



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

KRAKÓW, 21.08. 2023

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
KIEROWNIK ZAKŁADU IMMUNOLOGII

PROF. DR HAB. JOANNA CICHY

Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Zimy

pt. „Opracowanie modeli *in vitro*, analiza wpływu genisteiny oraz ocena udziału lizosomu w łuszczycy”

Łuszczycyca jest przewlekłą chorobą zapalną, która manifestuje się głównie patologią skóry, ale dotyka także innych organów np. stawów i głównie w takiej formie może prowadzić do trwałego kalectwa. Ponadto łuszczycyca współistnieje z chorobami sercowo-naczyniowymi, takimi jak miażdżyca, czy chorobami o podłożu autoimmunizacyjnym, np. z chorobą zapalną jelit, tzw. chorobą Leśniowskiego-Crohna. Pacjenci chorujący na łuszczycę wykazują szeroki zakres nieprawidłowości metabolicznych, np. mają tendencję do zaburzeń w gospodarce lipidowej i cukrowej, prowadzących do otyłości czy cukrzycy. Łuszczycyca zwiększa także ryzyko depresji. Szacuje się że pacjenci z tym schorzeniem, których w populacji jest kilka procent, żyją średnio około 5 lat krócej w stosunku do swoich rówieśników.

Pomimo spektakularnych sukcesów w terapii łuszczycy, które osiągnięto w ostatnich latach przy użyciu nowej generacji leków biologicznych nakierowanych głównie na hamowanie chronicznego stanu zapalnego, łuszczycę leczy się jedynie zachowawczo. Dlatego istnieje potrzeba lepszego poznania mechanizmów powstawania tej choroby, ponieważ może to przynieść wymierne efekty diagnostyczne i terapeutyczne. Przedstawiona mi do oceny praca Pani Katarzyny Zimy, która głównie skupia się na badaniach integralnej roli lizosomów w łuszczycy, z tego punktu widzenia jest aktualna i ważna.

Praca została wykonana w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką prof. dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej, pełniącej rolę promotora, i dr Marty Moskot w roli promotora pomocniczego.

Rozprawa ma formę klasycznej, ponad-stustronicowej rozprawy przygotowanej w j. angielskim. Rozprawa jest poprzedzona obszernym kilku-stronicowym streszczeniem w j. polskim oraz streszczeniem w j. angielskim. W skład dysertacji ponadto wchodzi; Wstęp z

UL. GRONOSTAJOWA 7
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 12-664-6127
EMAIL: JOANNA.CICHY@UJ.EDU.PL

wymienionymi w podpunktach celami pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Posumowanie wyników, Lista piśmiennictwa, na które powołuje się doktorantka w opisie i dyskusji pracy, lista publikacji doktorantki w formie załącznika, oraz dodatkowe wyniki „Supplementary Data”. Ta ostatnia część tj. wyniki dodatkowe nie są do końca zrozumiałe w tego typu opracowaniu, bo wydaje się, że można je było umieścić w Wynikach pracy.

Cel pracy.

Pracę badawczą realizowano w oparciu o trzy główne cele;

- (i) Opracowanie tłuszczycopodobnego modelu keratynocytów *in vitro*
- (ii) Ocena efektów przeciwzapalnych genisteiny w tłuszczycopodobnym modelu keratynocytów *in vitro*
- (iii) Scharakteryzowanie roli lizosomów i ich dysfunkcji w przebiegu łuszczycy w oparciu o opracowane modele keratynocytów 2D, organoidy skóry łuszczycowej i niezmienionej chorobowo, oraz skrawki skóry od pacjentów z łuszczycą i dawców zdrowych.

Uwagi szczegółowe:

Praca jest podzielona na kilka etapów. W pierwszym etapie badań, doktorantka poszukiwała modelu, który najlepiej odzwierciedla zmiany łuszczycowe na poziomie keratynocytów ludzkiego naskórka. W tym celu zastosowała linię komórek HaCAT lub pierwotne ludzkie keratynocyty (pKC) izolowane z bioptatów ludzkiej skóry. Oba typy komórek hodowano w monowarstwie, jako tzw. kultury 2D. W niektórych przypadkach, oprócz wymienionych typów keratynocytów, doktorantka oparła swoje badania na dostępnych komercyjnie pierwotnych keratynocytach (NHEK), a także organoidach normalnej i łuszczycowej skóry, które oprócz keratynocytów zawierały warstwę fibroblastów. W badaniach wykorzystano także biopsje skóry od pacjentów z łuszczycą, które pozwoliły na ocenę roli lizosomów w przebiegu łuszczycy, w kontekście wszystkich komórkowych komponentów skóry objętej stanem zapalnym.

Keratynocyty linii HaCAT i pKC były stymulowane mieszaniną pięciu cytokin prozapalnych występujących w łuszczycy, tj.; IL-1 α , IL-17A, IL-22, onkostatyną M i TNF- α . Stymulacja odbywała się ponadto w warunkach niskiego lub wysokiego stężenia jonów wapnia. Gradient stężeń jonów Ca²⁺, jest jednym z kluczowych czynników warunkujących procesy różnicowania keratynocytów. Drugi model badawczy, polegał na stymulacji wymienionych komórek za pomocą imikwimodu, który powszechnie stosuje się w eksperymentalnym modelu łuszczycy. Trzeci model, opierał się na traktowaniu keratynocytów za pomocą surowicy od pacjentów z łuszczycą lub surowicy zdrowych dawców. Kolejny model obejmował ko-kulturę komórek linii HaCAT oraz komórek monocytarnych THP-1,

wywodzących się z ludzkiej linii nowotworowej. Współhodowla tych komórek była ponadto traktowana mieszaniną takich czynników jak; estry forbolu, LPS i interferon γ .

Wymienione modele komórek *in vitro* były poddawane ocenie pod kątem "fenotypu tłuszczowego" na podstawie poziomu ekspresji zwykle 18 markerowych genów tej choroby. Geny, których różnicową ekspresję badano za pomocą techniki RT- qPCR obejmowały 4- funkcjonalne grupy czynników; tj., markery różnicowania keratynocytów, peptydy antybakteryjne, chemokiny oraz marker proliferacji komórek.

Na podstawie wyników tej części pracy, doktorantka wybrała model komórek HaCAT i pKC hodowanych w obecności mieszaniny pięciu cytokin, który najlepiej odwzorowywał „fenotyp komórek tłuszczowych” oceniany jako % podobieństwa profilu ekspresji testowanych genów do profilu ekspresyjnego keratynocytów w tłuszczycy. Referencje do porównań stanowiły wzory ekspresji tych genów dostępne w bazach GEO, które obejmowały zarówno profile keratynocytów tłuszczowych w hodowlach *in vitro*, jak i profile ekspresji genów w próbkach skórnych od pacjentów z tłuszczycą.

W kolejnych etapach badań komórki HaCAT i pKC stymulowane mieszaniną 5 cytokin i określane dalej jako keratynocyty o fenotypie tłuszczowym zostały wykorzystane jako główny model do badania ilości, funkcji i kontroli biogenezy lizosomów w tłuszczycy.

W pobocznym, do głównego nurtu badań, projekcie, komórki HaCAT i pKC stymulowano za pomocą IL-17 i lub TNF α aby wywołać tłuszczycopodobną odpowiedź keratynocytów. Komórkom podawano cytokiny w obecności genisteiny, w celu określenia wpływu tego izoflawonu na hamowanie aktywacji keratynocytów. Badano indukcję szlaku sygnałowego kinazy MAP, aktywację kinaz fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz ekspresję niektórych genów wczesnej odpowiedzi zapalnej w keratynocytach. Wyniki tej części rozprawy częściowo potwierdziły przeciwwapalny potencjał genisteiny *in vitro*.

W głównej części badań wykonano kompleksowe analizy ilościowe i jakościowe funkcji lizosomów i regulacji biogenezy lizosomów w keratynocytach w tłuszczycy w powiązaniu z takimi procesami jak autofagia, prezentacja antygenów w MHCII czy metabolizm lipidów, który częściowo zależy od funkcji lizosomów. W oparciu o techniki immunohistochemiczne, w których badano markery lizosomów, wczesnych endosomów, i autofagosomów, a także całkowitą pulę kwaśnych organelli komórkowych, wykazano możliwą blokadę tworzenia autofagolizosomów w powiązaniu ze zmianami tłuszczowymi w keratynocytach. Ponadto zmiany te korelowały z translokacją do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego EB (TFEB) odpowiedzialnego za stymulację ekspresji genów białek lizosomalnych. Ze względu na fakt, że funkcja czynnika TFEB podlega regulacji przez ścieżkę sygnałową Akt/mTOR (inhibitor) a także kalcyneurynę (aktywator), w kolejnej fazie projektu badano z wykorzystaniem technologii Luminex aktywację szlaku Akt/mTOR. Dodatkowo, analizowano

w jaki sposób wyciszenie ekspresji genów kodujących TFEB, kompleks 1 kinazy mTOR (MTOR) oraz kalcyneurynę za pomocą techniki interferencji RNA wpłynie na fenotyp łuszczycowy keratynocytów. Wykazano, że wyciszenie MTOR zmniejsza a wyciszenie kalcyneuryny zwiększa fenotyp łuszczycowy keratynocytów HaCAT i pKC, oceniany w oparciu o ekspresję markerowych genów łuszczy. Wyniki z wykorzystaniem organoidów keratynocytów łuszczycowych, w których farmakologicznie ingerowano w układ lizosomalny, wskazały na podwyższenie markerowych genów łuszczycowych. Z kolei, badania transkryptomyczne genów związanych z aktywnością i biogenezą lizosomów w bioptatach skóry od pacjentów z łuszczyką ujawniły, znaczące zmiany genów kodujących enzymy lizosomalne, czy czynniki biogenezy lizosomów.

Wnioski ogólne

Pozytywnym aspektem pracy jest próba spojrzenia na rolę lizosomów w łuszczyce w sposób całościowy i zintegrowany z kilkoma procesami komórkowymi o ważnym znaczeniu w łuszczyce, takimi jak autofagia, proteoliza białek w fagolizosomach, w kontekście ich prezentacji w antygenach zgodności tkankowej typu II, czy powstawanie prozapalnych biolipidów, takich jak S1P. Doktorantka podjęła się niezwykle żmudnego i kompleksowego zadania, i trudno nie docenić ogromu pracy badawczej jaki musiał stać za takim podejściem koncepcyjnym i eksperymentalnym.

Nie mam również wątpliwości, że w trakcie wykonywania swojej pracy, doktorantka posługiwała się szerokim zasobem technik badawczych, od RT-qPCR, poprzez technikę interferencji RNA, przeszukiwanie baz transkryptomicznych, po techniki immunohistochemiczne i technikę LUMINEX, co świadczy o jej dojrzałości jako eksperymentatora.

Również po stronie pozytywów pracy jest w mojej opinii próba wyjaśnienia niejednoznacznego wpływu inhibitorów kalcyneuryny takich jak takrolimus na niwelowanie niepożądanych zmian skórnych. Choć te inhibitory stosuje się w leczeniu łuszczyki, to są one często nieefektywne, lub dają skutki uboczne. Na podstawie wyników swojej pracy badawczej, doktorantka wskazuje na możliwą przyczynę takich niepożądanych efektów tych inhibitorów, wiążąc to z blokowaniem aktywacji czynnika TFEB w keratynocytach i organiczaniem fizjologicznego procesu autofagii. Takie wnioski zasługują na szczególne wysoką ocenę, ponieważ wyniki badań doktorantki szły niejako „pod prąd” utartej terapeutycznej roli inhibitorów kalcyneuryny w łuszczyce.

Na podkreślenie zasługuje także bardzo znaczący dorobek doktorantki, który obejmuje 8 prac, z czego pięć w roli pierwszego autora.

Jednocześnie kilka aspektów pracy wymaga dodatkowych wyjaśnień.

Pokazane reprezentatywne zdjęcia wyników immunohistochemicznych nie zawsze odpowiadają zbiorczym podsumowaniom np. Fig. 6A vs 6B czy 7 A vs 7B.

W przypadku analiz ekspresji genów metodą RT-qPCR, która stanowiła główną technikę wykorzystywaną w pracy, doktorantka często powołuje się na użycie dwóch genów do normalizacji wyników, tzw „housekeeping genes”. Nie było dla mnie jasne w jaki sposób otrzymane wyniki RT-qPCR bazowały na takim podejściu eksperymentalnym, tj. w jaki sposób te wyniki były normalizowane w oparciu o dwa geny.

Zaprezentowane badania, w celu weryfikacji prawidłowości modelu badawczego 2D uwzględniają jedynie ekspresję 18 genów, a w niektórych wypadkach jedynie 4 genów (np. w przypadku traktowania keratynocytów surowicami od pacjentów z łuszczycą i od zdrowych dawców), co może budzić obawy co do stopnia w jaki użyte modele badawcze odzwierciedlają zmiany molekularne w łuszczycowym naskórku. Nie jest też dla mnie do końca przekonujący sposób w jaki doktorantka ocenia poprawność tego modelu, tj. jako % genów których ekspresja zgodnie z oczekiwaniami rośnie lub maleje. Z opisu Tabeli 1, w której przedstawiono listę tych 18 genów funkcjonalnie obejmujących; różnicowanie keratynocytów, peptydy antybakteryjne, chemokiny czy znacznik proliferacji komórek, nie wyłania się spójny obraz tego na jakiej podstawie te geny zostały wybrane do analizy modeli badawczych. W tym miejscu doktorantka powołuje się na wcześniejsze publikacje. Ponieważ ten wybór w dużym stopniu zadecydował o dalszych analizach, z korzyścią dla pracy byłoby podanie założeń tego wyboru. Prosiłabym o taki zarys w trakcie obrony.

Praca ma dość złożony charakter. Oprócz wielowątkowych analiz dotyczących działania i regulacji biogenezy lizosomów, doktorantka także przedstawia wyniki dotyczące wpływu genisteiny, w którym stosuje niepełny panel cytokin do wywołania zmian łuszczycowych. Jeśli zastosowanie IL17 i TNF α jest wystarczające do wywołania takich zmian, to dlaczego inne analizy oparto o stymulację keratynocytów mieszaniną aż pięciu cytokin? Pomimo tego, że jak wskazuje doktorantka, genisteina jest modulatorem TFEB, który był badany w kontekście biogenezy lizosomów, to ten w mojej opinii poboczny projekt, zaburza spójność pracy. Ponadto, wybór pięciu cytokin do stymulacji keratynocytów, wymaga także bardziej pełnego i przekonującego uzasadnienia, w kontekście zamiennego użycia jedynie dwóch cytokin z tego panelu do wywołania zmian łuszczycopodobnych. W łuszczycy oprócz stosowanych cytokin, jest wiele innych np. IL-1 β czy IL-36 o równie istotnej funkcji. Ponadto, ten panel był już stosowany do oceny wpływu na keratynocyty w kontekście łuszczycy (np. ref 150, w spisie cytowań).

Jednak najbardziej kontrowersyjna jest moim zdaniem próba porównań keratynocytów 2D traktowanych cytokinami w niskim stężeniu jonów Ca z komórkami kontrolnymi (niestymulowanymi cytokinami), ale hodowanymi w wysokim stężeniu wapnia. Moim

zdaniem takie porównania są mylące i niezrozumiałe, ze względu na fakt, że cytokiny nie tylko wpływają na spadek różnicowania keratynocytów, a wysokie stężenie wapnia nie tylko stymuluje proces różnicowania tych komórek. Raczej w tym wypadku należało porównać keratynocyty stymulowane i niestymulowane mixem 5 cytokin, w obu przypadkach hodowane w wysokim stężeniu Ca^{2+} , aby porównać komórki różniące się w sposobie traktowania tylko jedną zmienną, tj. obecnością lub brakiem cytokin w pożywce. Co ciekawe, sama doktorantka wspomina, że takie porównania ujawniły najbardziej znaczące zmiany w obrębie badanych transkryptomów keratynocytów hodowanych w monowarstwie, ale opatrzyła ten komentarz stwierdzeniem „data not shown” (str. 69). Prosiłabym o wyjaśnienie dlaczego nie pokazano tych danych, a zamiast tego dokonano takich niejednoznacznych porównań.

Wnioski końcowe

Powyższe uwagi i sugestie nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy. Szeroki zakres badań wykonanych przez doktorantkę wsparty rozbudowanym warsztatem badawczym plus duża aktywność publikacyjna doktorantki zasługują na wysoką ocenę.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w. zw. Z. art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz 1669 z późn. zm.). Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Katarzyny Zimy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

