

Poznań, 17.10.2023

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN
Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja osiągnięcia naukowego dr Karoliny Pierzynowskiej
pt. „Wykorzystanie danych transkryptomicznych do identyfikacji nowych celów
terapeutycznych dla lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz”.

Podstawowe dane o Kandydatce

Pani dr Karolina Pierzynowska uzyskała dyplom magistra biologii w 2015 roku na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne uzyskała w tej samej jednostce w roku 2020, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. *„Indukcja autofagii jako mechanizm działania genisteiny w eksperymentalnej terapii chorób neurodegeneracyjnych”*. Promotorem rozprawy doktorskiej był Profesor dr hab. Grzegorz Węgrzyn.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej dr Karolina Pierzynowska odbyła dwa krótkie staże naukowe, w tym jeden w Katedrze Biochemii na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2 miesiące) oraz kolejny, w Laboratorium Neuropatologii Molekularnej, Zakład Biochemii Instytutu Nauk Neurologicznych Blanchette Rockefeller, West Virginia University, Morgantown, USA (1 miesiąc). Ponadto, w ramach współpracy z grupą prof. Sibirnego, Habilitantka odbyła kilka wizyt w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie. W ramach powyższej współpracy powstała publikacja naukowa. Ze względu na prowadzenie prac badawczych zarówno na Uniwersytecie Gdańskim jak i w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk, w artykule tym dr Karolina Pierzynowska ma przypisaną afiliację obu tych jednostek naukowych. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku publikacji powstałej w ramach współpracy z Katedrą Biochemii na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W związku z powyższym, pomimo, że Kandydatka nie odbyła długoterminowego stażu podoktorskiego, wykazała się ona istotną aktywnością naukową w więcej niż jednej instytucji naukowej, w tym instytucji zagranicznej. Zgodnie z informacją załączoną w Autoreferacie Kandydatka jest obecnie zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, kierowanej przez prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Obowiązujące przepisy prawa na dzień wszczęcia ocenianego postępowania habilitacyjnego
Obowiązujące kryteria oceny odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe pt. „Wykorzystanie danych transkryptomycznych do identyfikacji nowych celów terapeutycznych dla lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz” składa się cykl 10 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (obejmujących 7 prac doświadczalnych i 3 prace przeglądowe), opublikowanych w latach 2020-2023. We wszystkich pracach udział Pani dr Karoliny Pierzynowskiej jest wiodący, jest ona pierwszą autorką lub autorką korespondującą we wszystkich z nich. Znaczący udział Habilitantki w ww. pracach potwierdzają też Oświadczenia Kandydatki oraz współautorów prac, określające ich udział w przygotowaniu publikacji. Rozprawa habilitacyjna pod względem formalnym jak i merytorycznym spełnia wszystkie wymagania stawiane postępowaniom habilitacyjnym.

Tematyka badawcza przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego skupia się wokół molekularnych podstaw rzadkich chorób genetycznych człowieka z grupy mukopolisacharydoz (MPS). Przyczyną tych chorób są mutacje w genach kodujących enzymy lizosomalne, co skutkuje akumulacją glikoaminoglikanów (GAG) w lizosomach, a to z kolei uruchamia kaskadę procesów komórkowych prowadzących do deregulacji homeostazy komórki. Szerokie spektrum objawów obserwowanych u pacjentów jak również zróżnicowany przebieg różnych typów MPS sugeruje istnienie dodatkowych czynników wpływających na patogenezę tych chorób.

Głównym celem badań Habilitantki było poszukiwanie nowych czynników genetycznych, nie związanych z metabolizmem GAG, mogących wpływać na przebieg mukopolisacharydoz i charakter objawów. Do identyfikacji genów i procesów komórkowych potencjalnie zaangażowanych w patogenezę MPS dr Karolina Pierzynowska wykorzystwała wysokoprzepustowe analizy transkryptomiczne, a ich wyniki były weryfikowane metodą RT-qPCR (dla wybranych genów). Modelem badawczym były komercyjnie dostępne fibroblasty ludzkie, pochodzące od pacjentów, reprezentujące wszystkie typy MPS. Jako kontrolę zastosowano linię zdrowych fibroblastów. Wyniki analiz transkryptomicznych zostały przedstawione w postaci 7 publikacji eksperymentalnych, w których skupiono się na genach związanych z zachowaniem (1), aktywacją komórek (2), aktywnością proteasomu (3), homeostazą jonową (4), sygnalizacją komórkową (5), fałdowaniem białek (7) oraz aktywnością rybosomów (8).

Celem pierwszej publikacji eksperymentalnej pt. „Genetic Base of Behavioral Disorders in Mucopolysaccharidoses: Transcriptomic Studies” opublikowanej w czasopiśmie *Int. J. Mol. Sci (MDPI)* było poszukiwanie zmian w ekspresji genów związanych z określonymi zaburzeniami zachowania obserwowanymi u pacjentów. Stwierdzono istotne różnice w poziomach transkryptów, zarówno w porównaniu do linii kontrolnej jak i pomiędzy różnymi typami MPS. W wyniku szczegółowej analizy danych autorzy wytypowali geny, które mogą mieć związek z zaburzeniami zachowania. Wśród nich najwięcej zmienionych transkryptów zidentyfikowano w MPS3a, a najmniej w MPS6, co dobrze koreluje z symptomami obserwowanymi u pacjentów. Zmienione transkrypty zostały zakwalifikowane do odpowiednich kategorii, gdzie najliczniej reprezentowane były w kategorii uczenie się i pamięć oraz zachowania lokomotoryczne. Autorzy wytypowali 8 genów wspólnych dla większości podtypów MPS, wśród nich receptor dla oksytocyny (OXTR), który wzbudził największe zainteresowanie Habilitantki. Zmiany ekspresji tych genów mogą tłumaczyć niektóre symptomy m.in. zaburzenia ze spektrum autyzmu czy deficyty uczenia się i pamięci. Ciekawym eksperymentem było zastosowanie enzymu normalizującego poziom GAG w komórkach, co spowodowało odwrócenie się

trendu w poziomie ekspresji badanych genów. Potwierdziło to wiarygodność uzyskanych wyników i związek obserwowanych zmian ekspresji z patogenezą MPS. Podsumowując, przeprowadzone przez dr Karolinę Pierzynowską analizy wyjaśniły podstawy molekularne niektórych symptomów u pacjentów z MPS. Co więcej, Habilitantka potwierdziła, że fibroblasty mogą być dobrym modelem do tego typu badań, choć szkoda, że autorzy nie użyli kilku linii kontrolnych w eksperymencie RNAseq (uwaga ta dotyczy również pozostałych prac wykorzystujących dane z analiz transkryptomycznych).

W kolejnej publikacji pt. *“Transcriptomic Changes Related to Cellular Processes with Particular Emphasis on Cell Activation in Lysosomal Storage Diseases from the Group of Mucopolysaccharidoses”* *Int. J. Mol. Sci.* Habilitantka przeprowadziła podobne analizy, skupiając się na procesach aktywacji komórek, wzrostu komórek, podziałów i rozpoznawania komórek. W ramach tych czterech kategorii zidentyfikowała geny ulegające podwyższonej i obniżonej ekspresji w modelach komórkowych MPS. Wśród genów, które ulegały istotnej zmianie w kilku typach MPS był gen CLU, kodujący klasterynę oraz gen CD9 kodujący glikoproteinę powierzchniową tworzącą kompleksy z integrzynami. Dla wybranych genów przeprowadzono analizy RT-qPCR potwierdzające wyniki analiz wielkoskalowych. Wyniki badań omówiono w świetle molekularnych patomechanizmów MPS, wskazując, że zmiany wtórne i/lub trzeciorzędowe w stosunku do magazynowania GAG, mogą wpływać na dysfunkcje komórkowe i przyczyniać się do molekularnych mechanizmów choroby. Może to tłumaczyć brak skuteczności niektórych terapii w łagodzeniu złożonych objawów MPS.

Do podobnych wniosków doprowadziły badania opisane w pracy nr 3 pt. *„Proteasome Composition and Activity Changes in Cultured Fibroblasts Derived From Mucopolysaccharidoses Patients and Their Modulation by Genistein”*, opublikowanej w czasopiśmie *Front. Cell Dev. Biol.* Celem pracy była analiza składu i funkcji proteasomu w modelach komórkowych wszystkich typów MPS oraz zbadanie wpływu genisteiny na aktywność proteasomu. W wyniku analiz transkryptomicznych Habilitantka zidentyfikowała geny o zmienionej ekspresji w stosunku do kontroli w modelach komórkowych różnych typów MPS. Wykazała m.in. obniżoną ekspresję jednego z genów kodujących podjednostkę regulatorową proteasomu oraz podwyższoną ekspresję genu *ADRM1*, kodującego białko proteasomalne działające jako receptor ubikwityny. Autorzy potwierdzili zwiększoną aktywność proteasomu w komórkach pacjentów MPS, a genisteina wpływała na jej obniżenie. Na podstawie tych badań Habilitantka wnioskuje, że inhibicja aktywności proteasomu może być zastosowana w terapii MPS (podobnie do strategii stosowanych w niektórych typach nowotworów).

W kolejnej publikacji pt. *“Impaired ion homeostasis as a possible associate factor in mucopolysaccharidosis pathogenesis: transcriptomic, cellular and animal studies”* (Metabolic Brain Disease, Springer) Habilitantka skupiła się na identyfikacji zmian poziomów transkryptów związanych z utrzymaniem równowagi jonowej. Zidentyfikowała ponad 50 transkryptów zmienionych istotnie w kilku typach MPS, których funkcje związane są z homeostazą jonową. Powyższym zmianom towarzyszyły obniżone poziomy niektórych jonów w komórkach fibroblastów oraz w modelu mysim MPS1. Badania prowadzone w ramach tego projektu doprowadziły do wniosku, że suplementacja jonów może być stosowana jako element wspomagający w terapii MPS.

W pracy nr 5 pt. *„Changes in expression of signal transduction-related genes, and formation of aggregates of GPER1 and OXTR receptors in mucopolysaccharidosis cells”* (*Eur J Cell Biol*, Elsevier) Habilitantka analizowała zmiany w ekspresji genów związanych z procesami przekazywania sygnałów.

Spośród 300 genów wybrała te, charakteryzujące się bardzo wysokimi zmianami oraz obecnością efektu w kilku typach MPS. Taki sposób selekcji doprowadził do wyboru dwóch genów do dalszych analiz. Jednym z nich był receptor dla oksytocyny, który charakteryzował się podwyższoną ekspresją w komórkach MPS. Dla odróżnienia, błonowy receptor estrogenowy wykazywał spadek ekspresji w komórkach MPS. W kolejnych eksperymentach dr Karolina Pierzynowska badała poziom białka tych dwóch receptorów w komórkach MPS oraz wpływ obniżenia poziomu GAG na te receptory. Powyższe eksperymenty dały niejednoznaczne wyniki. Dla receptora estrogenowego wykazano obniżony poziom białka, co jest zgodne z wynikami badań transkryptomicznych. W zależności od typu MPS obniżenie poziomu GAG miało niewielki wpływ lub nie wykazywało wpływu na poziom tego receptora. Jednocześnie analizy mikroskopowe wykazały obecność agregatów receptora estrogenowego w komórkach MPS1, które zniknęły po obniżeniu poziomu GAG. Podobnie, poziom receptora dla oksytocyny był podwyższony tylko w jednym typie MPS, a zastosowanie czynników obniżających poziom GAG prowadziło do jego normalizacji. Dla odróżnienia, agregaty białkowe tego receptora były obecne w dwóch badanych typach MPS i były zależne od poziomu GAG. Habilitantka wykazała, że oba receptory mogą oddziaływać z GAG w przypadku jego podwyższonego stężenia. Na podstawie powyższych eksperymentów Autorka zaproponowała nowy potencjalny patomechanizm MPS. Są to bardzo ciekawe obserwacje, wymagające dalszych badań na innych modelach MPS, w tym *in vivo*. Lepsze poznanie procesów agregacji białek zależnych od poziomu GAG jest niezbędne do wnioskowania na temat ich udziału w patogenezie MPS i opracowania potencjalnych terapii.

Nieprawidłowe fałdowanie białek jest dobrze znanym elementem patogenezy MPS. W kolejnej pracy pt. *“Decreased Levels of Chaperones in Mucopolysaccharidoses and Their Elevation as a Putative Auxiliary Therapeutic Approach”* (Pharmaceutics, MDPI) Habilitantka określiła poziomy głównych białek chaperonowych Hsp40 i Hsp70 w komórkach pochodzących od pacjentów z MPS1 i MPS2. Wykorzystując metodę WB oraz mikroskopię fluorescencyjną wykazała znacznie obniżony poziom Hsp70 i Hsp40 w komórkach MPS1 i MPS2. Co ciekawe, o ile w mózgu myszy MPS1 wynik ten został potwierdzony, to w wątrobie poziom Hsp70 był podwyższony. Obniżenie poziomu GAG w komórkach MPS nie przywracało normalnego poziomu Hsp70 i Hsp40. W kolejnych eksperymentach Habilitantka przeanalizowała dane transkryptomiczne dla wszystkich typów MPS w poszukiwaniu genów związanych z procesami fałdowania białek. Wśród genów o zmienionej ekspresji Autorka zidentyfikowała gen kodujący klasterynę, opisywany wcześniej w kontekście procesu aktywacji komórek. W Podsumowaniu dr Karolina Pierzynowska proponuje wiele różnych strategii terapeutycznych dla MPS prowadzących do podwyższenia poziomu kluczowych białek chaperonowych.

W kolejnej pracy eksperymentalnej pt. *“Differences in gene expression patterns, revealed by RNA-seq analysis, between various Sanfilippo and Morquio disease subtypes”* (Gene, MDPI) Habilitantka określiła profile ekspresji genów w komórkach pochodzących od pacjentów ze wszystkimi podtypami choroby MPS3 i MPS4 oraz podjęła próbę korelacji tych zmian z objawami obserwowanymi u pacjentów. Najistotniejsze zmiany pomiędzy różnymi typami MPS3 zaobserwowano dla genów związanych z funkcjami rybosomów oraz strukturą tkanki łącznej.

W skład ocenianego osiągnięcia wchodzi również trzy artykuły przeglądowe. Pierwszy z nich *“Roles of the Oxytocin Receptor (OXTR) in Human Diseases”* (Int. J. Mol. Sci, MDPI) podsumowuje stan wiedzy na temat zaburzeń w funkcjonowaniu receptora oksytocyny i jego wpływu na przebieg różnych chorób. Udział Habilitantki obejmował opis roli receptora oksytocyny w chorobach układu

rozrodczego, regulacji zachowań rodzicielskich oraz zaburzeniach psychicznych. W kolejnej obszernej pracy przeglądowej pt. „*Ferroptosis and Its Modulation by Autophagy in Light of the Pathogenesis of Lysosomal Storage Diseases*” (Cells, MDPI) dr Karolina Pierzynowska skupiła się na procesie śmierci komórkowej na drodze ferroptozy, jego związku z autofagią i chorobami lizosomalnymi. Jest to tematyka, którą Habilitantka planuje zająć się w najbliższym czasie w ramach projektu NCN Sonata (tytuł projektu: „*Molekularny mechanizm zaburzeń ferroptozy w mukopolisacharydozie typu I oraz ich wpływ na przebieg choroby*”). W ostatniej pracy przeglądowej pt. “*Oxidative Stress in Mucopolysaccharidoses: Pharmacological Implications*” (Molecules, MDPI) Autorka opisała rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie MPS. Zebrała informacje na temat markerów stresu oksydacyjnego w MPS i wpływu różnego typu terapii na poziomy tych markerów. Wszystkie artykuły przeglądowe są ściśle powiązane tematycznie z badaniami eksperymentalnymi prowadzonymi przez Habilitantkę i stanowią cenne źródło informacji na omawiane tematy.

Podsumowując stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr Karoliny Pierzynowskiej stanowi istotny wkład w rozwój badań nad patogenezą chorób MPS. Publikacje stanowiące podstawę wniosku habilitacyjnego wskazują na deregulację wielu procesów komórkowych, które współtowarzyszą akumulacji GAG w przebiegu MPS. Do najważniejszych osiągnięć Habilitantki zaliczam (i) zidentyfikowanie genów (*OXTR*, *GPB1*, *CLU*, *MFG8*, *MME*), które mogą modulować przebieg choroby, będąc tym samym potencjalnym celem dla przyszłych terapii oraz (ii) wykazanie, że receptory estrogenowy oraz oksytocyny mogą tworzyć agregaty białkowe po wiązaniu się z GAG w dużych stężeniach, co może upośledzać dodatkowo sygnalizację wewnątrzkomórkową. O dojrzałości Habilitantki świadczy jej wiodący wkład w powstanie wszystkich publikacji, składających się na osiągnięcie habilitacyjne oraz umiejętność analizy szerokiej tematyce literatury naukowej, co zostało udokumentowane m.in. w pracach przeglądowych. Kandydatka wykazała się dużą swobodą w formułowaniu wniosków i ciekawych hipotez, jednak w wielu przypadkach bazujących jedynie na danych transkryptomicznych. Publikacje, stanowiące podstawę osiągnięcia Habilitacyjnego wskazują drogę dla dalszych, bardziej szczegółowych badań, w celu potwierdzenia obserwacji Habilitantki na innych modelach oraz u pacjentów. Potwierdzenie tych wyników i lepsze poznanie mechanizmów zaangażowanych w patogenezę MPS będzie miało duży wpływ na rozwój diagnostyki i terapii tych chorób. Sugeruję tu również aby w przyszłości poszerzyć warsztat badawczy, tak aby dane transkryptomiczne były punktem wyjścia do dalszych badań, odkryć naukowych i publikacji w najbardziej prestiżowych czasopismach.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Obok głównego osiągnięcia naukowego Pani dr Karolina Pierzynowska przedstawiła dwa dodatkowe cykle publikacji dotyczące poszukiwania strategii terapeutycznych dla chorób neurodegeneracyjnych oraz nowych markerów choroby Huntingtona (HD). Pierwszy z nich obejmuje siedem prac opublikowanych w latach 2018-2021 (4 prace przeglądowe i 3 eksperymentalne), w których Habilitantka jest pierwszą autorką. Tematyka tych prac obejmuje zastosowanie genisteiny do indukcji autofagii jako terapii w chorobach związanych z akumulacją białek, tj. w chorobie Huntingtona i Alzheimerza. W ramach drugiego wyodrębnionego cyklu 3 prace Habilitantka scharakteryzowała m.in. zaburzenia w metabolizmie nukleotydów adeninowych w komórkowym modelu HD oraz wykazała istotne podwyższenie markerów stanu zapalnego na modelu mysim.

Całkowity dorobek naukowy dr Karoliny Pierzynowskiej jest imponujący i obejmuje 57 publikacji i 4 rozdziały w monografiach, z czego 44 prace powstały po doktoracie, czyli w okresie zaledwie trzech lat. Sumaryczny IF prac wynosi 241.554, prace cytowane były 1259 razy (wg WoS) a wskaźnik Hirscha Kandydatki wynosi 15. Habilitantka jest również współtwórcą polskiego patentu zatytułowanego „*Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimera*”. Wyniki te są ponadprzeciętne jak na ten etap drogi naukowej.

Ocena aktywności naukowej, osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych, popularyzujących naukę

Habilitantka prezentowała wyniki swoich badań na międzynarodowych konferencjach naukowych w formie posterów oraz prezentacji ustnych. Była członkiem komitetów organizacyjnych konferencji, kierowała projektem Preludium NCN oraz była kierownikiem kilku grantów przyznawanych przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Zdobyła fundusze na wyjazdy zagraniczne (NAWA). Ponadto, brała udział w realizacji wielu projektów jako wykonawca. Habilitantka recenzowała manuskrypty dla międzynarodowych czasopism naukowych i pełniła funkcję redaktora w kilku z nich. Za swoją działalność dr Karolina Pierzynowska została uhonorowana szeregiem nagród, m.in. Stypendium L’Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki 2019, czy Stypendium START Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej 2020. Habilitantka wykazuje się również istotną aktywnością dydaktyczną, m.in. jest promotorem pomocniczym w dwóch pracach doktorskich, wypromowała już pięciu magistrów i pięciu licencjuszy oraz prowadzi szereg zajęć dydaktycznych na Wydziale Biologii UG. Załączone materiały świadczą o tym, że dr Karolina Pierzynowska jest bardzo aktywnym popularyzatorem nauki. Bardzo dobrze oceniam powyższe elementy aktywności Habilitantki, które świadczą o nabyciu doświadczenia i umiejętności do samodzielnego prowadzenia badań oraz o dużym zaangażowaniu w sprawy nauki.

Wniosek końcowy

Osiągnięcie naukowe dr Karoliny Pierzynowskiej pt. „*Wykorzystanie danych transkryptomycznych do identyfikacji nowych celów terapeutycznych dla lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz*” stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Całkowity dorobek naukowy, dydaktyczny i popularyzatorski dr Karoliny Pierzynowskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Kandydatka wykazała się aktywnością naukową w więcej niż jednej instytucji naukowej, w tym instytucji zagranicznej. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie Pani dr Karolinie Pierzynowskiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z poważaniem,



Marta Olejniczak