Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Julity Pietrzak

pod tytułem

„Oddziaływanie PARP1 z chromatyną jako mechanizm regulujący nabywanie tolerancji na bakteryjną endotoksynę przez ludzkie monocyty i makrofagi"

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr **Julity Pietrzak** została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Praca doktorska była realizowana przy wsparciu finansowym pochodzącym z grantu Narodowego Centrum Nauki SONATA nr DEC-2013/11/D/NZ2/00033 pt. „Transkrypcyjno-epigenetyczna rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w warunkowaniu ekspresji czynników prozapalnych kontrolowanych przez oś NF-kappaB w mieloidalnych komórkach efektorowych", którego kierownikiem była Promotorka pracy doktorskiej Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ oraz środków Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy zagadnień związanych z molekularnymi mechanizmami odpowiadającymi za nabywanie immunotolerancji komórek układu odpornościowego – monocytów oraz makrofagów na endotoksynę bakteryjną lipopolisacharyd (LPS). W szczególności doktorantka skoncentrowała swoje badania na ocenie roli białka PARP1 oraz procesu poli(ADP-rybozylacji) w tym procesie. Doktorantka wykorzystując komercyjnie dostępne linie komórkowe, jak również ludzkie monocyty izolowane z kożuszka leukocytarnego zdrowych dawców, które różnicowała do makrofagów, podjęła próbę odpowiedzi na istotne z punktu medycznego pytanie czy inhibitory PARP1 mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w zapobieganiu rozwoju sepsy.

Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

Rozprawę doktorską Pani mgr Julity Pietrzak stanowi zbiór 4 artykułów opublikowanych w recenzowanych zagranicznych czasopismach w latach 2018-2020. Są to następujące prace:

Pietrzak J, Spickett CM, Płoszaj T, Virág L, Robaszkiewicz A. PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment. Redox Biol. 2018 Sep;18:1-5. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.017.

Pietrzak J, Płoszaj T, Pułaski Ł, Robaszkiewicz A. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019 Feb;1862(2):198-208. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.10.019.

Sobczak M, **Pietrzak J**, Płoszaj T, Robaszkiewicz A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. Cancers (Basel). 2020 Feb 4;12(2):349. doi: 10.3390/cancers12020349.

Pietrzak J, Gronkowska K, Robaszkiewicz A. PARP Traps Rescue the Pro-Inflammatory Response of Human Macrophages in the In Vitro Model of LPS-Induced Tolerance. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Feb 22;14(2):170. doi: 10.3390/ph14020170.

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona krótkim wstępem, prezentacją celu naukowego, zwięzłym opisem materiałów i metod, syntetycznym przedstawieniem głównych wyników, wniosków oraz bibliografią wykorzystaną do przygotowania w/w omówienia. Ten rozdział pracy doktorskiej został opracowany w języku polskim oraz angielskim. Do pracy załączono oświadczenia doktorantki oraz współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące rolę doktorantki oraz współautorów w postawaniu w/w publikacji.

Trzy z powyżej wymienionych artykułów, tj. opublikowane w Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, Cancers oraz Pharmaceuticals to prace prezentujące oryginalne wyniki eksperymentalne. Natomiast artykuł opublikowany w Redox Biology jest pracą przeglądową. Wkład współautorski doktorantki został zdefiniowany odpowiednio dla pierwszej pracy eksperymentalnej wchodzącej w skład cyklu na poziomie 20%, drugiej 30% oraz trzeciej 60%, natomiast w pracy przeglądowej udział ten wynosił 40%.

Wkład pozostałych współautorów wahał się od 1% aż do 70%. Należy jednak zaznaczyć, że prace eksperymentalne wchodzące w skład cyklu są bardzo obszerne i bogate w liczne dane eksperymentalne. Dlatego w ocenie recenzenta szacowanie udziału %

współautorów może być trudne. Pomocna w tym miejscu byłaby raczej szczegółowa charakterystyka wykonanych prac, tak jak to Doktorantka zrobiła w odniesieniu do pracy przeglądowej. W przytoczonej pracy opublikowanej w Redox Biology Doktorantka wskazała numery rysunków oraz fragmenty/rozdziały publikacji za jakie była bezpośrednio odpowiedzialna. Co ciekawe, wkład Doktorantki został opisany także w/w sposób w artykule opublikowanym w Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms w sekcji *author contribution statement.* Natomiast w pozostałych dwóch publikacjach opis w sekcji *author contribution* jest bardziej ogólny, ale pozwalający potwierdzić, że udział Doktorantki był znaczący w powstaniu także tych publikacji. Recenzent, rozumiejąc specyfikę badań eksperymentalnych oraz zasady współpracy w zespołach naukowych przy realizacji wieloletnich tematów badawczych, nie wnosi uwag lub zastrzeżeń co do udziału doktorantki jako współautora w/w publikacji. Nie ma także podstaw aby z powyżej opisanego powodu dyskwalifikować którąkolwiek publikację z przedstawionego do oceny cyklu.

Trzy z czterech prac dotyczą bezpośrednio tematyki doktoratu i poprzez omawianie kwestii związanych z funkcjami PARP1, dwie z nich poruszają zagadnienia będące głównym przedmiotem rozprawy doktorskiej (są to prace kolejno zatytułowane „EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages" oraz „PARP Traps Rescue the Pro-Inflammatory Response of Human Macrophages in the In Vitro Model of LPS-Induced Tolerance"). Z kolei, publikacja zatytułowana „BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells" według recenzenta pośrednio łączy się z tematyką doktoratu. Wymieniony artykuł opisuje eksperymenty z użyciem linii komórkowych raka piersi MDA-MB-231 oraz MCF-7, które zdaniem doktorantki pozwoliły jej na dodatkową weryfikację hipotezy, według której aktywność białka EP300 jest niezbędna do zachowania aktywności proliferacyjnej komórek. Dla recenzenta dobór konkretnie tych dwóch linii raka piersi w odniesieniu do głównego celu badawczego nie jest do końca jasny. O ile oczywista jest potrzeba/chęć weryfikacji otrzymanych wyników wskazujących na kluczową rolę EP300, HDAC1 oraz kompleksu SWI/SNF w regulacji ekspresji *PARP1* w makrofagach o tyle dobór modelu raka piersi do tego celu nie jest tak oczywisty. Dlaczego nie wybrano do tego celu na przykład modeli komórkowych innych chorób układu krwiotwórczego? Niezależnie od powyższego, zaprezentowane wyniki w artykule "BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells" wnoszą cenny

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

komponent poznawczy, który uzupełnia ogólną wiedzę w zakresie regulacji transkrypcji genów przez acetylotransferazę EP300 oraz kompleks remodelujący SWI/SNF w komórkach człowieka, m.in., podczas różnicowania monocytów do makrofagów. Dlatego mimo pewnych podniesionych wątpliwości Recenzent stwierdza, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki, tym samym warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Recenzent ocenia wysoko wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że w/w artykuły podlegały rygorystycznym procedurom specjalistycznej recenzji zewnętrznej oraz przez członków rad redakcyjnych, w których zostały opublikowane. Opis wykorzystanych układów eksperymentalnych oraz zastosowanych technik w artykułach prezentujących oryginalne wyniki został dokonany z należytą starannością lub z właściwymi odnośnikami literaturowymi i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Zastosowane metody zostały dobrane i użyte odpowiednio dla weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów pracy doktorskiej. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz ilość użytych metod, zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki. Forma prezentacji wyników oraz ich opis w artykułach naukowych została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w artykule oraz pracy doktorskiej cele.

Za najważniejsze wnioski zaprezentowane w artykułach należy uznać wykazanie, że: a) proces różnicowania monocytów do makrofagów przyczynia się do zwiększenia ekspresji genu *PARP1* na poziomie mRNA i białka; b) zwiększona ekspresja genu *PARP1* w ludzkich makrofagach związana jest z ich potencjałem proliferacji; c) ekspresja genu *PARP1* w makrofagach podlega kontroli zależnie od acetylotransferazy EP300, deacetylazy HDAC1 oraz kompleksu SWI/SNF; d) inhibicja PARP1 hamuje rozwój immunotolerancji na działanie LPS; e) powstanie immunotolerancji na LPS ma związek z stabilizacją wiązania p50 do promotora genu *TNFα* oraz f) inhibicja acetylotransferazy EP300 oraz PARP1 skutecznie blokuje rozwój immunotolerancji na LPS oraz utrzymuje stabilną ekspresję genu czynnika TNFα.

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

Przedstawione w pracy wnioski, zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazuje, że Doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełniła ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim. Po przeczytaniu i merytorycznej analizie załączonych kopii artykułów recenzentowi nasunęło się jednak kilka pytań.

W nawiązaniu do tematyki zaprezentowanej w pracy zatytułowanej „PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment" prosiłbym Doktorantkę o komentarz dotyczący aktywności szlaków związanych z PARP1 zależnie od stężenia glukozy. Czy opisywane w doktoracie mechanizmy immunotoleracji mogą być modulowane zależnie od dostępności określonego źródła energii?

Z kolei po przeanalizowaniu wyników zaprezentowanych w pracy opublikowanej w Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019 Feb;1862(2):198-208. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.10.019, recenzent chciał zapytać, w jaki sposób Doktorantka monitorowała zmiany w obrębie populacji monocytów oraz makrofagów wywołane śmiertelnością komórek np. poddawanych działaniu inhibitorów białek CDK4/6, HDAC, EP300 oraz SWI/SNF? W przytoczonej pracy nie znalazłem informacji czy zostały zastosowane specyficzne testy rozróżniające określone typy regulowanej śmierci komórek w zastosowanych układach eksperymentalnych. Należy zaznaczyć, że komórki makrofagów były hodowane przez okres 72 h z inhibitorem białek CDK4/6 - czy w tym czasie było wymieniane medium? Doktorantka używała techniki siRNA do badania funkcji m.in., *BRM*, *BRG1*. Czy procedura z kontrolnym siRNA zmieniała poziom tych białek w odniesieniu do komórek nietraktowanej żadnym siRNA? Czy użyte siRNA do wyciszania ekspresji *BRM*, *BRG1* było specyficzną pojedynczą biomolekułą siRNA czy mieszaniną kilku siRNA?

Odnosząc się do artykułu opublikowanego w Cancers (Basel). 2020 Feb 4;12(2):349. doi: 10.3390/cancers12020349 chciałem zapytać Doktorantkę o różnice w kariotypie MCF-7 oraz MDA-MBA-231, w szczególności w liczbie kopii genów *BRG1*, *BRG2* oraz *EP300* oraz możliwych konsekwencji z tego faktu wynikających dla otrzymanych wyników.

W artykule zatytułowanym "PARP Traps Rescue the Pro-Inflammatory Response of Human Macrophages in the *In Vitro* Model of LPS-Induced Tolerance" Doktorantka prezentuje, m.in., wyniki zmiany profilu sekrecyjnego komórek po zastosowaniu inhibitorów PARP1 – chciałem w tym miejscu prosić o doprecyzowanie jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka wybierając cytokiny do swoich analiz. Dlaczego np. pominięto w analizach interleukinę 8 oraz 10? Doktorantka analizowała profil odpowiedzi prozapalnej komórek na

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

poziomie mRNA za pomocą qPCR. Czy mogłaby Doktorantka skomentować jakie konsekwencje niesie ze sobą zmiana aktywności PARP1 na stabilność transkryptów genów cytokin? Czy w związku z tym w użytym przez Doktorantkę układzie eksperymentalnym mogą występować różnice między mRNA a poziomem białek cytokin. Jeżeli tak, to jakiego typu należy spodziewać się zmian: wzrostu czy spadku efektywności translacji w odniesieniu do transkrypcji genów cytokin?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przestawioną pracę doktorską Pani mgr Julity Pietrzak oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, ponieważ udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Julity Pietrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 17/05/2021

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR