



Dr hab. Dorota Dymkowska
Pracownia Metabolizmu Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, dn. 30.04.2025 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Oskara Ciesielskiego „Wpływ inhibicji deiminaz peptydyloargininowych oraz wyciszenia genu PAD4 na wybrane funkcje komórek śródbłónka oraz parametry epigenomu”.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Oskara Ciesielskiego została wykonana w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ. Zespół Pani Profesor Balcerczyk od wielu lat zajmuje się poszukiwaniem mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w regulację procesu angiogenezy. Przedmiotem niniejszej rozprawy było zbadanie roli cytrulinacji białek w kontekście regulacji wybranych funkcji śródbłónka naczyniowego, w szczególności ich wpływu na angiogenezę.

Modyfikacje potranslacyjne białek budzą zainteresowanie naukowców od wielu dziesięcioleci. Dostatecznie dobrze poznana jest rola fosforylacji, metylacji, acetylacji, ubikwitinacji czy glikozylacji. Wiadomo, że modyfikacje reszt aminokwasowych mogą znacząco zmienić aktywność, stabilność i możliwości interakcji białka, odgrywając w ten sposób kluczową rolę w sygnalizacji komórkowej, regulacji metabolicznej i innych kluczowych procesach biologicznych. W szczególności wiele uwagi poświęcono roli modyfikacji potranslacyjnych histonów w regulacji ekspresji licznych genów, między innymi istotnych z punktu widzenia patogenezy wielu chorób, takich jak nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne czy zaburzenia psychiczne, w tym depresja czy schizofrenia. Mimo intensywnie prowadzonych badań, ze względu na ogromne zróżnicowanie modyfikacji potranslacyjnych i liczbę możliwych kombinacji, nadal liczne istotne kwestie dotyczące znaczenia wielu modyfikacji, w tym cytrulinacji, na ekspresję genów, regulacje metaboliczne i przekazywanie sygnałów związanych z transkrypcją genów indukowanych pod wpływem stresu czy w przypadku rozwoju wybranych chorób, pozostają niewyjaśnione. Badania prowadzone w zespole Prof. Balcerczyk, również te będące przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Oskara Ciesielskiego, stanowią istotny krok w kierunku odkrywania mechanizmów molekularnych dotyczących roli modyfikacji potranslacyjnych w procesach fizjologicznych i patologicznych, których opisanie może stanowić podstawę do wytypowania ważnych celów terapeutycznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska posiada układ klasyczny, charakterystyczny dla prac doświadczalnych. Stanowi opracowanie przygotowane w języku polskim liczące 120 stron, 57 rycin i 7 tabel. Tytuł pracy odpowiada przedstawionym wynikom badań. Do rozprawy dołączono również opublikowaną pracę oryginalną zawierającą część wyników prezentowanych w rozprawie oraz pracę przeglądową prezentującą informacje zawarte we wstępie. Na ostatnich stronach doktorant prezentuje swój znaczący dorobek naukowy. Jest bowiem współautorem siedmiu publikacji w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu oraz rozdziału w monografii. Prezentował swoje wyniki w postaci prezentacji i posterów na licznych konferencjach, odbył trzy staże naukowe oraz uzyskał wyróżnienia i nagrody za działalność naukową, organizacyjną i popularyzatorską. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że doktorant był kierownikiem trzech grantów, w tym grantu Preludium (NCN) i Diamentowy Grant (MEiN) oraz był wykonawcą w grantie NAWA.

Główna część pracy została podzielona na następujące rozdziały: Wstęp teoretyczny (32 strony), Cele pracy i hipoteza badawcza (1 strona), Materiały (1 strona), Metody (20 stron), Wyniki (27 stron), Dyskusja (13 stron), Podsumowanie i wnioski (1 strona), Uwagi końcowe i przyszłe kierunki badań (1 strona) oraz Streszczenia (4 strony – wersja w j. polskim i 3 strony w j. angielskim). Pracę kończy Spis rysunków i Spis tabel oraz



Bibliografia licząca 312 pozycji literaturowych w większości publikowanych w ostatnich kilkunastu latach. Wstęp teoretyczny jest poprzedzony obszernym polsko-angielskim wykazem skrótów (4 strony), jednak zabrakło w nim rozwinięcia kilku, które można znaleźć jedynie w głównym tekście. Natomiast skróty zamieszczone na rysunku I.15 w większości nie zostały w ogóle rozwinięte.

Wstęp teoretyczny wprowadza czytelnika w tematykę związaną z modyfikacjami potranslacyjnymi białek i histonów. Treści te zostały w większości opublikowane w pracy przeglądowej w „Cellular and Molecular Life Sciences. Autor bardzo szczegółowo opisał dobrze poznane modyfikacje, takie jak metylacja czy fosforylacja, i ich znaczenie biologiczne. Wprowadza również czytelnika w tematykę dotyczącą reakcji cytrulinacji, opisując enzymy zaangażowane w jej przeprowadzanie oraz rolę tej modyfikacji w regulacji fizjologicznych procesów komórkowych, jak również potencjalne znaczenie w stanach patologicznych. Niekiedy ogromna szczegółowość opisów zawierających liczne ciągi skrótów nie ułatwia śledzenia treści. W czasie lektury tej części nasunęło mi się pytanie, czy znany jest szczegółowy mechanizm regulacji PADs przez jony wapnia.

Ostatni rozdział Wstępu teoretycznego został poświęcony komórkom śródbłonka naczyniowego, ich funkcjom fizjologicznym, w szczególności angiogenezie oraz roli mechanizmów epigenetycznych w regulacji ich funkcjonowania. W tej części zabrakło nawiązania do znaczenia cytrulinacji w funkcjonowaniu śródbłonka czy wskazania potencjalnych celów, dla których znaczenie tej modyfikacji może być kluczowe. Ponadto, ze względu na fakt, że badano aktywność mitochondriów, zasadne byłoby dodanie krótkiego podrozdziału o roli tych organelli w funkcjonowaniu komórek śródbłonka naczyniowego. Dodatkowo, w tym miejscu chciałabym zapytać czy wiadomo skąd pochodzą MMPs w przebiegu angiogenezy kielkującej i która izoforma ma tutaj szczególne znaczenie.

W kolejnej części Doktorant przedstawił trzy główne cele pracy i hipotezę badawczą. Założenia i cele pracy są jasno sprecyzowane i uzasadniają podjęte badania. Przy czym, treść części teoretycznej, nie do końca uzasadnia postawienie takich konkretnie celów. Zdecydowanie warto było uzupełnić część dotyczącą komórek śródbłonka naczyniowego o krótki komentarz, jakie konkretnie funkcje tej tkanki mogą być zmienione w przypadku zaburzenia/deregulacji procesów związanych z cytrulinacją białek i aktywnością enzymów odpowiedzialnych za ten proces.

Rozdział Metody jest w mojej ocenie najsłabszą częścią pracy. Wprawdzie opisy metod są dosyć szczegółowe, jednak w wielu miejscach mało precyzyjne, brakuje istotnych informacji, które umożliwiłyby odwzorowanie warunków eksperymentu. Stąd do tej części mam najwięcej uwag i komentarzy:

1. Komórki HAEC nie są komórkami unieśmiertelnionymi (opis ze strony ATCC: Primary Aortic Endothelial Cells; Normal, Human (HAEC)). Są to komórki pierwotne, a nie linia komórkowa.
2. Proszę o uzupełnienie, jakie były warunki hodowli wykorzystywanych różnych typów komórek śródbłonka; z którego pasażu komórki były wykorzystywane do doświadczenia (taką informację podano tylko dla komórek HUVEC); jaka była konfluencja w dniu eksperymentu. Te informacje są szczególnie ważne w przypadku komórek pierwotnych (np. HAEC), które przy długotrwałej hodowli *in vitro* mogą tracić swój fenotyp (np. pierwotne komórki śródbłonka naczyniowego tracą zdolność wydzielania NO). Czy w przypadku izolowanych komórek HUVEC doświadczenia wykonywano na mieszaninie komórek od kilku dawców czy na pochodzących od jednego dawcy?
Ponadto, nie wyjaśniono, w jaki sposób dobierano gęstość wysiewania komórek i dlaczego do różnych typów eksperymentu na taką samą powierzchnię szalki hodowlanej wysiewano różne ilości komórek (np. rozdział 3.1 i 3.2)? Ponadto, w kilku miejscach nie podano precyzyjnie, o które komórki chodzi (patrz. 4.1, 4.2 itd.)
3. Proszę o podanie końcowego stężenia DMSO podczas traktowania inhibitorami PADs oraz doprecyzowanie, w jaki sposób sprawdzano brak toksyczności?



4. Prędkości wirowania powinny być podane w wartościach RCF (względnej siły odśrodkowej), co pozwoliłoby na powtórzenie procedury z wykorzystaniem innej dostępnej wirówki.
5. Proszę o sprecyzowanie, jakie kontrole pozytywne i negatywne zostały wykorzystane w kolejnych testach? W opisie metod podano informację, że wykonano „wymagane kontrole” (np. rozdział 3.2, 13, 15...), ale np. przy oznaczeniu poziomu NO nie ma informacji o kontroli pozytywnej czy negatywnej (np. czy zastosowano inhibitor eNOS, rozdział 12).
6. Analiza Western blot i immunodetekcja: Nie podano, czy w buforze do transferu był obecny SDS?
7. Analiza progresji cyklu komórkowego: Czy komórki utrwalano wykorzystując zimny etanol? Czy była brana pod uwagę możliwość fragmentacji DNA (tzn. czy określano obecność tzw. frakcji sub-G1)?
8. Wiele nieścisłości i błędów, być może wynikających z niefortunnego tłumaczenia definicji angielskojęzycznych wkradło się do opisu metody „Ocena funkcji mitochondriów”. Pomiar z wykorzystaniem analizatora Seahorse umożliwia ocenę metabolizmu komórek w czasie rzeczywistym i skupia się na dwóch podstawowych parametrach: stężeniu tlenu w mieszaninie pomiarowej (pozwala ocenić aktywność mitochondriów) oraz pH (odzwierciedla aktywność glikolizy). W teście Cell Mito Stress sekwencyjnie dodawane są substancje regulujące aktywność systemu oksydacyjnej fosforylacji, w tym oligomycyna – inhibitor ATP-azy mitochondrialnej, FCCP – protonofor, który wyrównuje gradient protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, czyli rozprzega mitochondria, oraz inhibitory łańcucha oddechowego: rotenon – inhibitor kompleksu I antymycyna A (nie antamycyna) – inhibitor kompleksu III. Uzyskana krzywa pokazująca szybkość zmian stężenia tlenu w środowisku pomiarowym pozwala wyliczyć parametry charakteryzujące metabolizm mitochondriów, w tym oddychanie sprzężone z wytwarzaniem ATP czy też tzw. pojemność oddechową. Proszę o informację, czy przeprowadzono wstępne doświadczenie, w celu wyimareczkowania stężenia FCCP koniecznego do uzyskania maksymalnej stymulacji oddychania?

Na uznanie zasługuje opis metod dotyczących przygotowania komórek modyfikowanych genetycznie, gdzie każdy etap został opisany bardzo precyzyjnie z uwzględnieniem stężeń reagentów oraz czasu trwania kolejnych etapów.

Realizacja zadań badawczych została opisana w rozdziale 6. Wyniki. Rozdział ten został podzielony na trzy główne części, które odpowiadają zaplanowanym celom badawczym. Opis wyników jest bardzo dokładny i klarowny, uzyskane dane zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej i są prezentowane na starannie przygotowanych rycinach. Do konkretnych układów doświadczalnych konsekwentnie przypisane są wybrane kolory, co ułatwia porównywanie wyników. Niemniej jednak, dodatkowy podpis nad wykresem (np. na rycinie V.5 czy V.10 A') zdecydowanie ułatwiłoby analizę danych.

Realizację zadań rozpoczęto od potwierdzenia obecności enzymów PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1 i HUVEC, jak również w wybranych liniach nowotworowych. Proszę o informację, jakie było źródło analizowanych prób wykorzystanych do analizy poziomu PAD2 i PAD w liniach nowotworowych, bowiem nie znalazłam takiej informacji w dysertacji. W kolejnych etapach, analizowano także lokalizację tych białek w komórkach HMEC-1 wykorzystując metody immunofluorescencji. Ponadto, aby potwierdzić rolę PADs w regulacji funkcjonowania komórek śródbłona sprawdzono wpływ farmakologicznej inhibicji tych enzymów na proliferację, cykl komórkowy czy parametry istotne w przebiegu angiogenezy. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem inhibitorów zweryfikowano analizując wybrane parametry w komórkach HMEC-1 ze specyficzną obniżoną ekspresją PAD4.



Ponadto, oceniano potencjalne interakcje pomiędzy cytrulinacją a innymi potranslacyjnymi modyfikacjami histonów. Wyniki tych badań wskazują, że zahamowanie wyłącznie cytrulinacji może nie być wystarczające do tego, aby status chromatyny w komórkach HMEC-1 uległ modulacji.

Po lekturze rozdziału wyniki nasunęły mi się jeszcze następujące pytania i komentarze:

1. Na podstawie rysunku V.1 trudno jest ocenić, w jakich kompartmentach subkomórkowych są zlokalizowane analizowane białka. Czy analizowano obrazy o wyższym powiększeniu?
2. Czy w analizie profilu ekspresji cyklin (rysunek V.8) krotność określano stosunku do kontroli równej 1?
3. Pokazano wyniki analizy wewnątrzkomórkowego poziomu NO w komórkach HMEC-1. Czy takie pomiary wykonywano również w komórkach HUVEC? Czy zastosowana została kontrola pozytywna (np. efekt stymulacji histaminą) oraz negatywna (np. wykorzystanie inhibitora eNOS), aby potwierdzić poprawność pomiaru?
4. Czy poza analizą poziomu RFT w komórkach traktowanych inhibitorami PADs, analizowano również poziom enzymów antyoksydacyjnych? Takie podejście mogłoby pozwolić na wyjaśnienie czy zmiany poziomu RFT w tych komórkach wynikają ze stymulacji wytwarzania czy zmian na poziomie ich usuwania / detoksykacji RFT.
5. Wykorzystując analizator Seahorse należy pamiętać, że pomiar związany jest z badaniem szybkości zmian stężenia tlenu i pH w mieszaninie pomiarowej. Dodawanie sekwencyjnie specyficznych modulatorów systemu oksydacyjnej fosforylacji pozwala na wyznaczenie kilku parametrów opisujących w sposób szczegółowy stan energetyczny komórki. Przy czym, należy pamiętać, że nie jest to metoda służąca do pomiaru produkcji ATP (mierzymy oddychanie komórkowe zaangażowane w wytwarzanie ATP). Proszę również o informację jak normalizowano uzyskane wyniki?
Nie pokazano wyników dla tzw. zapasowej wydolności mitochondriów (spare respiratory capacity), co stanowi istotny parametr, który pozwalałby ocenić czy w komórkach traktowanych inhibitorami mitochondria mają zmienioną zdolność reagowania na zwiększone zapotrzebowanie na ATP.
6. Czym jest SAHA? W dysertacji nie podano pełnej nazwy związku.

Ostatni rozdział stanowi zwięzła dyskusja uzyskanych wyników, które Doktorant skonfrontował z dostępną literaturą, w zdecydowanej większości pochodzącą z kilku ostatnich lat. Ta część pracy wskazuje na ogromną dojrzałość naukową doktoranta. Bardzo klarownie przedstawiono interpretację uzyskanych wyników i skonfrontowano je z danymi literaturowymi. Pierwszy akapit dyskusji jest doskonałym uzasadnieniem podjętych celów szczegółowych, być może powinien być podsumowaniem informacji zawartych we wstępie.

Po lekturze tej części pracy nasunęły mi się następujące pytania i komentarze:

1. Czy wpływ zahamowania aktywności PADs na czynniki p53 i p21 jest charakterystyczny wyłącznie dla komórek nowotworowych, czy jest również obserwowany w komórkach prawidłowych?
2. Czy brak zaangażowania cytrulinacji w regulację cyklu komórkowego wyróżnia wyłącznie komórki prawidłowe?
3. Na stronie 89 napisano: „Nrf2 jest opisywany, jako pozytywny regulator”. Warto byłoby opisać ten fakt bardziej szczegółowo ze wskazaniem enzymów i szlaków regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny.
4. Niezwykle ciekawi mnie fakt, na ile poznanie szczegółowego mechanizmu regulacji metabolizmu komórek śródbłonna naczyniowego poprzez zmiany na poziomie cytrulinacji może mieć potencjalne znaczenie praktyczne, w tym w terapii chorób sercowo-naczyniowych, a jeśli tak to, jakich.



Praca zakończona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, przy czym są one bardzo długie (ponad 3 strony w języku polskim), przez co znacząca część dyskusji została w nich powielona.

Z obowiązku recenzenta, konieczna jest również ocena edytorskiej i językowej strony pracy. Praca jest przygotowana bardzo starannie i estetycznie. Nie udało się jednak uniknąć błędów interpunkcyjnych – w licznych miejscach brakuje przecinków, np. przed takimi wyrazami, jak: który, jak, w tym, a, itp. oraz literówek (str. 5 epitelialo-mezynchymalnego, str. 11 – wzrosła,). Ponadto zdarzają się powtórzenia wyrazów lub całych zdań (str. 3, legenda do rys. I.3; str. 15 – zdanie: „Na podstawie uzyskanych wyników autorzy postulują...” powtórzone jest dwa razy), błędy w odmianie wyrazów (str. 6 – z acetylacją), kalki angielskojęzyczne, stosowane mimo tego, że są polskie odpowiedniki (enhancerowy, mikrowaskularny, immortalizowany), a linker DNA to łącznik DNA a nie „łączący DNA” (str. 17). Nie mniej jednak, błędy te nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy.

Dokonując oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej i dyskusji wyników za najbardziej wartościowe osiągnięcie pracy stanowiące jednocześnie element nowości naukowej uznaję:

Wykazanie, że cytrulinacja bezpośrednio związana z aktywnością PADS odgrywa istotną rolę w regulacji ważnych funkcji komórek śródbłónka naczyńowego, w szczególności w regulacji metabolizmu tych komórek:

1. Zahamowanie PADs wpływa na potencjał angiogeny, co jest szczególnie istotne w procesach regeneracyjnych, gdzie tworzenie naczyń *de novo* jest konieczne.
2. Szczególną rolę odgrywa PAD4, co poza modelem inhibicji farmakologicznej, potwierdzono w komórkach ze stabilnie obniżoną ekspresją tego enzymu, które Doktorant wyprowadził samodzielnie.
3. Aktywność PADs może odgrywać istotną rolę w modulacji aktywności deacetylaz histonowych, wobec czego enzymy te mogą modulować strukturę chromatyny.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Oskara Ciesielskiego jest oryginalnym opracowaniem naukowym, które w istotny sposób poszerza aktualny stan wiedzy na temat cytrulinacji białek i potencjalnej roli tej modyfikacji w regulacji metabolizmu energetycznego komórek śródbłónka naczyńowego. Jestem pod ogromnym wrażeniem ilości wykonanych eksperymentów i interpretacji rezultatów uzyskanych w wyniku ich przeprowadzenia. Należy podkreślić, że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały poddane walidacji i rygorystycznej analizie statystycznej oraz bardzo krytycznej ocenie. Uważam, że część doświadczalna została dobrze zaplanowana, a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie i bardzo dojrzałe.

Ze względu na szereg zastosowanych metod badawczych i wnikliwą analizę uzyskanych wyników, oraz umiejętność ich wnikliwej interpretacji, bardzo pozytywnie oceniam przedstawioną mi do oceny dysertację, a powyższe uwagi krytyczne w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej rozprawy.



Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do Spraw Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników prezentowanych w rozprawie została opublikowana w *Cellular Physiology and Biochemistry*, co potwierdza wysoką rangę naukową tych wyników i wagę podjętej tematyki badawczej. Biorąc zatem pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, innowacyjny charakter podjętych badań, wykorzystanie zaawansowanej technologii do realizacji zadań oraz imponujący dorobek naukowy doktoranta wnioskuję do Wysokiej Komisji o stosowne wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Z wyrazami szacunku,
Dorota Dymkowska