



Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

magister Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej

**pt.: "Rola zmian epigenetycznych w regulacji komórek układu odpornościowego -
implikacje w terapii cukrzycy typ 1".**

Osiągnięcia badawcze nauk podstawowych obecnego półwiecza (w tym genetyki, biologii molekularnej, immunologii) przyczyniły się znacząco do lepszego rozumienia istoty zjawisk etiopatogenetycznych warunkujących rozwój licznych chorób trapiących ludzkość. Osiągnięcia te dotyczą także wielu chorób wieku dziecięco-młodzieżowego z grupy autoagresyjnych, metabolicznych, endokrynologicznych czy nowotworowych. Ostatnie lata udowodniły lekarzom praktykom, że pierwsza manifestacja kliniczna wielu z tych chorób obniżyła znacząco granice wiekowe czego przykładem może być: cukrzyca typu 1, choroba Gravesa-Basedowa, choroba wrzodowa, astma wczesnodziecięca czy choroby reumatoidalne związane dotychczas zwyczajowo z wiekiem dorastania lub dorosłym. Techniki biologii molekularnej czy immunologii pozwalają na dzień dzisiejszy śledzić zachodzące w ustroju człowieka zjawiska fizjologiczne oraz wcześniej wykryć na poziomie elementarnych struktur komórkowych procesy patologiczne (chorobotwórcze) rozstrzegające się w różnych komórkach, narządach czy układach organizmu ludzkiego, niejednokrotnie wyprzedzające wystąpienie objawów klinicznych.

W ciągu ostatnich lat dynamika wzrostu zapadalności na cukrzycę typu 1 (CT1) w Polsce stała się jedną z najwyższych w Europie. W jej powstaniu bierze udział mechanizm niszczenia komórek β wysp trzustkowych przez autoreaktywne limfocyty T. Badania biopsyjne wykazały istnienie w wyspach trzustki nacieku komórek jednojądrzastych, co określono mianem insulitis. Autoimmunologiczne zapalenie wysp trzustkowych, przyczyna cukrzycy typu I rozwija się w kilku dyskretnych stadiach, kończących się zaprogramowaną śmiercią komórek. W pierwszym etapie antygenowe epitopy białek typowych dla komórek beta trzustki są uwalniane poprzez komórki prezentujące antygen w miejscowych węzłach chłonnych, gdzie namnażają się klony autoreaktywnych limfocytów. Następnie dochodzi do reakcji z udziałem prozapalnych cytokin uwalnianych z limfocytów Th1, które uwrażliwiają komórki β trzustki na apoptozę. Ciekawym zjawiskiem staje się zmniejszenie liczby i/lub funkcji komórek T regulatorowych we krwi obwodowej z jednoczesnym generowaniem przez komórki β trzustki cytokin i chemokin wywołujących napływ kolejnych populacji komórek immunologicznych i uczestniczących w niszczeniu komórek β wysp trzustki, co w rezultacie przy ich destrukcji w około 80%-ach objawia się wystąpieniem cukrzycy. W ostatnich latach przypisuje się istotną rolę w patogenezie

tej choroby modyfikacjom epigenetycznym, które odpowiedzialne są za zmiany ekspresji genów i funkcjonalności komórek nie powstające na skutek zmian w sekwencji nukleotydowych. Do tych mechanizmów należą metylacja DNA, potranslacyjne modyfikacje histonów oraz udział niekodującego RNA w supresji lub aktywacji transkrypcji.

Pacjenci z cukrzycą typu 1, jedną z najczęstszych chorób przewlekłych występujących u dzieci, stanowią i będą stanowili istotny problem społeczny. Dotychczas nie opracowano skutecznych metod prewencji i nie ma możliwości wyleczenia z tej bardzo trudnej dla pacjenta i jego rodziny choroby. Postępowanie w cukrzycy typu 1 jest wielokierunkowe. Ma długofalowo zapobiegać rozwojowi powikłań przewlekłych choroby, ale również umożliwiać między innymi funkcjonowanie młodego człowieka w grupie rówieśniczej i zapewniać jego prawidłowy rozwój fizyczny. Gdy cukrzycę typu 1 rozpoznana jest na odpowiednio wczesnym etapie, przy zachowanej jeszcze insulinosекреkcji, a więc w okresie prediabetes lub remisji, możliwe do zastosowania są terapie immunomodulujące mające na celu czasową ochronę pozostałych komórek β trzustki produkujących insulinę przed dalszą autodestrukcją. Jednym z głównych trendów leczenia chorób autoimmunologicznych są prowadzone w ostatnich latach terapie z zastosowaniem komórek Tregs lub indukujące ich wzrost w organizmie chorego oraz terapie mające na celu zahamowanie aktywności komórek prezentujących antygen i limfocytów T-efektorowych. Lekiem powodującym selektywne zniszczenie limfocytów B i tym samym zatrzymanie reakcji autoimmunologicznej na wczesnym etapie prezentacji antygenów, jest cytotoksyczne przeciwciało monoklonalne anti-CD20 (rytuksymab). Zachowane nawet szczątkowe wydzielanie własnej insuliny, mierzone za pomocą oznaczeń stężenia C-peptydu w surowicy, poprzez regulację glikemii poprawia wyrównanie metaboliczne pacjentów i tym samym zmniejsza ryzyko ostrych i przewlekłych powikłań CT1. Przyczynia się to do wydłużenia ich życia i poprawy jego jakości. Leczenie CT1 i jej powikłań stanowi wciąż olbrzymie wyzwanie dla medycyny i pomimo rozwoju nowoczesnych technologii takich jak pompy insulinowe i systemy monitorowania glikemii, większość pacjentów nie osiąga celów terapeutycznych. W bardzo aktualny i niezwykle potrzebny nurt badań nad próbą leczenia cukrzycy typu 1 we wczesnej fazie, próbą hamowania procesu autoimmunizacyjnej destrukcji wysp trzustkowych i zachowania wydzielania endogennej insuliny, wpisuje się rozprawa doktorska magister Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej. Ambitne założenia badawcze dotyczące wygenerowania komórek antygenowo-specyficznych (Ag-spec) Tregs poprzez stymulację autologicznymi monocytami prezentującymi antygeny (insulina bądź fragment 9-23 łańcucha β insuliny), o wysokim potencjale wykorzystania w terapii CT1 i porównanie ich z obecnie stosowanymi preparatami poliklonalnymi należy do tematów aktualnych i ważnych dla postępu medycyny praktycznej i nauk biologicznych. Tak więc, rozprawa magister Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej dotyczy tematu oryginalnego, unikatowego w skali światowej, jest zamierzeniem niezwykle ambitnym zarówno w koncepcji jak i zastosowanej metodyce. Praca powstała w Ośrodku o wieloletniej tradycji badań nad cukrzycą typu 1 i słynącym na świecie z wdrożenia pionierskiej immunoterapii z zastosowaniem komórek Tregs, znanym z niezwyklej rzetelności prowadzonych badań oraz publikacji wyników w prestiżowych czasopismach zagranicznych.

Badania były realizowane dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju POWR oraz LIDER, programowi grantowemu Młody Twórca Nauki- „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza” oraz ze środków firmy Poltreg S.A.

Podstawę przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej stanowią trzy publikacje, w formie spójnego tematycznie cyklu prac, wszystkie napisane w języku angielskim:

1. Praca oryginalna: **Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies.** Iwaszkiewicz-Grześ D., Gliwiński M., Piotrowska M., Dahl A., Marek-Trzonkowska N & Trzonkowski, P. (2020). Opublikowana w czasopiśmie *Cytotherapy* 22(11):629-641, pkt MEiN: 100; IF-5,414
2. Praca oryginalna: **Antigenic Challenge Influences Epigenetic Changes in Antigen-Specific T regulatory Cells.** Iwaszkiewicz-Grześ D., Piotrowska M., Gliwiński M., Urban-Wójciuk Z. & Trzonkowski, P. (2021). *Front Immunol.* 23;12: 642678. pkt MEiN: 140, IF: 8,787
3. Praca przeglądowa: **Regulatory T Cells-Related Genes are under DNA Methylation Influence.** Piotrowska M., Gliwiński M., Trzonkowski, P & Iwaszkiewicz-Grześ D. (2021). *Int J Mol Science.* 1;22 (13):7144. pkt MEiN: 140, IF: 6,208

We wszystkich publikacjach doktorantka jest wiodącym autorem, stosowną dokumentację poświadczającą wkład w powstanie prac dołączyła do opracowania. Łączna punktacja cyklu prac wynosi 380 pkt MEiN oraz 20,409 pkt IF. Dodatkowy dorobek naukowy stanowi 5 kolejnych prac opublikowanych w renomowanych czasopismach krajowych i zagranicznych z całkowitym IF= 43,106 oraz pkt MEiN: 1010.

Rozprawa doktorska magister Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej to opracowanie liczące w sumie 60 stron wraz z załączonymi wcześniej wspomnianymi trzema publikacjami. Praca rozpoczyna się od krótkiego spisu treści, następnie zawiera kolejno: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, wykaz innych prac naukowych, źródła finansowania, wykaz innych osiągnięć naukowych (w tym nagrody i wyróżnienia, projekty naukowe), wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cele badań, materiał i metody, omówienie publikacji, wyniki nieopublikowane, podsumowanie oraz wykaz piśmiennictwa.

Wstęp opracowania przedstawia trzy główne kwestie: budowa i funkcje limfocytów T regulatorowych, zmiany epigenetyczne limfocytów T regulatorowych, antygenowo-specyficzne limfocyty T regulatorowe oraz ich potencjał wykorzystywania w leczeniu CT1. Całość zawiera 5 rycin, które w jasny sposób wyjaśniają patogenezę CT1 i korzyści terapii limfocytami T regulatorowymi w zachowaniu funkcji komórek β wysp trzustkowych, a także zahamowanie progresji T1DM poprzez wydłużenie czasu wydzielania własnej insuliny. Bardzo istotne są ryciny przedstawiające mechanizmy supresji z udziałem Tregs, cząsteczek CTLA-4 w Tregs oraz epigenetyczne zmiany zachodzące w limfocytach Tregs u osób z CT1. Warty podkreślenia jest fakt przedstawienia w tej części dysertacji znaczenia generowania CAR-Tregs specyficznych względem dekarboksylazy kwasu glutaminowego, izoformy 65 KD, czy fragmentowi 10-23 łańcucha β insuliny, które indukują tolerancję w obrębie trzustki, hamując proliferację limfocytów autoreaktywnych. Komórki CAR-Tregs zapobiegają powstawaniu cukrzycy typu 1 w modelu wykorzystującym myszy NOD (Non-obese diabetic).

Zasadniczym celem badań mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej było określenie profilu epigenetycznego komórek antygenowo-specyficznych względem antygenów charakterystycznych dla CT1 (insulina lub fragment 9-23 łańcucha β insuliny) i porównanie ich z obecnie stosowanymi preparatami komórek poliklonalnych, dodatkowo ustalenie wzorca molekularnego komórek CD4+ u osób z cukrzycą typ 1, a także określenie stabilności cząsteczek zaangażowanych w funkcjonalność komórek Tregs w trakcie ekspansji komórkowej. Cele te realizowała doktorantka w trakcie badań, które zaowocowały powstaniem między innymi dwóch prac oryginalnych stanowiących rdzeń ocenianej dysertacji doktorskiej.

W pracy oryginalnej „**Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies**” (Cytotherapy, 2020) mgr Magdalena Piotrowska-Mieczkowska opracowała protokół otrzymania preparatu antygenowo-specyficznego komórek Tregs do zastosowania u pacjentów z CT1 w postaci dwóch produktów: Tregs specyficzne względem insuliny albo względem peptydu 9-23 łańcucha β insulin. Tak przygotowane preparaty komórkowe, poddane zostały ekspansji, a następnie testom funkcjonalnym, w celu porównania ich do obecnie stosowanych w terapiach chorób autoimmunologicznych komórkami poliklonalnymi. W trakcie analiz potwierdzono, iż stosowanie przeciwciał: anti-CD 28 i anti-CD154 umożliwiło lepszą proliferację komórek antygenowo-specyficznych oraz utrzymanie wysokiego poziomu czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Wykazano ponadto, iż stymulacja Tregs za pomocą monocytów prezentujących antygeny czyni proliferację komórek reaktywnych względem tego antygeny i optymalne uzyskanie Tregs do terapii komórkowej. Rodzaj zastosowanego antygeny ma istotny wpływ na siłę proliferacji Tregs, tak więc peptyd 9-23 łańcucha β insulin warunkował uzyskanie większej ilości reaktywnych Tregs, które lepiej radziły sobie w testach funkcjonalnych dotyczących hamowania proliferacji i wydzielania INF-gamma poprzez autologiczne komórki T efektorowe w porównaniu do komórek poliklonalnych. Na tej podstawie doktorantka wyciągnęła wnioski dotyczące Ag-spec Tregs, które mają właściwości supresorowe i preferencyjnie hamują autoreaktywne klony komórek T efektorowych. Rodzaj prezentowanego zaś antygeny istotnie wpływa na jakość uzyskiwanego preparatu komórek Ag-spec Tregs, co w konsekwencji odpowiada za skuteczność innowacyjnych metod terapii.

Druga praca oryginalna „**Antigenic Challenge Influences Epigenetic Changes in Antigen-Specific T regulatory Cells**” (Front Immunol. 2021), przedstawiała badania nad rolą mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w utrzymanie prawidłowej funkcji i fenotypu Tregs. Profil epigenetyczny tych komórek został przeprowadzony dzięki pionierskiej metodzie wykorzystującej stymulację monocytami prezentującymi antygeny charakterystyczne dla CT1. Doktorantka porównuje ich profil molekularny w odniesieniu do aktualnie stosowanych w terapii komórek poliklonalnych. Dodatkowo doświadczenie przeprowadzono na populacji komórek T efektorowych o przeciwnym działaniu do Tregs. Na szczególne podkreślenie zasługuje analiza metylacji DNA globalnie oraz w specyficznym regionie TSDR w genie FoxP3, a także ocena 21 modyfikacji histonu H3 i poziomu ekspresji genów kluczowych dla Tregs (CTAL4, IL2RA, IKZF2, IKZF4, FOXP3, TNFRSF18, RUNX1, HMOX1, TET2). Doktorantka zaobserwowała, że w zależności od prezentowanego antygeny, profil epigenetyczny uzyskanych komórek ulega zmianom w poszczególnych parach Treg/Teff. Niski poziom modyfikacji histonu H3, w jednym podzbiorze z pary, wiązał się zawsze z wysokim poziomem modyfikacji w drugiej populacji. W badaniu wygenerowane Tregs posiadały wyższy profil ekspresji genów zaangażowanych w ich funkcje w porównaniu do Teffs, za wyjątkiem IKZF4 i TNFRSF18, których wysoka lub umiarkowana supresję obserwowano w Teffs specyficznych względem peptydu 9-23 łańcucha β insulin oraz względem insuliny. Dodatkowo Tregs posiadały wysoki poziom demetylacji w TSDR przy Teffs zmetylowanym w tym regionie. Niewątpliwym atutem opracowania Doktorantki są wnioski wskazujące, że w związku ze zmianą profilu epigenetycznego komórek efektorowych po procesie stymulacji najbardziej korzystny jest fragment 9-23 łańcucha β insulin do uzyskania preparatu Ag-spec Tregs posiadającego wszystkie cechy utrzymania właściwości supresorowych do terapii komórkowej będącej jak najbardziej bezpiecznej dla pacjenta.

Trzecia publikacja „**Regulatory T Cells-Related Genes are under DNA Methylation Influence**” (IJMS 2021) jest przeglądem aktualnej wiedzy na temat wpływu metylacji DNA na funkcjonalność genów kluczowych dla limfocytów Tregs (FOXP3, CTLA4, IL2RA, IKZF2, IKZF4, TNFRSF18). Określono wzór

metylacji uwarunkowujący stabilność fenotypu komórek Tregs w trakcie trwania hodowli komórkowej oraz skutki ewentualnych zaburzeń na funkcję konkretnych genów. Ważną kwestią tego przeglądu jest wskazanie odwracalnego charakteru zmian epigenetycznych i usystematyzowanie preparatów regulujących poziom metylacji DNA mogących być wykorzystywanych w terapii z zastosowaniem Tregs.

Kolejną część doktoratu stanowią niezwykle cenne wyniki badań dotychczas nieopublikowane a określające stabilność Tregs pochodzące od pacjentów z nowo rozpoznana cukrzyca typ 1 w trakcie trwania ekspansji komórkowej i porównanie ich profilu molekularnego do materiału pochodzącego od osób bez autoimmunizacji. Takiego porównania dokonano dodatkowo pomiędzy Tregs a kontrolną populacją CD4+ komórek T efektorowych. Limfocyty były hodowane przez 12 dni, a analizy wykonano w 7 i 12 dniu od stymulacji poliklonalnej (anty-CD3/anty-CD28). Doktorantka uzyskała u pacjentów z nowo rozpoznana CT1 niższy poziom mRNA dla FOXP3 i CTLA4, obniżenie transkryptu IKZF2 oraz wyższą ekspresję RUNX1, NFATC1 i NFATC2 w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku zaś Teffs heterogenność między badanymi grupami wynikała z obniżenia poziomu CTLA4, TNFRSF18 i HMOX1 oraz zwiększenia poziomu RUNX1, STAT5A i NFATC1/C2 w grupie z CT1. Niezwykle istotnym było wykazanie, że Tregs pochodzące od pacjentów z cukrzyca typ 1 posiadają znamienne wyższy poziom mRNA dla genów warunkujących właściwości supresorowe w porównaniu do Teffs. Nie obserwowano istotnych statystycznie zmian w profilu metylacji FOXP3 i CTLA-4 pomiędzy CT1 a grupa kontrolna dla komórek Tregs. Z kolei w przypadku Teffs uzyskano wzrost metylacji DNA w promotorze CTLA4 u pacjentów z CT1. Analizując modyfikacje histonu związane z represją (H3K27me3) i aktywacją (H3K4me3) transkrypcji Doktorantka wykazała, że ich poziom w Tregs i Teffs od pacjentów z CT1 są wyższe w porównaniu z kontrolą. Zatem wysuwa ciekawą hipotezę w tej grupie pacjentów dotyczącą związku pomiędzy obniżonym poziomem mRNA dla FOXP3 i CTLA4 w Tregs, a zmianami profilu modyfikacji histonu H3 co w Jej opinii wymaga jednak dalszych analiz.

Całość doktoratu kończy wspólne dla obu prac oryginalnych oraz wyników badań nieopublikowanych podsumowanie zawierające odpowiedzi na postawione wcześniej cele badawcze, w którym mgr Magdalena Piotrowska-Mieczkowska w dojrzały sposób podsumowuje wyniki swoich badań w kontekście opracowania innowacyjnych metod terapeutycznych. Podkreśla także znamienne rolę mechanizmów epigenetycznych w utrzymaniu stabilnej funkcji komórek Tregs i ich odwracalny charakter co stanowi niepodważalną podstawę do udoskonalenia współczesnych terapii komórkowych nie tylko w cukrzycy typ 1, ale również innych autoimmunopatiach.

Całość pracy, w tym załączone opublikowane prace przeczytałem z ogromnym zainteresowaniem, jej treść świadczy o dojrzałych umiejętnościach Doktorantki dotyczących planowania i realizacji zadań badawczych, prowadzenia merytorycznej dyskusji oraz wyciągania prawidłowych wniosków. Prace oryginalne zawierają niezwykle precyzyjnie przeprowadzone metody badawcze, tabele oraz ryciny graficznie ilustrujące opisywane wyniki, a także bogate światowe piśmiennictwo dotyczące podjętej tematyki. Bardzo ciekawe i wyczerpujące dyskusje obu prac oryginalnych świadczą o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Oceniana dysertacja niewątpliwie stanowi niezwykle nowatorskie rozwiązanie podjętego problemu naukowego, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę i cały zespół realizujący ten temat wskazują na realną możliwość nowocześniejszej terapii mającej na celu spowolnienie procesu autoimmunizacyjnego wysp trzustkowych i hamowania destrukcji komórek beta już w niedalekiej przyszłości. Wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej mają przełomowe znaczenie dla rozwoju diabetologii i immunologii. Wielkim życzeniem recenzenta, a zapewne również wszystkich lekarzy nie tylko diabetologów jest, aby terapia

badana i omawiana przez Doktorantkę w rozprawie stała się dostępna jak największej grupie dzieci zmagających się z cukrzycą typu 1.

Wartym podkreślenia jest niezwykła aktywność naukowa Doktorantki i Jej czynny udział w zjazdach naukowych krajowych i zagranicznych, gdzie otrzymała wyróżnienia i nagrody m/innymi od Polskiej Akademii Nauk, European Federation of Immunological Sciences 1st Symposium w Niemczech czy nagroda specjalna Rektora GUM. Jest ponadto kierownikiem projektu "Molecular changes in CTLA-4 molecule in antigen-specific cells" otrzymana w ramach program Młody Twórca Nauki-„Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza”.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej spełnia warunki określone w **art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 742)**. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zdecydowanie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Uzasadnienie

- 1) Opublikowanie wyników badań w postaci trzech, wysoko punktowanych prac, we wszystkich doktorantka jest wiodącym autorem (380 pkt MEiN oraz 20, 409 pkt IF).
- 2) Bardzo pracochłonne, skomplikowane i nowoczesne techniki badawcze/metody terapeutyczne użyte do realizacji ambitnych celów.
- 3) Oryginalny pomysł i nowatorskie opracowanie całości rozprawy.
- 4) Niezwykle istotne znaczenie kliniczne uzyskanych przez Autorkę wyników, mające realne przełożenie na postępowanie lecznicze u pacjentów z cukrzycą typu 1.
- 5) Niezbędna we współczesnej pracy naukowej umiejętność pracy zespołowej oraz zdolności organizacyjne w ramach realizacji projektów badawczych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Prof. zw. dr hab. Artur Bossowski