



Anna Brillowska-Dąbrowska

Gdańsk, 20 marca 2024

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

Recenzja rozprawy p. mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej

pt.: „Rola zmian epigenetycznych w regulacji komórek układu odpornościowego – implikacje w terapii cukrzycy typu 1”

Rozprawa p. mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej pt.: „Rola zmian epigenetycznych w regulacji komórek układu odpornościowego – implikacje w terapii cukrzycy typu 1” jest kompilacją cyklu trzech publikacji opublikowanych w czasopiśmie:

1. Cytotherapy - punkty MEiN: 100; IF: 5,414 - Iwaszkiewicz-Grzes D, Gliwinski M, Eugster A, **Piotrowska M**, Dahl A, Marek-Trzonkowska N, Trzonkowski P. Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies. *Cytotherapy*. 2020 Nov;22(11):629-641. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.07.001
2. *Frontiers in Immunology* - punkty MEiN: 140; IF: 8,787 - Iwaszkiewicz-Grzes D, **Piotrowska M**, Gliwinski M, Urban-Wójciuk Z, Trzonkowski P. Antigenic Challenge Influences Epigenetic Changes in Antigen-Specific T Regulatory Cells. *Front Immunol*. 2021 Mar 23;12:642678. doi: 10.3389/fimmu.2021.642678
3. *International Journal of Molecular Sciences* – punkty MEiN: 140, IF: 6,208 - **Piotrowska M**, Gliwiński M, Trzonkowski P, Iwaszkiewicz-Grzes D. Regulatory T Cells-Related Genes Are under DNA Methylation Influence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13):7144. <https://doi.org/10.3390/ijms22137144>

oraz części nieopublikowanych wyników.

Zadeklarowany w następujący sposób wkład Pani mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej w publikację Iwaszkiewicz-Grzes D, Gliwinski M, Eugster A, **Piotrowska M**, Dahl A, Marek-Trzonkowska N, Trzonkowski P. Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies. *Cytotherapy*. 2020 Nov;22(11):629-641 został potwierdzony przez współautorów:

- pomoc w przeprowadzaniu eksperymentów polegających na generowaniu antygenowo-specyficznych komórek T regulatorowych i T efektorowych oraz wykonywania testów funkcjonalnych, takich jak: hamowanie proliferacji i wydzielania IFN-gamma oraz ocena fenotypu wygenerowanych komórek,
- zbieranie danych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników.

Zadeklarowany w następujący sposób wkład Pani mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej w publikację: Iwaszkiewicz-Grzes D, **Piotrowska M**, Gliwinski M, Urban-Wójciuk Z, Trzonkowski P. Antigenic Challenge Influences Epigenetic Changes in Antigen-Specific T Regulatory Cells. *Front Immunol*. 2021 Mar 23;12:642678 został potwierdzony przez współautorów:

- generowanie antygenowo-specyficznych komórek Tregs i Tefts,
- walidacja metod (określenie warunków reakcji qPCR w celu oceny ekspresji genów oraz opracowanie protokołu pozwalającego na wyznaczenie poziomu demetylacji DNA w regionie TSDR w genie FOXP#),

- analiza profilu ekspresji genów,
- analiza poziomu całkowitej metylacji DNA z użyciem testu ELISA,
- analiza 21 modyfikacji histonu H3,
- określenie profilu demetylacji DNA w regionie TSDR w genie FOXP3,
- analiza i interpretacja uzyskanych wyników,
- napisanie manuskryptu.

Wkład dr hab. inż. Doroty Iwaszkiewicz-Grześ też polegał na analizie i interpretacji wyników oraz napisaniu artykułu, natomiast dr Zuzanna Urban-Wójciuk brała też udział w opracowaniu i walidacji metodologii. Dr Mateusz Gliwiński brał udział m.in. w pisaniu artykułu. Podany wkład poszczególnych autorów uzyskany w załączeniu do rozprawy doktorskiej różni się od tych podanych w publikacji. Jednakże wkład Pani Doktorantki w powstanie tej publikacji uznaję jako istotny.

Zadeklarowany w następujący sposób wkład Pani mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej w publikację: Piotrowska M, Gliwiński M, Trzonkowski P, Iwaszkiewicz-Grzes D. Regulatory T Cells-Related Genes Are under DNA Methylation Influence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13):7144 został potwierdzony przez współautorów:

- opracowanie koncepcji/planu artykułu,
- zbieranie materiałów naukowych i przeprowadzenie ich analizy merytorycznej,
- pisanie manuskryptu,
- przygotowanie rycin do publikacji,
- pozyskanie finansowania.

Wkład dr. Mateusza Gliwińskiego również polegał na pomocy w pisaniu artykułu i graficznym przedstawieniu danych, prof. dr. hab. med. Piotra Trzonkowskiego na nadzorze nad powstawaniem artykułu, recenzji i zapewnieniem jego finansowania, a dr. hab. inż. Doroty Iwaszkiewicz-Grześ w opracowanie koncepcji, recenzowanie i nadzorem nad powstawaniem artykułu. Informacje te różnią się nieco od podanych w publikacji, w której napisane jest, że w pisaniu manuskryptu brali też udział dr hab. inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ oraz prof. dr. hab. med. Piotr Trzonkowski. Wkład Pani Doktorantki w powstanie tego artykułu oceniam jako istotny.

Tak dokładna analiza wkładu poszczególnych autorów dokonana przeze mnie ma na celu zwrócenie uwagi na ważkość składanych deklaracji dotyczących wkładu w powstawanie publikacji.

Recenzowana rozprawa doktorska ma układ typowy dla rozpraw opartych na publikacjach, jednakże w jej skład wchodzi również niepublikowane wyniki badań. Nie jest to wadą rozprawy, jednak może stanowić wyzwanie w sposobie prezentacji całości wyników. Po spisie treści umieszczony jest spis publikacji, których współautorem jest Pani Doktorantka – trzy z nich są podstawą rozprawy, pozostałych pięć świadczy o zaangażowaniu Pani Doktorantki w prace naukowe.

Przedstawione po spisie publikacji cztery źródła finansowania robią duże wrażenie, szkoda jednak, że Pani Doktorantka nie napisała, kto był Kierownikiem tym projektów.

Pozostałe spisy przedstawiają inne osiągnięcia Doktorantki: udział w konferencjach, nagrody i wyróżnienia, projekty naukowe.

Wszystkie przytoczone informacje jednoznacznie wskazują, że Pani mgr Magdalena Piotrowska-Mieczkowska jest aktywnym naukowcem.

Kolejne rozdziały rozprawy zawierają wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wprowadzenie, cele badań, materiały i metody, wyniki i wnioski, podsumowanie, bibliografię. Zarówno w przypadku rozdziałów „Materiałów i metod”, jak i „Wyników i wniosków” ich podrozdziały przedstawiają oddzielnie informacje dotyczące poszczególnych publikacji oraz opisu eksperymentów nieopublikowanych. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego tak istotna część wyników nie została opublikowana.

Bibliografię tworzą osiemdziesiąt dwie odpowiednio dobrane publikacje naukowe.





Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było zdefiniowanie epigenetycznego profilu komórek antygenowo-specyficznych dla kluczowych antygenów związanych z cukrzycą typu 1 (takich jak insulina oraz fragment 9-23 łańcucha β insuliny), w kontekście ich porównawczej analizy z konwencjonalnie stosowanymi preparatami komórek poliklonalnych. Dodatkowo, badania miały na celu dokonanie precyzyjnej charakterystyki wzorca molekularnego komórek CD4+ u pacjentów z cukrzycą typu I, z naciskiem na identyfikację i ocenę stabilności ekspresji cząsteczek zaangażowanych w regulację funkcji komórek T regulatorowych w trakcie procesu ich ekspansji komórkowej. Do osiągnięcia głównego celu, zostały wyznaczone cele szczegółowe. Wszystkie z nich zostały w mojej opinii zrealizowane z użyciem odpowiednich metod, a zdecydowana większość wniosków postawionych na podstawie analizy wyników jest uprawniona.

W artykule pierwszym przedstawiono metodę otrzymywania antygenowo-specyficznych komórek T regulatorowych (Tregs) do potencjalnego zastosowania w terapii cukrzycy typu 1. Komórki T regulatorowe odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy immunologicznej i zapobieganiu chorobom autoimmunizacyjnym. Możliwość selektywnej ekspansji *in vitro* Tregs specyficznych dla antygenów jest znaczącym osiągnięciem w kontekście zastosowań terapeutycznych, w tym transplantacji oraz leczenia chorób autoimmunizacyjnych. Opracowana metoda może znaleźć zastosowanie w terapii innych chorób autoimmunologicznych, pod warunkiem zastosowania monocytów prezentujących antygeny specyficzne dla tych właśnie chorób.

W artykule drugim przedstawiono profil epigenetyczny antygenowo-specyficznych Tregs, otrzymanych dzięki zastosowaniu autorskiej metody wykorzystującej stymulację monocytami prezentującymi antygeny charakterystyczne dla cukrzycy typu I. Najcenniejszym osiągnięciem opublikowanym w tym artykule są wyniki uzyskane po zestawieniu uzyskanego profilu epigenetycznego antygenowo-specyficznych Tregs nie tylko z profilem komórek poliklonalnych stosowanych obecnie w terapii cukrzycy typu I, ale co ważniejsze z profilem epigenetycznym komórek T efektorowych. Przeprowadzenie badania metylacji w regionie TSDR w genie FIXP3 oraz analiza modyfikacji histonu H3 oraz zbadanie poziomu ekspresji genów kluczowych dla Tregs pozwoliło na odkrycie wzoru metylacji związanej z rodzajem stymulacji w odpowiednich zbiorach Treg/Teff. Ponadto uzyskane wyniki potwierdziły supresorowe działanie uzyskanych antygenowo specyficznych Tregs.

Trzeci artykuł stanowił przegląd stanu wiedzy na temat wpływu metylacji DNA na funkcjonalność genów kluczowych dla limfocytów T regulatorowych. W mojej opinii ten przegląd literatury może stanowić istotny wkład do racjonalnego wyboru modulatorów poziomu metylacji DNA jako elementów zwiększających potencjał terapii z wykorzystaniem Tregs.

Badania nieopublikowane dotyczyły określenia stabilności Tregs pochodzących od pacjentów ze świeżo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 w celu zbadania różnic między ich profilem a profilem Tregs pochodzących od osób bez zdiagnozowanych chorób autoimmunologicznych.

Poniżej przedstawiam zagadnienia, które w mojej opinii wymagają dodatkowego wyjaśnienia lub komentarza oraz wskazania elementów, które mogłyby być dopracowane, jakkolwiek nie ujmują one wartości recenzowanej pracy.

1. Wiadomo, że komórki poliklonalne, uzyskane przez stymulację anty-CD3 i anty-CD28, wywierają pozytywny wpływ na pacjentów z cukrzycą typu 1 i znacząco redukują odpowiedź zapalną. Czy Doktorantka rozważyła możliwość stosowania mieszaniny tych komórek wraz z antygenowo-specyficznymi Tregs? Proszę o analizę wad i zalet takiego podejścia.
2. W mojej opinii w rozprawie brakuje dyskusji na temat przyczyny korzystniejszego działania supresorowego komórek Tregs stymulowanych monocytami prezentującymi fragment 9-23 β



insuliny niż całą cząsteczkę insuliny. Proszę zatem o przedstawienie hipotezy wyjaśniającej mechanizm umożliwiający zachowanie tzw. pamięci epigenetycznej (o której Doktorantka wspomniała w rozprawie) przez komórki Tregs stymulowane przez monocyty prezentujące fragment 9-23 β insuliny, które wywierają korzystniejsze działanie supresorowe niż stymulowane przez całą cząsteczkę insuliny.

3. Proszę o przedstawienie swojej opinii na temat możliwości użycia Tregs stymulowanych monocytami prezentującymi inne pojedyncze fragmenty insuliny lub chimeryczne białka złożone z wybranych fragmentów insuliny.
4. Proszę o wyrażenie opinii na temat zasadności analizy sekwencji promotorów genów, których ekspresja była badana.
5. Proszę o opinię czy (parafrazując) rozbieżności występujące we wzorze metylacji DNA i w profilu modyfikacji histonu H3 u osób z T1D są przyczyną mniejszej stabilności w trakcie hodowli komórkowej limfocytów pochodzących od pacjentów z T1D w obrębie parametrów dotyczących cząsteczek Foxp3 i CTLA-4. W mojej opinii ten wniosek nie jest uprawniony, a potwierdzenie go wymaga dodatkowych badań.
6. W części rozprawy Doktorantka nie uniknęła stosowania skrótów myślowych – „Wykazano, że Tregs pochodzące od pacjentów z T1D skupiały się w większej odległości od komórek wyizolowanych z grupy kontrolnej” (str. 44), „A zatem zarówno w Tregs, jak i Teffs pochodzących od pacjentów z T1D zaobserwowano obniżenie poziomu CTLA4 oraz jednoczesny wzrost *RUNX1*, *NFATC1/C2*” (str. 45), „...analizy cytometryczne nie pokazały różnic na poziomie białka..” (str. 53).

Proszę w przyszłości przy redagowaniu prac naukowych zwracać na to uwagę.

W tym miejscu zaznaczam, że moje prośby dotyczące dodatkowego omówienia pewnych aspektów oraz wskazanie przeze mnie błędów wynikające z obowiązku recenzenta, nie mają na celu krytyki rozprawy doktorskiej i nie świadczą o istotnych niedociągnięciach. Mając to na uwadze z przekonaniem stwierdzam, że rozprawa p. mgr Magdaleny Piotrowskiej-Mieczkowskiej pt.: „Rola zmian epigenetycznych w regulacji komórek układu odpornościowego – implikacje w terapii cukrzycy typu 1” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742).