



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej  
pt. „Rola zmian epigenetycznych w regulacji komórek układu odpornościowego –  
implikacje w terapii cukrzycy typu 1”**

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Doroty Iwaszkiewicz-Grześ  
w Zakładzie Immunologii Medycznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Strona formalna rozprawy.**

Doktorantka skorzystała z możliwości jakie daje Art.187 pkt.3 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 r. i przedstawiła swoją rozprawę jako „(...) zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (...)”. Na rozprawę składają się łącznie 3 artykuły, w tym 2 oryginalne i 1 przeglądowy, spełniające ustawowy wymóg spójności tematycznej, opublikowane w latach 2020-21 w czasopismach międzynarodowych, o sumarycznym współczynniku oddziaływania  $IF=20,409$  i punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszącej 380 punktów. Dodatkowo, Doktorantka w rozprawie załączyła wyniki swoich badań z tego tematu, które dotychczas nie zostały opublikowane.

W sytuacji, gdy w skład rozprawy wchodzi już opublikowane artykuły recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż zawarte w publikacjach wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów wyznaczonych przez redakcje czasopism, którzy, jeśli uznali za istotne dla wartości naukowej artykułu, wskazali na konieczność wykonania dodatkowych doświadczeń czy wprowadzenia innych uzupełnień. W praktyce jest to trudne, gdyż czasem nie można określić, które wyniki przedstawione w danym artykule są autorstwa doktoranta, zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich. A jest to kluczowe, aby można było stwierdzić, że wkład doktoranta w powstanie danego artykułu był istotny i może zostać uznany za samodzielną i możliwą do wyodrębnienia jego część. W pierwszej z załączonych publikacji oryginalnych (z 2020 roku) mgr Piotrowska-Mieczkowska jest czwartym autorem, przy dwóch pierwszych autorach współdzielących równy wkład w jej powstanie. Z załączonych oświadczeń wynika, iż rola Doktorantki w powstanie tej publikacji miała charakter pomocniczy. W drugiej publikacji (z 2021 roku), Doktorantka jest równorzędnym pierwszym autorem wraz z

Instytut Pediatrii

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii | Zakład Immunologii Klinicznej

ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków, tel. +48 12 658 24 86, faks +48 12 658 17 56

[www.cm-uj.krakow.pl](http://www.cm-uj.krakow.pl)

promotorem swojej rozprawy doktorskiej. W swoim oświadczeniu mgr Piotrowska-Mieczkowska wyraźnie zaznaczyła jednak, które doświadczenia zostały przez Nią wykonane i przeanalizowane. Informacje te są tym bardziej istotne, iż wyniki z obu publikacji oryginalnych zostały już wykorzystane w postępowaniu awansowym Pani dr. hab. Doroty Iwaszkiewicz-Grześ - promotora Doktorantki. Trzeci artykuł jest pracą przeglądową i Doktorantka jest tu samodzielnym pierwszym autorem. Istotną część rozprawy stanowią również wyniki badań, które nie zostały dotychczas opublikowane. Osobiście, jestem zwolennikiem przedstawienia w rozprawach doktorskich wyników wszystkich badań, które były podejmowane przez doktoranta, a które z różnych przyczyn nie zostały opublikowane. Takie podejście daje recenzentowi możliwość przeglądu różnych aspektów podjętych badań i oceny zaangażowania doktoranta w realizację tematu badawczego.

### **Ocena merytoryczna rozprawy.**

Rozprawa ma układ typowy dla opracowań naukowych, a poprzedza ją prezentacja dorobku naukowego Kandydatki z uwzględnieniem publikacji Jej autorstwa, ich źródeł finansowania, listy doniesień zjazdowych (zarówno ustnych jak i plakatowych), wykazu otrzymanych nagród i udziału w realizacji projektów badawczych. We „Wprowadzeniu” Autorka zapoznaje czytelnika z problematyką podjętych badań, poczynając od krótkiej charakterystyki cukrzycy typu 1 oraz opisu limfocytów T regulatorowych (Treg) i ich właściwości immunosupresyjnych, zwłaszcza w utrzymaniu tolerancji immunologicznej i zapobieganiu rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych. Doktorantka wskazuje tu na rolę zmian epigenetycznych zachodzących w limfocytach Treg w kontekście występowania cukrzycy typu 1, podkreślając opisywany w literaturze odmienny wzór epigenetyczny w tych komórkach u osób chorych i zdrowych. Bazując na danych literaturowych zwraca uwagę, iż z punktu widzenia terapii komórkowych opartych na limfocytach Treg, szczególnie istotne jest określenie zmian epigenetycznych zachodzących w regionie genu *FOXP3*. W tym aspekcie Autorka podaje różnice pomiędzy komórkami Treg indukowanymi *in vivo* w grasicy i tymi otrzymywanymi w warunkach hodowli *in vitro*. Podkreśla, iż kluczowe jednak dla efektywności takiej formy leczenia jest pozyskanie antygenowo swoistych limfocytów Treg, które obecnie można wytworzyć metodami inżynierii genetycznej, uzyskując tzw. CAR-Treg z chimerycznym receptorem antygenowym lub w drodze stymulacji komórkami APC, prezentującymi konkretny antygen. Cały ten rozdział jest bardzo dobrze napisany i wzbogacony przejrzystymi ilustracjami - ma on ogólnie edukacyjny charakter.

Cel główny oraz cele szczegółowe badań zostały jasno i logicznie sformułowane w 5 punktach. Metodologia badań została opisana w pracach doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy i dodatkowo skrótowo przedstawiona w rozdziale „Materiały i metody”. Na uwagę zasługuje tu autorski protokół opracowany przez Zespół Profesora Piotra Trzonkowskiego, dotyczący otrzymywania limfocytów Treg swoistych dla antygenów insuliny. Protokół ten jest zasadniczą częścią publikacji nr 1 Doktorantki, wchodzącej w skład Jej rozprawy. W protokole tym moje zdziwienie wzbudził etap napromienienia promieniowaniem jonizującym monocytów prezentujących antygeny insuliny autologicznym limfocytom T zdrowych dawców. Chętnie poznam motywy takiego postępowania, gdyż monocyty nie są komórkami dzielącymi się i jako takie nie powinny zakłócać odczytu testu

prolifracji limfocytów T znakowanych barwnikiem CFSE. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka szczegółowo przedstawiła metodykę badań nieuwjętych w załączonych publikacjach, które obejmowały analizę poziomu ekspresji genów określających profil i funkcjonalność limfocytów Treg oraz genów zaangażowanych w regulację procesu metylacji DNA u dzieci ze świeżo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1. Wszystkie wykorzystane w tych badaniach procedury zostały zaakceptowane przez lokalną Komisję Bioetyczną.

Wyniki badań będących podstawą opracowania protokołu otrzymywania preparatu antygenowo swoistych limfocytów Treg do terapii pacjentów z cukrzycą typu 1 zostały przedstawione w artykule pt. „*Antigen reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*”, opublikowanym w prestiżowym czasopiśmie „*Cytotherapy*”. Jest to „*proof of concept*”, w którym opisano optymalne warunki hodowli do uzyskania limfocytów Treg w ilościach wymaganych do terapii komórkowych, podkreślając w tym aspekcie istotność dodatkowej stymulacji limfocytów za pomocą przeciwciał anti-CD28 i anti-CD154. Przedstawiono również charakterystykę funkcjonalną tak otrzymanych komórek Treg i oceniono repertuar ich receptorów TCR. Te ostatnie analizy pozwoliły stwierdzić, iż pomimo że w odpowiedzi na insulinę lub wybrany peptyd jej łańcucha  $\beta$  bierze udział wiele klonów limfocytów Treg, repertuar ich receptorów TCR znacząco odbiega od tego obserwowanego dla limfocytów Treg z hodowli stymulowanych poliklonalnie za pomocą mikrokulek opłaszczonych przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28. W moim odczuciu jest to przełomowy artykuł na polu immunoterapii cukrzycy typu 1 z wykorzystaniem antygenowo swoistych limfocytów Treg, dający również podstawy do otrzymywania populacji limfocytów Treg swoistych dla innych antygenów, o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu różnych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. W kontekście samej rozprawy artykuł ten ma istotne znaczenie dla merytorycznego wprowadzenia we właściwe badania Doktorantki nad zmianami epigenetycznymi zachodzącymi w tak „wyprodukowanych” limfocytach Treg, stąd fakt, iż Doktorantka nie odegrała wiodącej roli w jego powstanie jest tu, w mojej opinii, w pełni akceptowalny.

Drugim artykułem oryginalnym załączonym do cyklu prac pt. „*Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells*”, opublikowany w opiniotwórczym czasopiśmie „*Frontiers in Immunology*” przedstawia wyniki analiz profilu epigenetycznego antygenowo swoistych limfocytów Treg, otrzymywanych wg opisanego wcześniej protokołu, zestawiając je z danymi pochodzącymi z zazwyczaj stosowanych w tego typu terapiach komórkowych - poliklonalnymi limfocytami Treg. Ponadto, badania te przeprowadzono równolegle na populacji limfocytów T efektorowych, a więc komórek o działaniu przeciwstawnym do limfocytów Treg, co pozwoliło na zdobycie wiedzy na temat różnic między tymi populacjami na poziomie ekspresji genów. Istotną obserwacją poczynioną na podstawie wyników przedstawionych badań było stwierdzenie różnic w profilu epigenetycznym uzyskiwanych limfocytów Treg w zależności od użytego do stymulacji antygeny. W tym kontekście Autorzy wykazali, iż limfocyty Treg swoiste dla peptydu 9-23 łańcucha beta insuliny posiadają wyższy poziom ekspresji genów kluczowych dla ich aktywności supresyjnej, w porównaniu do komórek swoistych dla różnych antygenów całej cząsteczki insuliny. Są to bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia obserwacje, pozwalające na wybranie schematów aktywacji prowadzących do uzyskania w hodowlach najbardziej efektywnych populacji limfocytów Treg do celów terapeutycznych.

Ostatnia praca cyklu to publikacja przeglądowa pt. „*Regulatory T cell-related genes are under DNA-methylation influence*”, opublikowana w czasopiśmie “International Journal of Molecular Sciences”. Przedstawia ona podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat wpływu metylacji DNA na ekspresję genów kluczowych dla funkcjonowania limfocytów Treg. Autorzy podkreślają tu odwracalny charakter zmian epigenetycznych i podają listę obecnie dostępnych preparatów regulujących poziom metylacji DNA, które potencjalnie mogłyby zwiększyć efektywność terapii z wykorzystaniem Treg. W moim odczuciu, publikacja ta jest znakomitym kompendium i w najbliższym czasie będzie szeroko cytowana przez badaczy i klinicystów zajmujących się tą tematyką.

Istotną część rozprawy stanowią badania, których wyniki nie zostały dotychczas przez Doktorantkę opublikowane. W rozdziale tym mgr Piotrowska-Mieczkowska omówiła badania przeprowadzone na materiale pochodzącym od młodych pacjentów ze świeżo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1, w których w pierwszym etapie oceniono wpływ poliklonalnej stymulacji limfocytów Treg (mikrokulki opłaszczane przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28), na profil ekspresji wybranych genów i porównano do komórek izolowanych od zdrowych dawców krwi. Ponadto, analogicznie jak to miało miejsce w publikacji nr 2 cyklu, profil ekspresji genów Treg porównano z tym występującym w efektorowych limfocytach T CD4<sup>+</sup>. Ocena ekspresji genów charakterystycznych dla Treg wykazała, iż największe różnice pomiędzy osobami z cukrzycą typu 1 a zdrowymi dawcami krwi występowały w poziomie mRNA dla *CTLA-4* i *FOXP3*, przy czym osoby chore miały ten poziom wyraźnie niższy. Co ciekawe, obniżenie ekspresji *CTLA-4* u chorych z cukrzycą typu 1 Doktorantka zaobserwowała również w odniesieniu do efektorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>. W kolejnym etapie badań sprawdzano czy obniżona ekspresja *CTLA-4* i *FOXP3* u pacjentów z cukrzycą typu 1 może być wynikiem zmiany wzorca metylacji DNA w limfocytach Treg i/lub modyfikacji histonu H3. I tak, analiza profilu metylacji regionu promotora i eksonu 2 w genie *CTLA-4* oraz regionu promotora i TSDR (ang. *Treg-specific demethylated regions*) nie wykazała istotnych różnic w stopniu ich demetylacji w porównaniu do osób zdrowych. Profil metylacji DNA został również oceniony w limfocytach T efektorowych i tu stwierdzono wzrost stopnia metylacji DNA w promotorze *CTLA-4*. Finalnie, porównano wzór metylacji limfocytów Treg i T efektorowych pochodzących od pacjentów z cukrzycą. W tym aspekcie wykazano, iż Treg charakteryzują się znacząco wyższą demetylacją promotora *FOXP3* i eksonu 2 *CTLA-4* i prawie całkowitą demetylacją w regionach TSDR. Jak zauważa Doktorantka, w warunkach nadmiernej stymulacji w hodowli może dochodzić do wzrostu metylacji kluczowych regionów DNA Treg, co może przekładać się na mniejszą efektywność takich komórek w terapii. W kontekście tych wyników nasuwa mi się pytanie – jaki wpływ na efektywność terapii z użyciem limfocytów Treg, poza hipermetylacją regionów dla nich specyficznych (TSDR) i „wyczerpaniem”, spowodowanym długotrwałą stymulacją *in vitro*, może mieć spadek aktywności telomerazy i skracanie telomerów w wyniku konieczności namnażania limfocytów w warunkach hodowli? W przypadku innych podobnych form terapii komórkowych, np. terapii adoptywnej nowotworów z użyciem swoistych dla antygenów nowotworowych cytotoksycznych limfocytów T CD8<sup>+</sup>, jest to dość istotny mankament, ograniczający skuteczność takiej formy leczenia.

Z kolei analizując modyfikacje histonu H3 Doktorantka stwierdziła, iż poziom zmian w histonie związanych z represją i aktywacją transkrypcji był wyraźnie wyższy w limfocytach

Treg pacjentów z cukrzycą niż osób zdrowych, co może odpowiadać za obserwowany obniżony poziom mRNA dla *FOXP3* i *CTLA-4*. Doktorantka podchodzi jednak do tego wniosku z należytą ostrożnością i wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych badań w celu jego weryfikacji. Takie podejście należy docenić, świadczy ono bowiem o rzadkiej na tym etapie rozwoju naukowego umiejętności krytycznego spojrzenia Doktorantki na wyniki swoich badań.

Ostatnią część tego rozdziału stanowi omówienie wyników ekspresji *FOXP3* i *CTLA-4* na poziomie białka u osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 1. Badania te Doktorantka przeprowadziła metodą cytometrii przepływową, porównując tu zarówno odsetek limfocytów Treg dodatnich dla poszczególnych białek obecnych na powierzchni (*CTLA-4*) oraz wewnątrz komórek (*CTLA-4* i *Foxp3*), jak i oceniając średnią intensywność fluorescencji wybarwionych przeciwciałami limfocytów Treg, która koresponduje z ilością danego białka na/w komórce. Wyniki tych badań wskazują, iż ogólny poziom komórek *Foxp3*<sup>+</sup> nie różnił się pomiędzy grupami, natomiast cytoplazmatyczna ekspresja tego białka u pacjentów z cukrzycą wyraźnie obniżała się w trakcie ich namnażania w hodowli. W przypadku białka *CTLA-4* występuje ono konstytutywnie na powierzchni limfocytów Treg i może być również magazynowane w strukturach wewnątrzkomórkowych, stąd też Doktorantka oceniała jego obecność zarówno na błonie limfocytów, jak i w ich cytoplazmie. U pacjentów z cukrzycą, tak odsetek komórek dodatnich dla powierzchniowej ekspresji *CTLA-4*, jak i ich średnia intensywność fluorescencji były niższe niż w przypadku Treg osób zdrowych. Parametry te w limfocytach Treg pacjentów wykazywały dodatkową tendencję spadkową w trakcie hodowli *in vitro*. Podobne zależności stwierdzono w odniesieniu do poziomu komórek, jak i ich intensywności fluorescencji podczas „całościowej” oceny ekspresji tego białka, tzn. na powierzchni i w cytoplazmie limfocytów Treg.

Wyniki kończy rozdział „Podsumowanie”, w którym Doktorantka zwięźle opisuje najważniejsze obserwacje poczynione w trakcie realizacji przedmiotowych badań. W mojej opinii, z pożytkiem dla klarowności rozprawy byłoby sformułowanie kilku końcowych wniosków rekapitulujących wyniki przeprowadzonych badań.

Rozprawę zamyka spis literatury przedmiotu obejmujący 82 pozycje, w tym szereg z ostatnich pięciu lat.

## **Podsumowanie.**

Przedłożona do oceny rozprawa mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej jest pionierskim opracowaniem charakterystyki epigenetycznej limfocytów Treg pozyskiwanych do celów terapeutycznych wg autorskiego protokołu Zespołu. Przedstawione w rozprawie wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne – opisane zmiany epigenetyczne uzyskanych w hodowli limfocytów Treg będą miały znaczenie dla doskonalenia tej formy terapii w najbliższej przyszłości. W kontekście tytułu rozprawy można by się spodziewać również oceny profilu mikroRNA (miRNA) w limfocytach Treg pacjentów i osób zdrowych, jako istotnego elementu regulacji ekspresji genów. Aspekt ten zapewne ze względów ekonomicznych nie został w rozprawie podniesiony, może on jednak z powodzeniem być przedmiotem dalszych samodzielnych badań Kandydatki, podjętych już po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Kraków, 23.02.2024

Katedra Immunologii Klinicznej  
i Transplantologii UJ CM

  
dr hab. n. med. Jarosław Baran, prof. UJ