



Warszawa, 06.09.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Borkowskiej

pt. „*Zmiany epigenetycznych modyfikacji DNA i ekspresji regulujących je enzymów TET w procesie starzenia podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka i izolowanych z niej komórek macierzystych (ASC)*”,
wykonanej pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. n. med. Moniki-Puzianowskiej-Kuźnickiej
oraz Promotora pomocniczego, Pani dr Anny Domaszewskiej-Szostek.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Borkowskiej dotyczy ważnego klinicznie i społecznie problemu jakim jest starzenie. W rozprawie Doktorantka podjęła się analizy molekularnych mechanizmów związanych z procesami starzenia tkanki tłuszczowej człowieka. Autorka sformułowała hipotezę, zakładającą, że starzeniu podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka towarzyszy dryft epigenetyczny, obejmujący zmiany w poziomie/dystrybucji 5-hydroksymetylacji DNA i ekspresji/aktywności enzymów TET, katalizujących hydroksylację 5-metylocytozyny. Hipotezę tę postanowiła zweryfikować przeprowadzając szereg analiz molekularnych materiału biologicznego, na który składały się próbki tkanki tłuszczowej pochodzące od osób w różnym wieku. Analizy prowadzone były z wykorzystaniem zarówno metod wielkoskalowych (hMeDIP-Seq, czyli głębokiego sekwencjonowania DNA immunoprecypitowanego za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko 5hmC), jak również tradycyjnych metod biologii molekularnej i komórkowej. Wyniki analiz wielkoskalowych analizowane były za pomocą szerokiego spektrum algorytmów pozwalających na identyfikację regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem (DHMR).

Ocena formalna rozprawy:

Rozprawa ma układ typowy i składa się z 129. ponumerowanych stron, obejmujących osiem głównych rozdziałów, w tym Wstęp, Hipotezę i Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski i Bibliografię. Rozprawę dopełniają spisy tabel, rycin i stosowanych skrótów, a także Streszczenie (w języku polskim i angielskim). Obszerna Bibliografia obejmuje 255 pozycji, z których zdecydowana większość (ponad 75%) to prace opublikowane w czasie ostatnich 10 lat. Świadczy to o aktualności podjętej przez Autorkę tematyki badań.

Rozprawa napisana jest w poprawnym języku polskim, ze stosunkowo niewielką liczbą błędów literowych czy interpunkcyjnych (np. literówki w spisie rycin (Rycina 23: „Heatmapa przedstawiająca regiony o różnicowo hydroksymetylowane w komórkach ASC i fibroblastach”; Rycina 25. „Związane z wiekiem DHMR wspólny dla ASC i fibroblastów”; Rycina 26. „Analiza ekspresji genów powiązanych ze związanymi z wiekiem DHMR”); zbędna spacja na stronie 9 w drugim wierszu od dołu; nazwisko Eagle pisane małą literą na stronie 10 w dziewiątym wierszu od góry; zbędny podział wiersza na stronie 10 w siódmym wierszu od dołu; przecinki zamiast kropek w liczbach dziesiętnych podanych w angielskiej wersji streszczenia; „pierwszy” zamiast „pierwszym” w czwartym wierszu od dołu na str. 33; „Neutralizacja” zamiast „Neutralizacja” na str. 44; brak „w” między wyrazami „minut” a „temperaturze” na str. 51 w dziesiątym wierszu od dołu; „jednie” zamiast „jedynie” na str. 55 w drugim wierszu od góry; „test” zamiast „testu” na str. 55 w dwunastym wierszu od dołu; „of” zamiast „od” na str. 103 w pierwszym wierszu od dołu). Do rozprawy wkradły się też nieliczne błędy edytorskie (np. brak rozdziału II. – po rozdziale „I. Wstęp” następuje od razu rozdział „III. Hipoteza i cel pracy”) oraz gramatyczne (np. „(...) aparaturze Biot-dot podłączonym pod...”: str. 53, trzynasty wiersz od dołu). Tego typu błędy są jednak trudne do uniknięcia w tak rozbudowanych opracowaniach i w niczym nie umniejszają naukowej wartości recenzowanej rozprawy.



We Wstępie Autorka przedstawia podstawowe informacje dotyczące starzenia i roli tkanki tłuszczowej w tym procesie. Opisuje też mechanizmy epigenetycznych modyfikacji DNA, ze szczególnym uwzględnieniem roli enzymów TET. Informacje zamieszczone we Wstępie stanowią dobre wprowadzenie do kolejnych części rozprawy i w logiczny sposób prowadzą czytelnika do rozdziału, w którym Doktorantka formułuje hipotezę badawczą i cele pracy. Rozdział Materiały i Metody w precyzyjny sposób opisuje zastosowane techniki eksperymentalne i analityczne, umożliwiając czytelnikowi odtworzenie eksperymentów w niezależnym laboratorium. Uzyskane w ramach badań wyniki Autorka zaprezentowała na rycinach 7-26 oraz Tabeli 6. Ryciny przedstawiają zarówno zestawienia wykresów jak i zdjęcia mikroskopowe oraz grafiki obrazujące rozkłady ekspresji genów czy zmian w poziomie hydroksymetylacji DNA. W rozdziale Dyskusja Doktorantka umiejętnie analizuje znaczenie uzyskanych wyników w kontekście prac innych zespołów badawczych. Na szczególne podkreślenie zasługuje podrozdział „Ograniczenia i zalety pracy” w którym Autorka krytycznie odnosi się do własnych wyników, jak również udowadnia ich oryginalność i nowatorstwo. Rozdział ten w mojej opinii szczególnie dobrze świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

W porównaniu z pozostałymi częściami rozprawy, rozdział Streszczenie uważam za najslabszy, głównie z powodu jego długości. Na prawie czterech stronach Doktorantka szczegółowo opisuje podłoże teoretyczne analizowanych zagadnień, podaje drobiazgowy opis wykorzystywanych materiałów i stosowanych metod, szczegółowo opisuje wyniki. To wszystko powoduje, że czytelnikowi umyka główna konkluzja rozprawy, a tym samym rozmywa się jej rzeczywista wartość naukowa. W szczególności, w Streszczeniu zabrakło jasnego stwierdzenia, czy postawiona w rozprawie hipoteza naukowa została zweryfikowana pozytywnie czy negatywnie. W mojej ocenie, bardziej zwarte potraktowanie tego rozdziału zdecydowanie lepiej odzwierciedliłoby niewątpliwie spore osiągnięcie naukowe Doktorantki.

Ocena merytoryczna rozprawy:

Doktorantka postawiła w rozprawie liczne cele, na które składały się zbadanie zmian w ekspresji enzymów TET oraz poziomie 5hmC w procesie starzenia SAT (podskórnej tkanki tłuszczowej) i izolowanych z niej komórek ASC oraz określenie dystrybucji 5hmC i związanych z wiekiem zmian dystrybucji tej modyfikacji w komórkach ASC. Dodatkowe cele obejmowały wytypowanie regionów specyficznie 5-hydroksymetylowanych w ASC, sprawdzenie, czy istnieją regiony różnicowo hydroksymetylowane z wiekiem wspólne dla różnych komórek. Autorka poszukiwała również optymalnego algorytmu umożliwiającego uchwycenie zmian dystrybucji 5hmC w analizie wielkoskalowej. Wszystkie te cele zrealizowała, wykazując m.in, że poziom 5hmC rośnie wraz z wiekiem w podskórnej tkance tłuszczowej oraz komórkach ASC, przy braku zmian w poziomie ekspresji enzymów TET. Doktorantka uzyskała jednocześnie dane sugerujące, że z wiekiem może następować zmiana w poziomie aktywności enzymów TET. Autorka zidentyfikowała też regiony DNA podlegające z wiekiem różnicowej hydroksymetylacji. W mojej ocenie jednym z ciekawszych osiągnięć jest identyfikacja hydroksymetylowanych regionów, odróżniających populacje komórek MSC od fibroblastów (str. 86), co może w przyszłości stać się podstawą do opracowania testów molekularnych pozwalających na precyzyjne odróżnianie obu typów komórek. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorce na wyciągnięcie wniosku o tym, że „zmiany w poziomie oraz dystrybucji 5hmC w podskórnej tkance tłuszczowej człowieka oraz izolowanych z niej ASC stanowią element związanego z wiekiem dryftu epigenetycznego”.

Każde dobre opracowanie naukowe pobudza do stawiania pytań. Podobnie stało się w trakcie czytania rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Borkowskiej. W związku z tym prosiłabym, by Doktorantka odniosła się w trakcie obrony do następujących zagadnień:



- 1) Autorka w całej rozprawie konsekwentnie stosuje termin „mezenchymalne komórki macierzyste” (ang. *mesenchymal stem cells*), podczas gdy w środowisku naukowym od lat toczy się dyskusja nad zasadnością stosowania tego terminu. W 2005 roku Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (International Society for Cellular Therapy) zaleciło stosowanie zwrotów „mezenchymalne komórki zrębu” (ang. *mesenchymal stromal cells*) i „mezenchymalne komórki macierzyste” (ang. *mesenchymal stem cells*) dla różnych grup komórek spełniających określone kryteria fenotypowe (Horwitz i wsp., *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.). Terminy te były (i są nadal) wielokrotnie doprecyzowywane i dyskutowane (np. Viswanathan i wsp. *Cytotherapy* 2019 Oct;21(10):1019-1024; Dominici i wsp., *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7; Wilson i wsp., *Regen Med*. 2019 Jun;14(6):595-611.; Sipp i wsp., *Nature* 2018 Sep;561(7724):455-457). Biorąc pod uwagę toczącą się dyskusję – który z tych terminów, zdaniem Doktorantki, jest właściwszy w odniesieniu do komórek opisywanych w rozprawie?
- 2) Na stronie 23, w rozdziale Wstęp czytamy: „...usuwanie komórek senescentnych jest aktualnie uważane za obiecującą terapię zapobiegającą rozwojowi chorób związanych z wiekiem (...)”. Czy Doktorantka mogłaby rozwinąć tę myśl? Jak w praktyce taka terapia mogłaby wyglądać?
- 3) Wyniki str. 70-71, 75-76: Doktorantka prowadziła analizę poziomu ekspresji białek TET. Niestety, w rozprawie znalazły się jedynie końcowe wyniki liczbowe analizy densytometrycznej immunoblotów, przedstawione w postaci wykresów. Nie przedstawiono skanów obrazów hybrydyzacji Western blot, co utrudnia ocenę wartości tych wyników.
- 4) W rozprawie zidentyfikowano jeden gen, *RSRP1*, którego zmiany w poziomie hydroksymetylacji nie tylko korelowały z wiekiem niezależnie od typu badanych komórek, ale były też powiązane ze zmianami w poziomie ekspresji badanego genu. W rozprawie nie podano jednak bliższych informacji o genie *RSRP1*, kodowanym przez niego białku i ewentualnych konsekwencjach zmian jego ekspresji wraz z wiekiem. Czy Doktorantka mogłaby rozwinąć ten temat?
- 5) Dyskusja str. 94: „(...) CTFC wiąże się z TET1 i kieruje to białko do regionów docelowych, indukując ich hydroksymetylację/demetylację”. Biorąc pod uwagę stwierdzony przez Doktorantkę brak związanych z wiekiem zmian w poziomie ekspresji enzymów TET – czy zaobserwowane zmiany w poziomie hydroksymetylacji mogą wynikać ze związanych z wiekiem zmian w poziomie ekspresji CTFC?

Podsumowując, należy podkreślić, że powyższe wątpliwości czy nieliczne uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają wysokiej wartości naukowej recenzowanej rozprawy. Doktorantka precyzyjnie sformułowała hipotezę naukową, którą następnie zweryfikowała za pomocą prawidłowo zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, których wyniki poddała skrupulatnej analizie z wykorzystaniem różnorodnych algorytmów. Wyniki uzyskane przez mgr inż. Joannę Borkowską stanowią nowatorski wkład do wiedzy na temat molekularnych mechanizmów procesu starzenia tkanki tłuszczowej człowieka. Biorąc pod uwagę zarówno globalny trend starzenia się społeczeństw, jak i rosnący problem otyłości, rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Borkowskiej zdecydowanie dotyka aktualnych i istotnych problemów medycyny i biologii. Tym samym stwierdzam, że **rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Borkowskiej spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1668) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy.**

Kierownik Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego


prof. dr hab. n. med. Agnieszka Piekietko-Witkowska