



Dr hab. Marcin Ratajewski, prof. IBM PAN,

Łódź, 14 maja 2021 r.

Kierownik Pracowni Epigenetyki

Instytutu Biologii Medycznej PAN

Ul. Lodowa 106

93-232 Łódź

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Julity Pietrzak

p.t. „Oddziaływanie PARP1 z chromatyną jako mechanizm regulujący nabywanie tolerancji na bakteryjną endotoksynę przez ludzkie monocyty i makrofagi”

Ocena aktywności naukowej

Dorobek naukowy mgr Julity Pietrzak zamyka się w 5 publikacjach, które ukazały się w pismach o zasięgu międzynarodowym o współczynnikach wpływu (IF) od 3.51 do 7.77. W trzech z tych publikacji, mgr Julita Pietrzak jest pierwszym autorem. Liczba cytowań według Scopus wynosi 52 a indeks Hirsha = 3. Pani mgr Julita Pietrzak prezentowała swoje wyniki na międzynarodowych konferencjach w Warszawie, Kijowie, Pradze oraz Berlinie. Odbyła także kurs naukowy “FEBS Advanced Lecture Course Epigenomics, Nuclear Receptors and Disease” w Spetses.

Ocena osiągnięcia naukowego

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt. „Oddziaływanie PARP1 z chromatyną jako mechanizm regulujący nabywanie tolerancji na bakteryjną endotoksynę przez ludzkie monocyty i makrofagi” stanowi cykl czterech publikacji (w tym jednej przeglądowej) w których Doktorantka podsumowała swoje badania. Sumaryczny IF czasopism, w których ukazały się publikacje Doktorantki, wyniósł 21.692 (320 pkt. MNiSW).

Układ rozprawy doktorskiej zawiera „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i Metody”, „Omówienie wyników”, „Wnioski” oraz „Literaturę”. Całość zawiera się w 14 stronach. Do części w języku polskim dołączona została część w języku angielskim zawierająca analogiczne (do części w języku polskim) fragmenty. W rozprawie znalazły się także kopie publikacji stanowiących podstawę merytoryczną osiągnięcia naukowego oraz oświadczenia współautorów publikacji. Doktorantka oceniła swój udział w przedstawionych publikacjach od 20 do 60%.

W rozprawie doktorskiej Doktorantka cytuje łącznie 186 prac w tym te z okresu ostatnich pięciu lat, co wskazuje na wysoki stopień obeznania z tematyką, którą Doktorantka zajmowała się w trakcie realizacji zadań badawczych.

Głównym celem badawczym mgr Julity Pietrzak było określenie roli białka PARP1 w powstawaniu zjawiska immunotolerancji. Jednym z najistotniejszych problemów badań immunologicznych jest identyfikacja mechanizmów prowadzących do nadmiernej lub niedostatecznej odpowiedzi układu immunologicznego na określony sygnał związany z zakażeniem drobnoustrojami. Zwiększona tolerancja drobnoustrojów na antybiotyki wskazuje na konieczność poszukiwań nowych sposobów regulacji aktywności układu immunologicznego i przywracania jego równowagi w przypadku wystąpienia stanu immunopatologii. W tym kontekście prace doświadczalne wykonane przez Doktorantkę wpisują się w jeden z podstawowych nurtów współczesnej immunologii.

Przedmiotem badań Doktorantki były pierwotne komórki monocytów, monocytów różnicowanych w kierunku makrofagów oraz komórki linii białaczki monocytarnej (THP-1). Do analizy ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA Doktorantka stosowała metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym, natomiast do oceny ilości białka stosowała technikę *Western blotting*. Do oceny zmian cyklu komórkowego w wybranych komórkach poddanych działaniu różnych inhibitorów Doktorantka stosowała metodę barwienia komórek jodkiem propidyny i pomiaru fluorescencji przy zastosowaniu



cytometrii przepływowej. Badanie wiązania się białek regulatorowych do sekwencji 5'-flankującej gen *TNFA* przeprowadzone zostało metodą immunoprecypitacji chromatyny. Doktorantka stosowała także techniki bioinformatyczne do analizy sekwencji regulatorowych badanych genów. Zastosowanie opisanych metod jest właściwe i wskazuje biegłość Doktorantki w posługiwaniu się technikami biologii molekularnej.

W części dotyczącej omówienia uzyskanych wyników Doktorantka przedstawia poszczególne etapy pracy począwszy od ustalenia warunków hodowli i różnicowania oraz monitorowania różnicowania monocytów do makrofagów, do opisu najważniejszych wyników eksperymentalnych. Doktorantka odkryła, że wraz z różnicowaniem komórek monocytów do makrofagów wzrasta liczba kopii transkryptu genu *PARP1* oraz białka PARP1. Proces ten hamowany był przez inhibitor EP300 oraz indukowany przez inhibitor HDAC1, przy czym inhibitor EP300 miał dominujący efekt względem inhibitora HDAC1. Immunoprecypitacja chromatyny wykazała, że z promotorem genu *PARP1* wiążą się białka BRM i BRG1 będące częścią kompleksu białkowego SWI/SNF. Zastosowanie inhibitora SWI/SNF, podobnie jak w przypadku inhibitora EP300, prowadziło do zahamowania ekspresji *PARP1*. Wzrost ekspresji *PARP1* (biorącego udział w naprawie DNA) w trakcie różnicowania monocytów do makrofagów Doktorantka tłumaczy narażeniem komórek makrofagów na reaktywne formy tlenu, azotu i chloru mogące uszkadzać m.in. DNA. Niejako w oderwaniu od głównego nurtu badań, Doktorantka pokazała także, że białka EP300 oraz BRG1 są niezbędne dla zachowania proliferacji komórek linii raka jajnika.

W następnych etapach badań Doktorantka sprawdziła rolę PARP1 w rozwoju tolerancji makrofagów na lipopolisacharyd (LPS), której wyznacznikiem była ekspresja genu *TNFA*. Eksperymenty wykazały, że zastosowanie inhibitorów PARP1, które zatrzymują to białko na chromatynie tj. Olaparibu i Niraparibu zapobiega powstawaniu immunotolerancji. Co ciekawe, inhibitor PARylacji, Veliparib, nie wykazywał takiego działania. Część z tych wyników została potwierdzona na linii komórkowej THP1. Przy zastosowaniu techniki immunoprecypitacji chromatyny stwierdzono, że Olaparib zatrzymuje PARP1 w promotorze genu *TNFA* i prowadzi do utrzymania wysokiego poziomu podjednostki p65 w jego obrębie. Wysoki poziom PARP1 oraz p65 uniemożliwia wiązanie się czynnika p50 do promotora genu *TNFA*, a w konsekwencji, rozwinięcie tolerancji na LPS. Doktorantka udowodniła także, że EP300 współdziała z PARP1 w obrębie promotora genu *TNFA* i to współdziałanie jest kluczowe do wystąpienia tolerancji na LPS. Podsumowując, fragment dotyczący wyników jest napisany w sposób klarowny zaś poszczególne elementy składają się w logiczną i spójną całość. Doktorantka uzyskała wyniki



pokazujące mechanizm nabywania tolerancji na bakteryjną endotoksynę przez komórki makrofagów tym samym wskazała tarczę molekularną (PARP1), której utrzymanie na chromatynie umożliwia zahamowanie rozwoju tolerancji na LPS. Odkrycie Pani mgr Julii Pietrzak może znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów septycznych, którzy rozwijają tolerancję na endotoksynę czego efektem może być zespół kompensacyjnej odpowiedzi przeciwzapalnej (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome - CARS), w którym komórki zamiast wydzielać mediatory stanu zapalnego, w odpowiedzi na wtórne bodźce stymulujące receptory TLR, wydzielają cytokiny przeciwzapalne. W rezultacie, pacjenci z CARS wykazują zwiększoną podatność na wtórne infekcje.

Pomimo wysokiej jakości pracy, Doktorantka nie ustrzegła się błędów.

1. Strona 7. Doktorantka napisała, że sepsa „Wywołana jest m.in. przez monocyty i makrofagi należące do pierwszej linii obrony immunologicznej(...)”. Jest to oczywisty błąd, gdyż sepsy nie wywołują monocytów i makrofagów, które są obecne w naszych organizmach w dużej liczbie, ale drobnoustroje i zaburzona odpowiedź układu immunologicznego na nie.
2. Strona 7. „Jednak ostatnie dane pokazują, że stosowanie antybiotyków wiąże się z rozwojem antybiotykooporności, zaś antybiotyki o szerokim spektrum działania zwiększają ryzyko zgonu o 20% w przypadku leczenia niektórych szczepów bakterii [4].” Doktorantka popełniła błąd, gdyż nie leczy się bakterii, zwłaszcza tych, które wywołują choroby człowieka.
3. Doktorantka wymiennie używa terminu $TNF\alpha$ dla genu i białka. Jednakże prawidłowa nomenklatura odnosi termin $TNF\alpha$ do białka kodowanego przez gen *TNFA* lub *TNF*.
4. Na stronie 14 Doktorantka napisała: „Potraktowanie komórek Olaparibem chroniło $TNF\alpha$ przed represją wywołaną przez LPS i utrzymywało wysoki poziom ekspresji tej cytotoksyny [17].” $TNF\alpha$ nie jest cytotoksyną a cytokiną.
5. Na stronie 15 Doktorantka użyła niezbyt zgrabnego sformułowania: „Wiedząc że PARP1 jest udokumentowanym współregulatorem transkrypcji (...)”. Doktorantka nie napisała, czy PARP1 jest regulatorem transkrypcji w ogóle czy chodziło o gen *TNFA*, z kontekstu dedukuję, że to drugie. Przypuszczam także, że napisanie po prostu „Wiedząc, że PARP1 jest regulatorem transkrypcji (...)” wypadłoby z korzyścią dla samego zdania.



6. Strona 16: „Immunoprecypitacja chromatyny powiązana z oceną ilościową techniką real-time PCR wykazała wzrost acetylacji (Rys. 3a) i usunięcie białka EP300 z promotora TNF α w trakcie różnicowania komórek THP1 (Rys. 3b).” Patrząc na rycinę 3a można zauważyć, że nie ma istotności statystycznej pomiędzy komórkami niezróżnicowanymi i zróżnicowanymi, tym samym pisanie o wzroście acetylacji jest nieuprawnione.
7. Doktorantka niekonsekwentnie stosuje opisy osi Y na swoich rycinach. W wersji polskiej na większości rycin opisy są w języku angielskim: Ryc. 1ab, Ryc. 3abcd. Dodatkowo na Ryc. 3bd opis jest z błędem „Enrichment obver input”. Błąd ten został powtórzony również na rycinach w wersji angielskiej.
8. Wniosek czwarty jest napisany niepoprawnie i trudno jest go zrozumieć: „Obecność PARP1 zawiązanego w sekwencji promotorowej TNF α pozwala na zapobiega postania zjawiska tolerancji immunologicznej”. To zdanie można poprawić na kilka sposobów na przykład: „Obecność PARP1 w sekwencji promotorowej genu *TNFA* zapobiega powstawaniu zjawiska tolerancji immunologicznej”.

Powyższe uchybienia nie rzutują jednakże na wysoką ocenę merytoryczną jaką wystawiam Autorce za wykonaną pracę.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Autorki w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych oraz wskazuje, że mgr Julita Pietrzak posiadała umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Otrzymana praca doktorska według mojej oceny spełnia wymogi formalne określone w Ustawie z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Dz.U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami.

KIEROWNIK
Pracowni Epigenetyki
Instytutu Biologii Medycznej PAN
Marcin Ratajewski
Dr hab. Marcin Ratajewski, prof. IBM PAN