang. *transcription factors*). W pracy

można było wprowadzić różne skróty dla obu nazw lub posługiwać się skrótem TF tylko do jednej wybranej nazwy.

- str. 9, niewłaściwe określenie „włosy szczurów” zamiast „sierść szczurów”
- nieprawidłowy zapis wyników, np. str. 55: jest $1,75 \mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}$ powinno być $1,75 \pm 0,13 \mu\text{M}$. Ta sama jednostka jest dla średniej i odchylenia standardowego.

5

W skład dorobku naukowego Doktoranta wchodzi współautorstwo 7 publikacji w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w tym w 4 publikacjach jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorant jest współautorem rozdziału w anglojęzycznej monografii, oraz 13 prezentacji i posterów konferencyjnych na naukowych konferencjach krajowych i międzynarodowych. Na uwagę zasługuje doświadczenie badawcze Doktoranta, kierowanie projektami (grant NCN Preludium, Diamentowy Grant, Studencki Grant Badawczy UŁ) oraz udział w realizacji międzynarodowego projektu NAWA Polonium. Mgr O. Ciesielski jest laureatem wielu nagród i wyróżnień za pracę naukową i aktywność społeczną, jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, opiekunem studentów zagranicznych w ramach programów Erasmus+ i Mobility Direct na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ, czynnie uczestniczy w organizowaniu i prowadzeniu warsztatów i wydarzeń promujących naukę.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska magistra Oskara Ciesielskiego jest nowatorska i wnosi wartości poznawcze uzupełniające dotychczasową wiedzę na temat zjawiska cytrulinacji i hamowania aktywności deiminaz peptydyloargininowych w komórkach śródbłonna. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr. Oskara Ciesielskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto z uwagi na bardzo wysoką wartość poznawczą, a w przyszłości aplikacyjną wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej właściwą nagrodą.

Łódź, 24 kwietnia 2025 roku