

Warszawa, 21/09/2023

Dr hab. n. med. Marzena Ciechomska, prof. NIGRR
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji
im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Łagosz-Ćwik pt.: „Regulacja mechanizmów epigenetycznych w aktywacji zapalnej komórek strukturalnych dziąsła w przewlekłym zapaleniu przyzębia” wykonanej pod opieką prof. dr hab. Jana Potempy i dr Aleksandra Grabca w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Łagosz-Ćwik dotyczy poszukiwania epigenetycznych mechanizmów opartych o acetylację histonów i metylację DNA w aktywacji zapalnej fibroblastów dziąsła (ang. gingival fibroblasts; GFs), które mogą wyjaśniać patogenezę paradontozy.

Paradontoza/PZP czyli, przewlekłe zapalenie przyzębia, należy do najpowszechniejszych chorób o charakterze przewlekłego stanu zapalnego. Schorzenie to jest inicjowane przez bakterie beztlenowe, takie jak *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Filifactor alocis*, które kolonizują jamę ustną i namnażają się na powierzchni zębów. Konsekwencją nie leczenia paradontozy jest nieodwracalne uszkodzenie tkanek dziąsła i ostatecznie utrata zębów. Szacuje się, że blisko 30% dorosłej populacji cierpi na choroby przyzębia, zaś u 10% ostra forma choroby prowadzi do utraty zębów. GFs odgrywają kluczową rolę w patogenezie paradontozy ponieważ są jedną z najliczniejszych grup komórek dziąsła, które pod wpływem aktywacji mogą wykazywać funkcje immunologiczne, np. pośrednio poprzez indukcję infiltracji leukocytów lub bezpośrednio poprzez produkcję mediatorów prozapalnych. Zmiany epigenetyczne odgrywają kluczową rolę w modulacji stanu zapalnego, jednak dokładny mechanizm tej modulacji nie został dotąd poznany. Dlatego zbadanie mechanizmów epigenetycznych w GFs, które wpływających na przewlekły stan zapalny dziąsła i dysbiozę periodontopatogenów, może mieć ogromny potencjał poznawczy umożliwiający w przyszłości opracowanie nowych metod leczenia paradontozy u ludzi.

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Łagosz-Ćwik cechuje przejrzystą i logiczną konstrukcją. W liczącym 24 stron **Wstępie** (Rozdział 4) doktorantka bardzo skrupulatnie scharakteryzowała patofizjologię paradontozy. W podrozdziale 4.1 autorka opisała min. bakterie „czerwonego kompleksu”, do których należą silnie patogenne gatunki: *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsyhia* oraz *Treponema denticola* odpowiedzialne za zaburzenie równowagi mikrobiologicznej w tkance dziąsła (dysbioza), które w konsekwencji doprowadzają do PZP. Następnie opisała rolę GFs w patogenezie PZP

(4.2) skupiając się na interakcji immunologicznej i mediatorach prozapalnych produkowanych przez GFs, które przyczynią się do chronicznego stanu zapalnego dziąsła oraz procesach internalizacji bakterii. Wspomniany podrozdział jest ilustrowany czytelną ryciną poglądową (Rycina 1) dotyczącą roli GFs w warunkach homeostatycznych oraz w patogenezie PZP, co stanowi wartościowe i pomocne dla czytelnika uzupełnienie opisów zawartych w tekście. Należy podkreślić, że rycina została zaadoptowana na podstawie przeglądowej publikacji, która ukazała się w *Journal of Dental Research* z 2023 roku gdzie doktorantka jest drugim autorem. Wstęp kończy podrozdział (4.3) opisujący mechanizmy epigenetyczne w PZP. Doktorantka na początku nakreśliła zarys historyczny powstania teorii epigenetyki. Następnie opisała szerzej mechanizmy acetylacji histonów i metylację DNA w patogenezie PZP, które są celem niniejszej pracy doktorskiej.

- Dużą wartość dodaną byłoby gdyby doktorantka umieściła również drugi rysunek poglądowy ilustrujący wpływ modyfikacji epigenetycznych (modyfikację histonów i metylację DNA) w GFs na patofizjologię PZP.
- Należałoby również wspomnieć o kilku innych lekach modyfikujących metylację DNA jak budezonid (aktywator metylacji DNA), który od dawna stosowany jest przez klinicystów w astmie i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, czy RG108 (inhibitor metylacji DNA). Natomiast naukowcy również próbują wykorzystywać te leki w modulacji przewlekłego stanu zapalnego w RZS np. PMID: 36614150, PMID: 31443448 .

Cele rozprawy zawarte w trzech punktach (Rozdział 5) są sformułowane w sposób zwięzły i zrozumiały. Zaletą tego rozdziału jest poprzedzenie wymienionych celów krótkim naprowadzającym opisem i translacyjnym przesłaniem dotyczącym ewentualnego zastosowania pomocniczej terapii leczenia PZP z wykorzystaniem leków modyfikujących mechanizmy epigenetyczne w przyszłości, co znacznie ułatwia ich odczytanie.

Rozdziały dotyczące stosowanych **Materialów** i **Metod** (odpowiednio Rozdział 6 i 7) są bardzo techniczne. Informacje o sekwencjach starterów, liniach komórkowych i odpowiednio pogrupowanych odczynnikach przedstawione są w czytelnych tabelach, zawierających niezbędne informacje o odczynnikach i źródłach ich pozyskania. Ponadto został zilustrowany schemat układu eksperymentalnego dla lepszego zrozumienia całego procesu stymulacji GFs. Niemniej jednak zabrakło w mojej ocenie kilku istotnych informacji, które wymagają doprecyzowania:

- Brak informacji na jakiej postawie zaprojektowano startery do reakcji qPCR i jak przeprowadzono ich optymalizację.

- Brak informacji dlaczego zastosowano gen referencyjny RPLPO. Na podstawie jakich publikacji? Dlaczego nie zastosowano GAPDH, 18S, czy β -aktyna lub średniej z kilku genów referencyjnych?
- W jakiej mieszaninie były rozpuszczone inhibitory, czy było to DMSO? Jak tak to w jakim stężeniu w celu wykluczenia cytoksyczości pochodzącej od samego DMSO?
- Brak informacji lub wyników czy był robiony wcześniej gradient stężeń stosowanych inhibitorów w celu optymalizacji układu eksperymentalnego?
- Brak numeru zgody Komisji Bioetycznej UJ.

Do opisu pozostałych elementów metodycznych, czyli procedur, hodowli komórkowych, analiz biochemicznych (western blot, ELISA, cytometria przepływowa, testy proliferacji i żywotności, kochodowle z bakteriami), molekularnych (qPCR, wyciszanie genów), statystycznych nie mam zastrzeżeń. Zwraca uwagę wyjątkowo bogaty warsztat metodyczny, który doktorantka musiała opanować w trakcie realizacji swojej rozprawy. Natomiast samo sekwencjonowanie RNA i RRBS oraz analizy bioinformatyczne były zleczone zewnętrznym firmom. Natomiast analiza PCA była przeprowadzona we współpracy z Pracownią Bioinformatyki i Biologii Genomu na Wydziale Biologii, Biochemii i Biofizyki UJ.

Rozdział 7. **Wyniki** jest najdłuższy w całej rozprawie, co niewątpliwie odzwierciedla dużą ilość wyników uzyskanych przez doktorantkę. Rozdział ten liczy 41 stron, zawiera 26 rycin i jest podzielony na trzy części, które nawiązują do wcześniej stawianych trzech celów rozprawy doktorskiej. Jeżeli chodzi o pierwszy cel to doktorantka wykazała, że HDACi (ITF2357 i HDAC3/6i, ale nie HDAC6i) obniżają chemokiny prozapalne jak CCL2, CCL5 CXCL10, ale nie IL8 w wyniku stymulacji TNF na poziomie genu i białka najprawdopodobniej poprzez bezpośredni wpływ na strukturę chromaty, a nie poprzez negatywną syntezę korepresorów transkrypcji szlaków prozapalnych. Na podstawie zaprezentowanych wyników nasuwa się kilka pytań:

- Dlaczego nie zbadano poziomu IL-1 β i COX2 na poziomie białka, a tylko na poziomie genu, byłoby to bardziej spójne z resztą wyników?
- Dlaczego zastosowano metodę deltaCt jeżeli w materiałach opisano stosowanie metody 2-delta delta Ct?
- Dlaczego oba testy żywotności (uwodnienie LDH i wiązanie aneksyny V) na GFs przeprowadzono tylko w obecności pan-HDACi (SAHA i ITF2357), a nie pokazano wyników uwodnienia LDH z udziałem HDAC3/6i, który okazał się również dobrze rokującym inhibitorem stanu zapalnego?

- Podobnie, dlaczego zbadano tylko efekt SAHA i ITF2357 na internalizację bakterii, a nie pokazano wyników z udziałem HDAC3/6i?
- Warto dodać statystyczną analizę z densytometrii eksperymentów przeprowadzonych techniką western blot.
- Dlaczego przeprowadzono tylko dwa eksperymenty (n=2) dotyczące wyciszenia ekspresji HDAC1 (Ryc. 14B) co uniemożliwia przeprowadzenie analizy statystycznej i weryfikacji hipotezy z tak małej ilości powtórzeń?
- Zabrakło pozytywnej kontroli oceniającej wydajność transfekcji. Dlaczego nie przeprowadzono transfekcji GFs z udziałem fluorescencyjnego siRNA (siGLO Green or Red) wykorzystując cytometrię przepływową lub mikroskopię?

Podsumowując tę część wyników to zabrakło w mojej ocenie analogicznego panelu eksperymentów dla najlepiej rokującego inhibitora -HDAC3/6i, tak jak wcześniej przeprowadzono dogłębną analizę z udziałem SAHA i ITF2357. Ponadto szkoda, że nie udało się uzyskać większej ilości dawców. Prawdopodobnie fibroblasty pochodzące tylko od 4 dawców z PZP nie są zbyt reprezentatywne grupą badawczą.

W kolejnej części wyników, doktorantka przeprowadziła serię eksperymentów, które badały odpowiedź decytabiny (Dec) na aktywację stanu zapalnego GFs i PDGFs (fibroblasty od pacjentów z PZP). Doktorantka przeprowadziła najpierw globalną analizę genów indukowanych pod wpływem decytabiny, a następnie wybrane wyniki z transkryptomiki zostały ponownie walidowane z wykorzystaniem qPCR i ELISA. Doktorantka również analizowała efekt innych inhibitorów metylacji DNA jak 5-azacytydine i 6-tioguanine na ekspresję wcześniej wybranych genów jak *CCL20* i *MMP-1*. Ponownie nasuwa się kilka pytań dotyczących tej części doktoratu:

- Dlaczego nie zaznaczono poziomu *MMP-1* na volcano płocie z analizy RNA-seq jeżeli później przeprowadzono dogłębną analizę *MMP-1* na poziomie genu i białka wykorzystując qPCR i ELISA?
- Dlaczego przeprowadzono tylko dwa eksperymenty (n=2) dotyczące cytotoksyczności 5-Aza, 6-TG i STS (Rycina 24B) oraz poziomu produkcji *CCL20* (Rycina 25C i 26) co uniemożliwia przeprowadzenie analizy statystycznej i weryfikacji hipotezy z tak małej ilości powtórzeń?

Ostatnia część wyników dotyczyła długotrwałego wpływu *P. gingivalis* na indukcję mediatorów prozapalnych i globalnej metylacji DNA. Doktorantka wykazała, że w wyniku infekcji *P. gingivalis* komórki GFs mają podwyższony poziom IL-6, ale nie IL-8 i *MMP-1*. Natomiast nie wykazano istotnych

statystycznie zmian na poziomie metylacji DNA między infekowanymi i nie infekowanymi komórkami GFs.

W tej części również zastosowano globalne podejście, co dodatkowo podnosi rangę przeprowadzonych eksperymentów. Niemniej jednak, w pracy doktorskiej zarówno w sekcji Wyniki jak i w Dyskusji zabrakło wyczerpującego wytłumaczenia dlaczego stosowano różne miana bakteriami MOI 10, 25, 50, 100, 200 podczas inkubacji z inhibitorami (HDACi lub decytabiną)? Tak duża rozpiętość stosowanego miana bakterii (MOI od 10 do 200) może wprowadzać dodatkową zmienną do i tak skomplikowanego układu eksperymentalnego.

Dyskusja zawiera podsumowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Dyskusja jest przygotowana w sposób rzetelny i wskazuje niewątpliwie, iż doktorantka posiada umiejętności krytycznego myślenia, wyważonej oceny uzyskanych wyników, a także formułowania końcowych wniosków. Praca zawiera bibliografię liczącą 222 pozycji. Opracowanie jest staranne choć zdarzają się drobne uchybienia. Brakuje pełnej informacji dotyczącej cytacji 122. Ponadto, wybrane leki/modulatory metylacji DNA stosowane w klinice, które doktorantka zaproponowała w pracy badawczej opierają się na dość starej pracy przeglądowej z 2012 roku (cytacja 112), a powinna przytoczyć nowsze przykłady literaturowe np. PMID: 33840388. Również pojawiają się w pracy drobne błędy stylistyczne i literówki: str 7 - brak wytłumaczenia skrótu PDLFs, str 9 – powinno być „było zbadanie”, str 21 – powinno być „Warto również” str 27 – powinno być „globane HDACi, str 28 - złe formatowanie cytacji Mohn 2008, str 49 – nie ma tabeli X w Materiałach, str 64 – powinno być GFs, a nie GFS, str 66 – brakuje HDAC6i(b) na rycinie 10B, str 74 – powinno być „krotność” na rycinie 16A, str 105 – powinno być „RZS”, str 105 – powinno być „TRU”, a nie SLE jeżeli wcześniej zastosowano polską nazwę innej choroby – RZS. Ponadto, zabrakło informacji o źródle finansowania badań pracy doktorskiej i wzmiance, że znaczna część wyników została opublikowana w PMID: 36776856 i PMID: 31693860. Opublikowanie dużej części wyników w międzynarodowych czasopiśmie naukowych o czynniku wpływu ponad 7 (*Frontiers in Immunology, J Red Dent*) w których doktorantka jest pierwszym autorem jest niewątpliwie dużym atutem pracy doktorskiej.

Podsumowanie:

Przytoczone wyżej drobne uchybienia i zapytania skierowane do doktorantki mają na celu udoskonalenie i lepsze uporządkowanie pracy i nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy doktorskiej. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego zdefiniowanego przez doktorantkę i przedstawionego w celach badawczych pracy. Użycie szerokie spektrum metod badawczych, wskazuje na bardzo duże umiejętności prowadzenia pracy naukowej. W rozprawie doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnością analizy i interpretacji otrzymanych wyników. Dlatego stwierdzam,

iż przedstawiona do oceny praca Pani mgr Katarzyny Łagosz-Ćwik zatytułowana "Regulacja mechanizmów epigenetycznych w aktywacji zapalnej komórek strukturalnych działa w przewlekłym zapaleniu przyzębia" **spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z p6:zn. zm.).**

Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o **dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Łagosz-Ćwik** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie **wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej**, ze względu na wysoką rangę przedstawionych wyników, ich poznawczy charakter, który może posłużyć do opracowania nowych metod leczenia paradontozy. W szczególności terapii PZP ukierunkowanej na leki modyfikujące mechanizmy epigenetyczne. Ponadto, wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w co najmniej w dwóch pracach oryginalnych (Łagosz-Cwik KB i wsp. *Front Immunol.* 2023, Łagosz KB i wsp. *J Dent Res.* 2020) i jednej pracy przeglądowej (Wielento A, Łagosz-Cwik KB, i wsp. *J Dent Res.* 2023).

Marzena Ciechomska, Profesor Instytutu