



Prof. dr hab. n med. Agnieszka Basta-Kaim

Kraków, 12.05.2022

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bernadetty Bilskiej**

*“Rola zegara okołodobowego w regulacji wrodzonej odporności u ssaków i owadów”.*

Problematyka wpływu rytmów biologicznych na przebieg procesów fizjologicznych oraz potencjalne ich dysfunkcje, a także poznanie podłoża molekularnego tych zjawisk od wielu stanowi fascynujący trend badawczy. Dotychczasowe wyniki wskazują, że pomimo dużego zróżnicowania organizacji systemu okołodobowego na poziomie fizjologicznym i anatomicznym u organizmów mechanizm funkcjonowania zegara biologicznego wykazuje uniwersalność. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej prac wskazujących na związek pomiędzy zegarem, a poziomem aktywacji i odpowiedzi immunologicznej. Dla przykładu pokazano że mikroflora jelitowa regulowana jest przez rytmy dobowe. Kolejne badania pokazały, że interakcje te mogą mieć kluczowe znaczenie pozwalając gospodarzowi na „przewidywanie” ekspozycji na patogeny w oparciu o cykliczność przyjmowania pokarmu. Co więcej w zjawiskach tych wskazano także na rolę ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs; *Antimicrobial Peptides*), które uczestniczą we wrodzonej odpowiedzi odpornościowej.

Badania zaprezentowane w przedłożonej mi do oceny dysertacji doskonale wpisują się we wspomniane nurty, a ich ogólnym celem było określenie potencjalnego udziału zegara biologicznego w regulacji mechanizmów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej ze szczególnym spojrzeniem na peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Realizacji tego celu podjęła się Pani mgr Bernadetta Bilaska prowadząc badania pod opieką Promotora prof. dr hab. Elżbiety Pyzy oraz Promotora pomocniczego dr Mileny Damulewicz. w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych.

Rozprawę doktorską Pani mgr Bernadetty Bilskiej oparto o spójny tematycznie zbiór opublikowanych w języku angielskim w latach 2020-2022 dwóch prac oryginalnych, które ukazały się w czasopismach *Experimental Dermatology* oraz *Current Issues in Molecular Biology*. Pracę doktorską uzupełniają zwięzłe polskojęzyczne rozdziały: *Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Cel pracy, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie oraz Piśmiennictwo*. W ocenianej dysertacji umieszczono także zgodnie z

wytycznymi dla przewodów doktorskich prowadzonych w oparciu o prace wieloautorskie, oświadczenia wszystkich współautorów w których wyrażają zgodę na załączenie przez Doktorantkę wymienionych prac do rozprawy. Co więcej, oświadczenia te a także informacje podane Doktorantkę wskazują, że udział mgr Bilskiej polegał na współtworzeniu koncepcji tych prac, wyborze metod badawczych, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie wyników, przeglądzie literatury oraz uczestnictwie w przygotowaniu i redakcji manuskryptów. Tym samym był on wiodący i wynosił odpowiednio 60 oraz 55%, a Doktorantka jest pierwszym autorem obu prac. Ich sumaryczny współczynnik wpływu wynosi 6,041 (170 punktów MNiSW).

Rozdział *Wprowadzenie* niniejszej pracy doktorskiej jest krótki, gdyż zawarty został na sześciu stronach maszynopisu i w większości oparty o teksty wstępów zamieszczonych w opublikowanych pracach oryginalnych. Znalazły się w nim podstawowe informacje dotyczące rytmów biologicznych, zegara biologicznego oraz mechanizmów jego molekularnej regulacji. Autorka opisała istotę działania zegara biologicznego u ssaków, a następnie u muszki owocowej (*D. melanogaster*), wskazując na podstawowe mechanizmy transkrypcyjno-translacyjnych pętli sprzężeń zwrotnych odpowiadających za wzajemne hamowanie ekspresji głównych genów zegara u tych organizmów. Pozwoliło to na wykazanie że pomimo pewnych różnic zegar biologiczny i mechanizm jego regulacji wykazuje uniwersalność oraz translacyjność. Fragment ten stanowi zatem wprowadzenie i wyjaśnia podstawę wykorzystania zróżnicowanego materiału biologicznego (mysz, muszka owocowa) do badań przedstawionych przez Doktorantkę w dalszej części rozprawy. W rozdziale tym przedstawiono także krótką charakterystykę AMPs, podkreślając ich istotne znaczenie w modulacji odpowiedzi wrodzonej, stanowiącej kluczowy mechanizm obrony przed patogenami u bezkręgowców oraz jej znaczenie u ssaków, szczególnie w skórze. Autorka wspomina nie tylko o silnym potencjale przeciwdrobnoustrojowym tych peptydów (związany z bezpośrednią eliminacją patogenów), ale także o ich zaangażowaniu w procesy regulacji odpowiedzi immunologicznej jak proliferacja, różnicowanie czy stymulacja migracji komórek immunokompetentnych w przebiegu reakcji zapalnej czy też w mechanizmach rozwoju tolerancji i/lub oporności na terapie antybiotykami. Rozdział ten wzbogacono dwoma kolorowymi schematami, nie podając niestety ich źródła; Czy są one autorstwa Doktorantki, czy też pochodzą z innych (a jeśli tak to jakich) materiałów? W rozdziale tym zauważyłam także pewne niejasności/niezgrabne określenia, żeby wspomnieć „białko PERIOD nie mogąc utworzyć stabilnego kompleksu” z TIMLESS ulega degradacji”. Może warto byłoby wyjaśnić, że „niemożność ta” wynika z obniżonego poziomu TIMLESS, który wpływa na stabilność białka PERIOD, ulegającego w następstwie jej zmian degradacji. Co więcej rozdział ten jest w mojej ocenie trudny w odbiorze ze względu na dużą ilość zastosowanych skrótów i ich wyjaśnień umieszczonych w nawiasach. Pomimo tej powszechnie stosowanej praktyki Autorka nie zachowała konsekwencji dalszego stosowania w tekście rozprawy już tylko wspomnianych skrótów używając nadal równolegle także pełne nazwy ( np. peptydy przeciwdrobnoustrojowe - AMPs) czy *Drosophila melanogaster* – *D. melanogaster*, kryptochrom – białko CRY). Może umieszczenie przez Autorkę listy najważniejszych skrótów na początku rozprawy, a następnie ich konsekwentne stosowanie w całym polskojęzycznym tekście dysertacji pozwoliłoby uniknąć tych utrudnień.

Przedstawione we *Wstępie* informacje dały przesłanki do wyjaśnienia wyboru ogólnego *Celu pracy* przez Autorkę, który obejmował weryfikację potencjalnego wpływu zegara biologicznego na wrodzoną odpowiedź odpornościową, ze szczególnym zwróceniem uwagi na ekspresję mRNA wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Cel ten z punktu widzenia poznawczego uważam za nowatorski, gdyż obecnie praktycznie brak jest badań dotyczących tematyki podjętej w niniejszej rozprawie.

Realizacja celi szczegółowych przeprowadzona została u dwóch modelach doświadczalnych u myszy oraz u *D. melanogaster* i obejmowała: określenie dobowego wzorca ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych w skórze i wątrobie myszy C57BL/6 w warunkach światło/ciemność (LD12:12) oraz w stałej ciemności (DD); porównanie odpowiedzi immunologicznej na infekcje skórne u myszy indukowane w różnych punktach czasowych doby (co 3 godz.) oraz określenie funkcji i profilu ekspresji nowo poznanego peptydu MFF-pl wykorzystując w badaniach tych *D. melanogaster*. Wśród celi szczegółowych Doktorantka wymieniła także określenie dobowego wzorca ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych w odwołku i głowie *D. melanogaster* w warunkach światło/ciemność (LD 12:12). Realizację tego celu przedstawiono w oparciu o opis wyników, które nie zostały jeszcze opublikowane. Jednakże ze względu na fakt, iż stanowią one tematycznie spójną całość i istotne uzupełnienie opublikowanych już rezultatów, wytyczne Komisji Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ dopuszczają ich zamieszczenie w rozprawie.

Niewątpliwie jednak kluczowe znaczenie dla ocenianej rozprawy doktorskiej ma część w której zawarto zbiór dwóch opublikowanych artykułów oryginalnych. Mój niedosyt budzi fakt, iż do angielskojęzycznych manuskryptów Doktorantka nie dołączyła materiałów dodatkowych (jak *supplementary materials, supporting information*) pozostawiając czytelnikowi ich samodzielne poszukiwanie. Wartość merytoryczna wyników zaprezentowanych w obu pracach jest wysoka i oceniona została już przez recenzentów czasopism w których wyniki te zostały opublikowane, dlatego też czuje się zwolniona z obowiązku ich ponownej oceny merytorycznej. Podobnie dobór metod badawczych oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników poddane były już ocenie eksperckiej. W tym miejscu warto jednak wspomnieć, że oprócz środków uzyskanych z Narodowego Centrum Nauki na przeprowadzenie badań w jednej z prac cyklu (opublikowanej w *Experimental Dermatology*) wsparło je funduszami z grantu NIH, a realizację opisanych w pracy badań prowadzono w kilku, w tym zagranicznych ośrodkach badawczych.

W pierwszej pracy cyklu Doktorantka wykazała, że w warunkach świetlnych część genów kodujących AMPs w skórze wykazuje zmiany dobowe (*Rarres2, Camp, Defb1, Defb14*), a maksimum ich ekspresji koreluje z wysoką aktywnością lokomotoryczną myszy. Co więcej pokazano, że rytmy dobowe ich ekspresji (*Rarres2, Camp, Defb1b* mają egzogenne, podczas gdy cykliczna ekspresja *Defb14* endogenne charakter. Ciekawe są także obserwacje, wskazujące że podatność skóry na infekcje zależy od pory dnia, co wykazano infekując myszy gronkowcem złocistym (*S. aureus*). W pracy zaprezentowano także wyniki pomiaru ekspresji panelu genów AMPs przeprowadzone w wątrobie u myszy, które pokazały że tylko dwa z nich przejawiają dobowe oscylacje (*Rarres2, Defb1*), a rytmy te mają charakter endogenne.



W drugiej pracy wchodzącej w skład cyklu Doktorantka zastosowała mieszane narzędzia badawcze w tym bioinformatyczne, które pozwoliły na zidentyfikowanie u *D. melanogaster* dwóch analogów peptydu p4, będącego fragmentem chemeryny, występującego u ssaków. Natomiast właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazał jedynie peptyd MFF-p1, a obserwowano ją zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* po zakażeniu muszek owocowych *E. coli*. Jednocześnie w pracy tej pokazano, że ekspresja genu *kl-2* kodującego nowo odkryty peptyd MFF-p1 ma charakter indukowalny (wzrasta po infekcji *E. coli*) oraz regulowana jest przez zegar biologiczny. W dysertacji Autorka zamieściła także wyniki badań dodatkowych, które wykonano z wykorzystaniem główek i odwłoków samców i samic *D. melanogaster*. Ich analiza wskazuje na brak dobowych oscylacji konstytutywnej ekspresji AMPs, natomiast sugeruje, że regulacja taka może mieć miejsce na wcześniejszych etapach aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w indukowaną ich ekspresję.

Uzyskane wyniki stanowiące podstawę rozprawy mgr Bilaska zestawiała wraz z ich dyskusją w jednym rozdziale (*Wyniki i dyskusja*), który wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę zakresu tematycznego w nim opisanego. Przeprowadzona dyskusja w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych potwierdza zdolność Doktorantki do samodzielnej analizy wyników badań oryginalnych przedstawionych w obu publikacjach, chociaż sposób jej napisania wskazuje na dużą jej zbieżność z kierunkiem dyskusji przyprowadzonych we wspomnianych manuskryptach. Co więcej w niektórych miejscach tego rozdziału ponownie przytoczono fragmenty tekstu zaprezentowane już we *Wprowadzeniu* (np. str. 18 linie 10-15) oraz pojawił się wspomniany już brak konsekwencji stosowania skrótów w miejsce pełnych nazw.


Kolejne akapity rozprawy doktorskiej stanowi bardzo zwarte *Podsumowanie* w postaci trzech krótkich podpunktów. Niestety, powtórzono w nim jedynie główne wyniki uzyskane w pracach oryginalnych. W tej części rozprawy zabrakło mi chociaż krótkiego komentarza Autorki odnoszącego się zbiorczo do wszystkich uzyskanych w rozprawie doktorskiej wyników oraz wyjaśnienia potencjalnej ich przydatności w badaniach mechanizmów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Moim zdaniem takie podsumowanie mogłoby wskazać dalsze proponowane przez Autorkę kierunki badań z zastosowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w farmakoterapii opartej o podstawy chronobiologii. Proszę o rozwinięcie tego tematu w trakcie publicznej obrony.

Rozprawę kończy spis piśmiennictwa obejmujący 53 pozycje wykorzystane w tekście polskojęzycznym rozprawy, spis publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora oraz wspomniane już oświadczenia współautorów.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam wysoko, podkreślając szczególnie ogólnobiologiczny i nowatorski charakter podjętej tematyki badawczej oraz ciekawy profil przeprowadzonych badań, które z całą pewnością stanowią istotny twórczy wkład Autorki w rozwój badań nad znaczeniem roli zegara biologicznego w modulacji odpowiedzi immunologicznej u zwierząt. Podkreślić należy że mgr Bilaska wykazała się dużą wiedzą w badanym obszarze oraz posiada umiejętność właściwej interpretacji uzyskanych wyników i odnoszenia ich do dostępnych danych literaturowych, podchodząc jednocześnie z należyłą krytyką do rezultatów własnych badań.

Tym samym stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *“Rola zegara okołodobowego w regulacji wrodzonej odporności u ssaków i owadów”* spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Na podstawie przeprowadzonej oceny wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Bernadetty Bilskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik Zakładu  
Neuroendokrynologii Doświadczalnej  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk  
  
Prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim