

Łódź, dn. 14.11.2020

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Ocena dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
dr nauk biologicznych Jakuba Mieczkowskiego
ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego**

Ocena osiągnięcia naukowego” Opracowanie metody rozróżnienia aktywnej i dostępnej chromatyny oraz identyfikacji zmian w strukturze chromatyny wywołanych czynnikami zewnątrzkomórkowymi”

Pan dr nauk biologicznych Jakub Mieczkowski, swą karierę naukową rozpoczął w roku 2003 jeszcze jako student a następnie realizując swoją pracę magisterską na wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego. Badając ekspresje genów z wykorzystaniem technik mikromacierzowych jak i oceny ilości kopii genów w technikach oceny w czasie rzeczywistym. W 2008 roku broniąc swoich wyników w postaci pracy magisterskiej pt.” Maksymalizacja korelacji wyników mikromacierzowych z wynikami qRT-PCR”. Uzyskując tytuł magistra matematyki ze specjalizacją w statystyce stosowanej. W roku 2008 Habilitant rozpoczyna studia doktoranckie w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nęckiego PAN. Gdzie w roku 2013 broni dysertacji pt.” Optymalizacja i opracowanie nowej metody analizy szlaków sygnałowych związanych z patogenezą nowotworów mózgu w oparciu o profilowanie ekspresji genów”.

Jakość wykonywanych badań, ich ranga i wysoki stopień wykorzystania, znalazły poparcie w propozycji jako Habilitant otrzymał z Uniwersytetu Harvarda w Bostonie. I w czerwcu 2013 rozpoczął staż naukowy post-doc w Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School in Genetics, rozwijając swoje zainteresowania w obszarze biologii, genetyki i bioinformatyki. Rozwój naukowy Habilitanta w trakcie trzy letniego stażu, uwieńczony został licznymi publikacjami o wysokim

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl

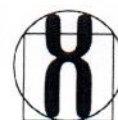


współczynnika oddziaływania, zauważonymi i docenionymi przez liczne grupy naukowe. Skutkiem powyższego są liczne współprace naukowe z Ośrodkami międzynarodowymi oraz wspólne publikacje prowadzonych prac naukowych. Staż post-doc w MGH, Harvard Medical School Habilitant zakończył w 2016 roku, jednocześnie podejmując kolejne wyzwania jakim była praca w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nęckiego PAN na stanowisku kierownika grupy naukowej w ramach Pracowni Neurobiologii Molekularnej.

W 2019 roku podjął wyzwanie kierowania Grupą Biologii Obliczeniowej w Laboratorium Medycyny Badawczej 3P w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, obejmując stanowisko adiunkta w Międzynarodowej Agencji badawczej. Gdzie do chwili obecnej realizuje swoje zainteresowania naukowe w licznych projektach i współpracach, zarówno krajowych jak i międzynarodowych.

Obszar zainteresowania chromatyną komórkową, jej struktura, interakcją z czynnikami modulującymi w aspekcie złożoności genetycznej i epigenetycznej, zaangażowania licznych genów i ich form jest głównym obszarem naukowym w jakim porusza się habilitant. Przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe kandydata pt” **Opracowanie metody rozróżnienia aktywnej i dostępnej chromatyny oraz identyfikacji zmian w strukturze chromatyny wywołanych czynnikami zewnątrzkomórkowymi**” jest cyklem trzech oryginalnych prac. W których habilitant jest pierwszym autorem. Dostarczone dokumenty współautorów powyższych publikacji, stanowisko habilitanta w pełni uzmysławiają jego ogromne zaangażowanie i pozycje naukową w powyższym obszarze. Powyższy cykl trzech publikacji, to jedna publikacja w czasopiśmie nie posiadającym współczynnika oddziaływania IF oraz nie posiadające punktów MNiSW. Dwie kolejne to czasopisma o wysokim współczynniku oddziaływania. Trzy z nich IF powyżej 9 o IF=9,462 i IF=12,124. Ocena parametryczna osiągnięcia naukowego, będącego cyklem publikacji to wartość współczynnika oddziaływania IF=21,586 oraz punkty MNiSW 90.

Epigenetyka jest stosunkowo nową dziedziną nauki, która nie ma jeszcze ściśle określonej definicji. Jest to nauka o procesach zachodzących w jądrze komórkowym, które nie są związane z sekwencją nukleotydów w łańcuchy DNA. Takimi procesami są na przykład rozmieszczanie łańcucha DNA w jądrze komórkowym, trójwymiarowe formowanie łańcucha DNA czy powiązana z tą strukturą regulacja ekspresji genów. O ekspresji genów w danej komórce decyduje wiązanie się do DNA kombinacji aktywnych czynników transkrypcyjnych, które aktywują odpowiednie geny poprzez wiązanie się z DNA we fragmentach regulatorowych. W znakomitej większości regulatorowe fragmenty DNA to poza genowe, tzn. niekodujące białka, fragmenty DNA.



Możliwość wiązania się czynników transkrypcyjnych do DNA jest związana z dostępem do wybranego fragmentu DNA. Ten z kolei, jest warunkowany przez trójwymiarową topologię łańcucha DNA wraz z już przyłączonymi do niego białkami, co określane jest jako struktura chromatyny. Zmiany środowiskowe wpływają na ekspresję genów w komórkach eukariotycznych, między innymi poprzez zmianę struktury chromatyny. Pozwalają one uaktywnionym czynnikom transkrypcyjnym aktywować wcześniej nieaktywne szlaki sygnałowe i procesy wewnątrzkomórkowe. Ponieważ struktura chromatyny określa które geny mogą być aktywowane, jej profil może pomóc w zrozumieniu i monitorowaniu procesów komórkowych, takich jak na przykład onkogeneza czy choroby neurodegeneracyjne. Wyniki uzyskane w ostatnich latach uwypukliły znaczenie zmian w strukturze chromatyny i wykazały ich znaczenie w kontekście regulacji transkrypcji, w tym w procesach chorobotwórczych oraz w odpowiedzi na terapię. Dlatego ważne jest precyzyjne określenie zmian zachodzących w chromatynie.

Habilitant w latach 2013-2016 jako pracownik naukowy uniwersytetu Harvarda uczestniczył w kilku projektach dotyczących czynników epigenetycznych wpływających na ekspresję genów poprzez zmianę stanu chromatyny w komórkach zdrowych oraz komórkach nowotworowych. Był głównym biologiem obliczeniowym w zespole, który opracował nową metodę oceny dostępności chromatyny, a także różnic pomiędzy jej dostępnością i aktywnością. Uzyskane wyniki pokazały, że obecność nukleosomów nie wyklucza dostępności do łańcucha DNA ujawniając nowe zasady regulacji ekspresji genów. Zidentyfikowana regulacja ma miejsce między innymi poprzez aktywację adaptacyjnej odpowiedzi na stres (*ang. Unfolded Protein Response*), zachodzącej w chorobach neurodegeneracyjnych. Poza potencjalną wartością kliniczną, uzyskane wyniki stanowią przełamanie jednego z dogmatów biologii molekularnej, który mówił, że do aktywacji chromatyny dochodzi poprzez usunięcie nukleosomów. Główne prace opisujące przytoczone wyniki stanowią przedstawione osiągnięcie naukowe.

Rola zmian struktury chromatyny w oporności na terapię nie jest w pełni zbadana, ale wykazano, że terapie epigenetyczne są skutecznym wsparciem dla innych rodzajów terapii, na przykład przeciwnowotworowej. Znane są inhibitory metylotransferaz DNA i inhibitory deacetylaz histonowych, które regulują niektóre immunologiczne składniki sygnalizacyjne w komórkach rakowych³⁵. Także inne badania przedkliniczne sugerowały, że modulatory epigenetyczne, działające za pośrednictwem kilku mechanizmów sygnalizacyjnych obejmujących zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki



immunologiczne gospodarza, mogą wzmocnić terapię immunologiczną. Badania przedkliniczne wykazały, że nowotwory są wrażliwe na różne inhibitory enzymów związanych z procesami epigenetycznymi. Dostępnych jest kilka metod do pomiaru dostępności chromatyny w skali całego genomu. Metody te wykorzystują albo enzymy restrykcyjne (np. nukleaza mikrokokalna - MNase, DNase), albo zaburzenia fizyczne (np. FAIRE, Sono-seq)^{46–49} do fragmentowania DNA, a następnie sekwencjonowania uzyskanych fragmentów. Inne metody wykorzystują metylację DNA (MeDIP footprinting, NOME-seq)^{50,51} lub transpozycję Tn5 (ATAC-seq)⁵², która jednocześnie wycina i oznacza fragmenty chromatyny. Każda z tych metod dostarcza użytecznych informacji i ma unikatowe zalety. Jednak niedoskonałości tych metod wynikają z faktu, że próbują one opisać niejednorodną strukturę chromatyny przy użyciu tylko jednego pomiaru.

Habilitant za cel, postawił sobie opracowanie nowej unikalnej metody analizy dostępności chromatyny. Zawierającej szczegółowe elementy opisujące chromatynę, tj.:

- Miała umożliwić rozróżnienie nukleosomów różnego typu. Miała pozwolić na profilowanie zarówno dostępnych, jak i mocno upakowanych nukleosomów.
- Miała to być metoda cało-genomowa, pozwalająca w jednakowych warunkach uzyskać profil dostępności całego genomu.
- Miała umożliwić wewnętrzną normalizację, tzn. umożliwić porównywanie profili dostępności chromatyny pomiędzy różnymi próbkami bez odnoszenia pojedynczego profilu do całej analizowanej grupy. Miało to umożliwić porównywanie profili uzyskanych dla różnych próbek, a nawet dla różnych organizmów, co ułatwi prace z wykorzystaniem modeli zwierzęcych.
- Miała to być metoda ilościowa. Miała w sposób mierzalny pozwolić na analizę dostępności chromatyny i umożliwić porównanie stopnia dostępności za pomocą ciągłej skali liczbowej.

Powyższe cele zostały opisane i zaprezentowane w trzech opublikowanych pracach naukowych stanowiących powyższe dzieło.

W pierwszej z cyklu publikacji, zaprezentowane wyniki przedstawiają opracowanie nowej metody analizy chromatyny, która w sposób mierzalny pozwala ocenić dostępność zarówno euchromatyny (luźno upakowanej chromatyny), jak i heterochromatyny (mocno upakowanej chromatyny) oraz wykazanie, że dostępna chromatyna nie musi być wolna od nukleosomów.

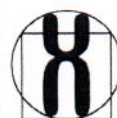
Metoda stanowiąca podstawę tej publikacji nie tylko stanowi rozwiązanie problemów z opisywaną zmiennością profili chromatyny, ale przede wszystkim, wykorzystuje tę zmienność do oszacowania



nowej charakterystyki nukleosomów. W szczególności: (i) podejście to wykorzystuje dynamiczną reakcję chromatyny na enzym trawienny i nie jest ograniczone do statycznego odczytu. Opracowana przeze mnie metoda jest zatem innowacyjna w stosunku do innych metod stosowanych obecnie do profilowania dostępności chromatyny; (ii) w przeciwieństwie do innych stosowanych metod, prezentowane podejście pozwala na ilościowy pomiar zarówno wysokiej (otwartej), jak i niskiej (zamkniętej) dostępności. Jest to zrealizowane przy pomocy niespotykanej wcześniej ocenie w skali ciągłej, która zapewnia pomiar metryczny dla każdego nukleosomu w genomie; oraz (iii) pozwala ono zarówno na pozycjonowanie nukleosomu, jak i pomiar dostępności chromatyny w tym samym badaniu. Opisana w tej pracy metoda jest stosunkowo łatwa do zastosowania w organizmach o różnej złożoności, w tym u ssaków. może opisać strukturę chromatyny w niespotykany dotąd sposób, ujawniając nowe cechy organizacji chromatyny, które są związane z regulacją genów.

W kolejnej publikacji, która ukazała się w roku 2017, Habilitant przedstawia osiągnięcia polegające na wykryciu nowego mechanizmu aktywacji ekspresji genów wynikającego z odpowiedzi na czynnik stresowy oraz wykazanie, że cało-genomowe zmiany w dostępności nukleosomów mogą dominować nad zmianami w obłożeniu nukleosomów w trakcie odpowiedzi na czynniki zewnętrzne. Przedstawiono możliwość identyfikacji zmiany dostępności i aktywności chromatyny związane z odpowiedzią na wybrany czynnik stresowy postanowiliśmy przeprowadzić pomiary w kilku punktach czasowych. Po dokładnej analizie biochemicznej, cało-genomowa analiza została przeprowadzona tuż przed traktowaniem (0h), oraz jedną godzinę (1h) i cztery godziny (4h) po traktowaniu DTT2. Habilitant, zaobserwował setki genów, które w obu punktach czasowych były istotnie podwyższone, a nawet takie, których ekspresja była podwyższana co najmniej dwukrotnie w kolejnych punktach czasowych. Wskazuje to, że traktowanie za pomocą DTT wywołuje szybką i ogólną reakcję transkrypcyjną. Przeprowadzona przez Habilitanta analiza jednoznacznie wykazało, że odpowiedź komórkowa może być związana z globalną zmianą dostępności chromatyny bez zmian w obłożeniu nukleosomów. Jest to pierwsze doniesienie o takiej regulacji w ujęciu globalnym.

Kolejnym niezwykle znaczącym dokonaniem Habilitanta jest przedstawienie danych eksperymentalnych podsumowujących uprzednio prezentowane dokonania. Przedstawia ona protokoły pozwalające przeprowadzić zarówno eksperymenty związane z omawianymi trawieniami DNA, jak i dogłębną analizę bioinformatyczną uzyskanych danych. Jej częścią jest nie tylko kod informatyczny, ale też pakiet obliczeniowy, który pozwala w relatywnie prosty i powtarzalny sposób przeprowadzić opracowaną przez Habilitanta analizę MACC. Co pozwoli na jednoczesną analizę dostępności DNA





oraz obłożenia nukleosomów. Omawiana publikacja przedstawia protokoły - eksperymentalny oraz analityczny - pakiet obliczeniowy pozwalający przeprowadzić analizę MACC, a także cały proces analizy wraz z omówieniem potencjalnych problemów. Jest to naturalne dopełnienie wcześniej opublikowanej metody i wyników wskazujących jej zastosowania.

W podsumowaniu, Habilitant stwierdza, że powyższe przedstawione osiągnięcie naukowe opisuje innowacyjną metodę pozwalającą na analizę mechanizmów regulacji ekspresji genów zarówno w euchromatinie jak i w heterochromatinie. Na przedstawione osiągnięcie naukowe składają się trzy publikacje. Opisują one kolejno autorską metodę analizy dostępności chromatyny (praca numer 1), nowatorski wynik uzyskany za pomocą tej metody i ujawniający nieopisaną wcześniej cało genomową zmianę w regulację ekspresji (praca numer 2) oraz eksperymentalny i obliczeniowy protokół pozwalający odtworzyć opracowaną analizę (praca numer 3). przyczyniły się do głębszego poznania dziedzicznego raka piersi i raka jajnika, ukazując złożony charakter obu nowotworów. Z czym w pełni się zgadzam, dodając jeszcze udział Habilitantki w rozszerzenie paneli diagnostycznych, implikacja różnych technik do pełnej oceny patogenności zaangażowanych genów jak i wieloetapowe i wielopłaszczyznowe podejście do oceny podłoża genetycznego, pokazuje niezwykle upór i zaangażowanie w prace i rzetelność otrzymywanych wyników.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Od początku swojej kariery naukowej i pracy w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nęckiego PAN w Pracowni Neurobiologii Molekularnej, w Laboratorium Medycyny Badawczej 3P w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, jak też realizując staż Post-Doc w Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School in Genetics Department, Habilitant całą swą energię skupia wokół analiz struktury i funkcjonalności chromatyny w komórkach eukariotycznych. Efektem prowadzonych przez habilitanta prac naukowo-badawczych są liczne publikacje. Jest on autorem i/lub współautorem 21 prac oryginalnych, szeregu doniesień ustnych i plakatowych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Habilitant może się pochwalić sumarycznym współczynnikiem oddziaływania **IF = 108,36**, liczbą cytowani **472 wg Web of Science**, indeks **Hirscha Web of Science wynosi 12**, MNiSW 926.

Jest również autorem jednej (jak na razie) aplikacji patentowej złożonej w Szwedzkim urzędzie patentowym. Był wykonawcą w sześciu grantach Narodowego Centrum Nauki oraz MNiSW. Jest

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl



laureatka licznych nagród i wyróżnień naukowych za wkład w rozwój i prowadzenie prac badawczych.

Ocena dorobku organizacyjnego, popularyzatorskiego i dydaktycznego.

Habilitant może się pochwalić licznymi współpracami z ośrodkami z kraju i zagranicy. Lista Instytucji jak i referencyjnych Ośrodków naukowych z którymi habilitant stale utrzymuje kontakty współprac naukowych jest imponująca. Co odzwierciedla liczne zaproszenia do współpracy naukowej i realizacji wspólnych grantów naukowych.

Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Genetyki, Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka, Gdańskiego Towarzystwa Naukowego.

Również jej zaangażowanie w działalność dydaktyczną i szkoleniową zasługuje na podkreślenie. Jest wykładowcą na kursach szkoleniowych i stażach. Prowadzi liczne zajęcia dydaktyczne ze studentami Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku w formie wykładów, seminariów i ćwiczeń. Jest opiekunem grupy badawczej w skład której wchodzi post-doc i doktorant. Prowadzi także cykliczne szkolenia ze statystyki dla doktorantów Studium Medycyny Molekularnej.

Podsumowanie.

Podsumowując, badania zaprezentowane przez habilitanta w osiągnięciu naukowym pozwoliły na wieloaspektowe udoskonalenie i wdrożenie nowych, unikalnych narzędzi identyfikacji i analizy struktury i interakcji chromatyny w organizmach eukariotycznych. Przedstawione wyniki, w powyższym osiągnięciu naukowym pomogły rozwinąć nowe metody medycyny spersonalizowanej. Bazując na uzyskanych wynikach Habilitant założył firmę oraz zgłosił wniosek patentowy dotyczący nowego sposobu identyfikacji komórek nowotworowych i dostarczania do nich substancji farmaceutycznych. Opracowana metoda dotyczy identyfikacji niefizjologicznej dostępności chromatyny i regulacji ekspresji genów.

Przedstawiona mi do oceny osiągnięcie naukowe w pełni kwalifikuje się do wyróżnienia jej przez Radę Doskonałości Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.





Wniosek Końcowy.

Po szczegółowej analizie osiągnięcia naukowego i całego dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego stwierdzam, że dr n. biologicznych Jakub Mieczkowski jest uznanym i cenionym specjalistą w zakresie genetyki i bioinformatyki identyfikacji i analizy struktury i interakcji chromatyny w organizmach eukariotycznych, samodzielnie prowadzi projekty badawcze, nawiązuje współpracę z ośrodkami w kraju i zagranicą, efektywnie współpracuje zarówno ze środowiskiem naukowym Uczelni, zarówno z diagnostami jak i klinicystami wspierając ich swą wiedza i doświadczeniem. Uważam, że habilitant jest doskonale przygotowany do funkcji samodzielnego pracownik nauki i spełnia wymogi stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, zapisane w Ustawie zgodnie z **art. 219 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018d. Dz.U. z dnia 30 sierpnia 2018r., poz.1668 ze zm.** W związku z powyższym wnoszę do **Rady Doskonałości Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku** o dopuszczenie dr n. biologicznych Jakuba Mieczkowskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Przedstawiona mi do oceny osiągnięcie naukowe **pt.” Opracowanie metody rozróżnienia aktywnej i dostępnej chromatyny oraz identyfikacji zmian w strukturze chromatyny wywołanych czynnikami zewnątrzkomórkowymi”** w pełni kwalifikuje się **do wyróżnienia** ze względu na swój nowatorski charakter prezentowanej problematyki naukowej. Wykorzystanie najnowszych technik bioinformatyki, statystyki i genetyki molekularnej oraz nowych możliwości identyfikacji powiązań chromatyny z czynnikami biologicznymi, stawiają powyższe osiągnięcie na najwyższym stopniu podium. **Nie zapominając o pełnym udokumentowaniu powyższych doniesień w formie wysoko cytowanych publikacji (IF 21,586).**

Kierownik
Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

