



OCENA



rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Machcińskiej-Zielińskiej
pt. "Wpływ indukowanego hipoksja czynnika Hif-1 α oraz transkrypcyjnego
Foxn1 na ukierunkowanie procesu gojenia urazów skóry (regeneracyjny vs
reparacyjny)"

przygotowanej w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności Instytutu Rozrodu
Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
pod kierunkiem Pani Profesor Barbary Gawrońskiej-Kozak

Wydział

Biochemii, Biofizyki

i Biotechnologii

Zakład Biologii Komórki

BANK KOMÓREK

Wytwórnia Produktów
Lecznicych Terapii
Zaawansowanej

Kierownik

Prof. dr hab. Justyna Drukała

Gojenie uszkodzeń skóry jest wypadkową procesów naprawczych oraz regeneracyjnych w tkankach. Podstawową rolą procesów naprawczych jest jak najszybsze zamknięcie rany dla zminimalizowania czasu ekspozycji organizmu na szkodliwe czynniki zewnętrzne. Efektem końcowym naprawczego gojenia ran jest blizna. To niefunkcjonalna tkanka pozbawiona elementów komórkowych, zbudowana głównie z gęsto upakowanych włókien kolagenowych, które istotnie ograniczają ruchliwość i elastyczność skóry. Proces regeneracji jest natomiast ściśle związany z aktywnością komórek macierzystych, które mają zdolność do samoodnowy oraz dają początek bardziej wyspecjalizowanym komórkom, różnicującym i odbudowującym funkcjonalną tkankę. Ostateczny efekt gojenia po urazie jest wypadkową powyższych procesów. Bardzo pożądanym z klinicznego punktu widzenia efektem naprawy jest ograniczenie bliznowacenia, które jest przyczyną wielu dysfunkcji, ale także może stanowić poważny problem estetyczny stąd od wielu lat prowadzone są liczne badania w tym zakresie. W ten nurt badawczy doskonale wpisują się projekty realizowane przez prowadzony przez Panią Profesor Barbarę Gawrońską-Kozak zespół badawczy biologii regeneracyjnej, skupiające się na wyjaśnieniu mechanizmów regulujących procesy gojenia urazów skórnych. Jednym z czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w bliznowe gojenie ran jest Foxn1, którego brak w skórze manifestuje się niewyjaśnionym jak dotąd gojeniem regeneracyjnym – bezbliznowym. Biorąc pod uwagę wpływ czynników środowiskowych na gojenie ran skóry z pewnością niedotlenienie leżące u podstaw stresu oksydacyjnego stanowi istotny impuls do indukcji sygnałów molekularnych regulujących proces gojenia w warunkach niedoboru tlenu. Głównym regulatorem homeostazy tlenowej jest indukowany hipoksja czynnik Hif-1 α , a nieprawidłowości w jego ekspresji skutkują upośledzeniem gojenia, przejawiającym się powstawaniem blizn przerostowych lub brakiem zagojenia. O roli czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze wiadomo bardzo niewiele, a jego znaczenie w procesie gojenia ran stanowi przedmiot badań zespołu Pani Profesor Barbary Gawrońskiej-Kozak. Wcześniejsze badania zespołu wskazują na interakcję czynnika Foxn1 z Hif-1 α i jego genami docelowymi. Biorąc powyższe pod uwagę w ramach przedłożonej do recenzji dysertacji postawiono hipotezę badawczą, iż indukowany hipoksja czynnik transkrypcyjny Hif-1 α poprzez współdziałanie z czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 przekierowuje gojenie regeneracyjne na gojenie bliznowe. Hipotezę tę weryfikowano realizując dwa zadania badawcze.

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 61 45

fax +48(12) 664 69 02

email:

justyna.drukala@uj.edu.pl

W pierwszym z nich sprawdzano regulację gojenia ran poprzez badanie interakcji między Foxn1 a Hif-1 α , natomiast drugie zadanie badawcze poświęcone było zbadaniu zmian w fizjologii komórek naskórka w warunkach niedotlenienia na poziomie molekularnym i funkcjonalnym w kontekście zmian poziomu ekspresji Foxn1.

Formalny opis rozprawy

Dysertacja stanowi zbiór dwóch opublikowanych prac, których Pani mgr Sylwia Machcińska-Zielińska jest wiodącym autorem. Stanowią one spójną całość, co jest zgodne z art. 13 pkt 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami, to jest z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych* (...).” Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny współczynnik oddziaływania IF = 11,668).

Ponieważ obie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie, w rozprawie zamieszczono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac. Według oświadczeń współautorów Pani mgr Sylwia Machcińska-Zielińska jest głównym autorem, wykonała większą część doświadczeń w prezentowanych artykułach, brała czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowywania wyników oraz pisanie manuskryptów.

Gdy rozprawę doktorską stanowią opublikowane prace recenzent ma znacznie ułatwione zadanie, albowiem publikacje już zostały poddane wnikliwej ocenie przez wskazanych przez redakcję, w której interesie jest utrzymanie wysokiego rankingu czasopisma, niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Biorąc pod uwagę pozytywną ocenę publikacji przez niezależnych redaktorów, recenzentów i dołączając do tego własną ocenę nie mam merytorycznych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

Publikacje poprzedzone są obszernym, 76-stronicowym opisem zaprezentowanych w nich wyników zredagowanym wg klasycznego schematu rozprawy doktorskiej, zapoczątkowanej streszczeniem w języku polskim i angielskim i wykazem skrótów oraz spisem publikacji składających się na rozprawę doktorską.

Rozdział pierwszy to syntetyczny wstęp liczy 18 stron i zawiera 3 ryciny i 1 tabelę. Hipoteza i cele badawcze (rozdział drugi) zostały opisane na dwóch stronach pracy. Główna hipoteza zawiera dwie bardziej szczegółowe, które były weryfikowane przez przeprowadzenie siedmiu zadań badawczych.

Z kolei następujący rozdział trzeci Materiały i metody obejmuje 8 stron i zawiera 4 ryciny syntetycznie prezentujące schematy przeprowadzonych eksperymentów.

Rozdział 4 Wyniki liczy 15 stron. Opisane są w nim uzyskane wyniki eksperymentów z odwołaniem do rycin zamieszczonych w oryginalnych publikacjach wchodzących w skład dysertacji.

Dyskusja (rozdział piąty) obejmuje 8 stron, po której następuje rozdział szósty Podsumowanie przejrzyste zilustrowane schematycznie, a za nim rozdział siódmy – Wnioski. Bibliografia obejmuje 10 stron ze 101 pozycjami piśmiennictwa. Kolejną część rozprawy to oświadczenia współautorów dotyczące udziału poszczególnych autorów w powstawaniu publikacji, kopie

dwóch oryginalnych prac badawczych, będących podstawą dysertacji. Doktorantka załączyła także dodatkowe materiały do obu publikacji w formie elektronicznej.

Uwagi:

w pracy pojawia się szereg błędów interpunkcyjnych i ortograficznych – zdania rozpoczynane są z małej litery.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, jest informatywne, przywołuje dwie publikacje będące istotą dysertacji i przedstawia w formie skrótowej cele i najważniejsze wyniki pracy wraz z podsumowaniem.

Syntetyczny wstęp pracy w przejrzysty sposób wprowadza w zagadnienie rozprawy. W podrozdziałach Wstępu Doktorantka scharakteryzowała procesy gojenia z wytworzeniem blizny oraz gojenia regeneracyjnego skóry. Z kolei opisała zaangażowany w utrzymanie homeostazy skóry czynnik transkrypcyjny Foxn1 i odniosła się do wcześniejszych prac zespołu, które jednoznacznie wskazały, iż brak ekspresji tego czynnika w komórkach naskórka odpowiada za fenomen gojenia bezbliznowego. W kolejnym podrozdziale Doktorantka omawia jeden z kluczowych bodźców środowiskowych – niedotlenienie, które wpływa na profil gojenia ran indukując czynnik Hif-1 α . Ponownie odwołuje się do badań zespołu, w których analizowano powiązania aktywności Foxn1 i hipoksji w gojeniu urazów skórnych i wykazano istotną zależność ekspresji genów związanych z hipoksją (Hif-1 α , tioredoksyna 1) i Foxn1. W badaniach *in vitro* wykazano także indukcję Foxn1 pod wpływem hipoksji. Ostatni podrozdział poświęcony jest omówieniu udziału systemu tioredoksyn w obronie antyoksydacyjnej skóry. Doktorantka zaznacza w tym rozdziale powiązania między tioredoksyną 1 a czynnikiem Hif-1 i ponownie wplata w te rozważania uzyskane przez zespół wyniki, które stają się inspiracją do dalszych badań związanych z czynnikiem Foxn1, będących później zaprezentowanych jako część dysertacji. W następnym rozdziale Doktorantka sformułowała hipotezę badawczą i syntetycznie opisała szczegółowe zadania badawcze, jakie posłużyły do zweryfikowania hipotezy.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka przedstawiła przebieg doświadczeń, których precyzyjny opis został także zawarty w publikacjach składających się na dysertację. Na uwagę zasługuje imponujący warsztat metodyczny, jakim posługiwała się Doktorantka w trakcie realizacji swoich zadań badawczych.

W badaniach tych wykorzystywany był model myszy bezgrasiczych (nagich), (Cby.Cg-Foxn1^{-/-}/cmdb) z mutacją w obrębie genu kodującego czynnik transkrypcyjny Foxn1 – Foxn1^{-/-}, u których Pani Profesor Gawrońska-Kozak zaobserwowała i opisała (bezbliznową) regenerację uszkodzonej skóry w dorosłym życiu. W szczególności badania te dotyczyły roli czynnika Foxn1 w przekierowaniu szlaków regeneracji urazów skóry na szlaki naprawcze z wytworzeniem blizny. Jako kontrolę wykorzystano myszy (Balb/c/cmdb) – Foxn1^{+/+}. W eksperymentach *in vitro* użyte zostały keratynocyty i fibroblasty izolowane z myszy Foxn1^{-/-} oraz Foxn1^{+/+}.

W tym miejscu chciałabym prosić o wyjaśnienie, w jakim celu przeprowadzano transdukcję – keratynocytów *Foxn1*^{-/-} oraz *Foxn1*^{+/-} genem kodującym *Foxn1*? Czy układ doświadczalny wykorzystujący komórki *Foxn1*^{-/-} oraz *Foxn1*^{+/-} nie był właściwy do realizacji badań molekularnych w warunkach normoksji i hipoksji? Czy wyniki badań w takim układzie *in vitro* nie byłyby właściwsze do zestawienia z wynikami badań *in vivo*? Dlaczego w eksperymentach wykorzystujących model kokultury keratynocytów z fibroblastami (z przeznaczeniem do analiz proteomicznych) wykorzystywano tylko fibroblasty pochodzące od myszy *Foxn1*^{-/-}? Czy pożywka zdefiniowana dla keratynocytów jest właściwa dla wzrostu fibroblastów?

W swoich badaniach Doktorantka dokonała porównania procesu gojenia ran u myszy *Foxn1*^{-/-} oraz *Foxn1*^{+/-}, wykonała analizy histologiczne dla zbadania przebiegu reepitelializacji, odpowiedzi immunologicznej, angiogenezy. Izolowała także z pobranych wycinków skóry mRNA i białko, aby za pomocą reakcji RT-PCR i metodą western blot wykazać różnice w ekspresji genów białek biorących udział w tworzeniu macierzy międzykomórkowej i jej degradacji. Wykonała immunofluorescencyjną analizę ekspresji *Foxn1* i *Txn1*, a metodą ELISA określiła stężenie chemotaktycznej cytokiny MCP-1 indukującej rekrutację limfocytów i monocytów w miejsce rany.

W drugiej części badań Doktorantka wykorzystwała model *in vitro* i badała wpływ niedotlenienia na ekspresję genów indukowanych hipoksją. Analizy przeprowadzone zostały na komórkach izolowanych z myszy *Foxn1*^{+/-} i *Foxn1*^{-/-}. Grupę doświadczalną stanowiły keratynocyty transfekowane wektorem zawierającym cDNA *Foxn1* oraz białka zielonej fluorescencji GFP, grupę kontrolną wektorem zawierającym jedynie cDNA GFP.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż eksperymenty *in vitro* zostały przeprowadzone z wykorzystaniem bardzo obszernego warsztatu metodycznego, analiz proteomicznych i bioinformatycznych. Przeprowadzono testy angiogenne, badano aktywność metaboliczną komórek, proliferację (MTT), aktywność migracyjną komórek naskórka (test zarastania rany).

Rozdział Wyniki zawiera ogólny opis rezultatów przeprowadzonych badań, odwołujący się do szczegółowych wyników zamieszczonych w publikacjach. Wyniki analizy porównawczej procesu gojenia *in vivo* u myszy z aktywnym i nieaktywnym czynnikiem transkrypcyjnym *Foxn1* Doktorantka zawarła w pierwszej publikacji:

Impairment of the Hif-1α regulatory pathway in Foxn1-deficient (Foxn1^{-/-}) mice affects the skin wound healing process.

Machcinska S, Kopcewicz M, Bukowska J, Walendzik K, Gawronska-Kozak B. FASEB J. 2021 Feb;35(2):e21289. doi: 10.1096/fj.202001907R. PMID: 33475195

Wykazała, że u myszy pozbawionych czynnika *Foxn1* urazy skórne goją się w procesie regeneracji, który charakteryzuje się szybką re-epitelializacją, wysokim poziomem TGF-β3, a także relatywnie wysokim poziomem metaloproteinaz względem ich inhibitorów.

W publikacji opisano wyniki wskazujące jednoznacznie, że czynniki indukowane hipoksją, która uruchamia proces gojenia mogą być również regulowane aktywnością *Foxn1*.

Nieobecność tego czynnika wpływa na zachowanie stabilnego poziomu m.in. *Hif-1*, co może uruchamiać proces gojenia regeneracyjnego. Dodatkowo przeprowadzone badania wskazują na związek między pourazowym wzrostem ekspresji *Foxn1*, genów regulowanych hipoksją

oraz tworzeniem blizny, co uprawnia do zaproponowania mechanizmu regulacji Hif-1a przez czynnik Foxn1 w naprawczym gojeniu ran skóry.

W drugiej publikacji:

Hypoxia reveals a new function of Foxn1 in the keratinocyte antioxidant defense system.

Machcinska S, Walendzik K, Kopcewicz M, Wisniewska J, Rokka A, Pääkkönen M, Slowinska M, Gawronska-Kozak B. FASEB J. 2022 Aug;36(8):e22436. doi: 10.1096/fj.202200249RR. PMID: 35792861

przedstawiono wyniki wskazujące na mechanizm, w którym hipoksja i Foxn1 regulują zmiany fizjologiczne keratynocytów.

Zostały w niej opisane i zinterpretowane wyniki analiz *in vitro*, dotyczące profili proteomicznych keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym Ad-Foxn1 w warunkach normoksji i hipoksji. Wyodrębniono pod względem funkcjonalnym 4 klasy białek, których ekspresja jest odmienna w zaproponowanym modelu (Foxn1^{+/+}-Ad-Foxn1 vs. Foxn1^{+/+}-Ad-GFP vs. Foxn1^{+/+}). Wykonana została także analiza interakcji białkowych przy użyciu modeli sieciowych. Analiza wyekstrahowanych białek z zastosowaniem spektrometrii mas wykazała silną regulację oksydoreduktaz, w tym systemu Txn w keratynocytach z nadekspresją Foxn1.

W tym miejscu proszę o wyjaśnienie, czy zestawienie analiz in vitro na zaproponowanym modelu jest właściwe z modelem in vivo opisanym w publikacji 1? Czy wiadomo, jak obecność fibroblastów wykorzystanych w kokulturze z keratynocytami wpłynęła na regulację ekspresji białek?

W badaniach funkcji keratynocytów związanych z gojeniem ran Doktorantka wykazała, że czynnik Foxn1 pełni funkcję kontrolującą i regulującą tempo migracji komórek w zleżności od warunków dostępności tlenu i obniża tempo zarastania rany w warunkach hipoksji, co koreluje z wynikami uzyskanymi *in vivo*. Wykazała także związek tej obserwacji z wynikami analizy ekspresji białka Ccn2 regulującego odbudowę uszkodzonego naskórka. Ponieważ angiogeneza odgrywa kluczową rolę w gojeniu ran, Doktorantka przeprowadziła także test funkcjonalny tworzenia przestrzennych sieci mikrokapilarnych przez ludzkie komórki śródlonka żyły pępowinowej (HUVEC – ang. Human Umbilical Endothelial Vein) z wykorzystaniem medium definiowanym hodowlą keratynocytów wykazujących ekspresję Foxn1 w warunkach hipoksji. Wykazała zmniejszony potencjał proangiogeny HUVEC w porównaniu do hodowli w obecności medium kontrolnego, co wskazuje iż Foxn1 reguluje także angiogenezę w odpowiedzi na zmiany w dostępności tlenu w środowisku.

Ostatnim, bardzo interesującym i nowatorskim aspektem badań doktorantki było wskazanie Foxn1 jako czynnika regulującego ochronę antyoksydacyjną w skórze (reguluje ekspresję białek kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów, synchronizuje układ tioredoksyn). Szczegółowa analiza proteomu keratynocytów z nadekspresją Foxn1 wykazała, że Foxn1 silnie aktywuje system redox, w tym tioredoksyny i ich reduktazy. Istotnym odkryciem w opisanych badaniach było stwierdzenie obecności Txnrd3 w keratynocytach mysich i regulacji jej poziomu stymulowanej Foxn1 w warunkach hipoksji.

Cele badawcze zostały zrealizowane i bardzo rzetelnie udokumentowane, a wyniki oryginalnych badań wskazują, że Foxn1 jest potencjalnym regulatorem czynników indukowanych hipoksją i wpływa na przebieg gojenia ran. Brak jego aktywności skutkuje zaburzeniem ścieżki sygnałowej Hif-1 α /Fih-1 i prowadzi do bezbliznowego gojenia ran. Wyniki wskazują także na nowe kierunki badań dotyczących udziału Foxn1 i układu tioredosyn w mechanizmach antyoksydacyjnych zarówno w skórze niezranionej jak i pourazowej.

Podsumowanie

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Biorąc pod uwagę fakt, iż lokalizacja i modulacja ekspresji czynnika Foxn1 w skórze myszy jest analogiczna do ekspresji w skórze człowieka, a fenotyp spowodowany brakiem aktywności czynnika FOXN1 występuje również u ludzi, wyniki uzyskane na modelu mysim mogą stanowić podstawę do analiz tkanek ludzkich i w dalszej perspektywie prób modulowania jego ekspresji dla uzyskania korzystnego efektu terapeutycznego szczególnie w przypadku gojenia ran przewlekłych charakteryzujących się chronicznym niedotlenieniem.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pracy Pani mgr Sylwii Machcińskiej – Zielińskiej w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz o tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr65, poz595, wraz z późniejszymi zmianami) określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.z 2017 r. poz. 1789). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie Pani mgr Sylwii Machcińskiej– Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

